

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Athérosclérose

importance de la polarisation des macrophages et des LDLs oxydées

Pireaux, Valérie

Award date:
2017

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Université de Namur (UNamur)
Faculté des Sciences – Département de Biologie
Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS)
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)
Rue de Bruxelles, 61 ; B-5000 Namur, Belgique

ATHEROSCLEROSE : IMPORTANCE DE LA POLARISATION DES MACROPHAGES ET DES LDLs OXYDEES

Dissertation originale présentée
par **Valérie PIREAUX**
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. Martine RAES (promotrice)
Unité de Recherche en Biochimie et
Biologie Cellulaire
NARILIS, UNamur, Namur

**Prof. Karim ZOUAOU BOUDJELTIA
(co-promoteur)**
Laboratoire de Médecine Expérimentale
(Unité 222 ULB)
Université Libre de Bruxelles, CHU-
Charleroi, Montigny-Le-Tilleul

Prof. Carine MICHIELS
Unité de Recherche en Biochimie et
Biologie Cellulaire
NARILIS, UNamur, Namur

Prof. Muriel MOSER
Unité de Recherche en Immunobiologie
Université Libre de Bruxelles
Gosselies

**Prof. Yves POUMAY (président du
jury)**
Laboratoire Cellules et Tissus
Unité de Recherche en Physiologie
Moléculaire
NARILIS, UNamur, Namur

Prof. Philippe LESNIK
Inserm UMR_S 1166
Université Pierre et Marie Curie
Paris, France

17 mai 2017



Université de Namur (UNamur)
Faculté des Sciences – Département de Biologie
Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS)
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)
Rue de Bruxelles, 61 ; B-5000 Namur, Belgique

ATHEROSCLEROSE : IMPORTANCE DE LA POLARISATION DES MACROPHAGES ET DES LDLs OXYDEES

Dissertation originale présentée
par **Valérie PIREAUX**
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. Martine RAES (promotrice)

Unité de Recherche en Biochimie et
Biologie Cellulaire
NARILIS, UNamur, Namur

Prof. Muriel MOSER

Unité de Recherche en Immunobiologie
Université Libre de Bruxelles
Gosselies

**Prof. Karim ZOUAOUI BOUDJELTIA
(co-promoteur)**

Laboratoire de Médecine Expérimentale
(Unité 222 ULB)
Université Libre de Bruxelles, CHU-
Charleroi, Montigny-Le-Tilleul

**Prof. Yves POUMAY (président du
jury)**

Laboratoire Cellules et Tissus
Unité de Recherche en Physiologie
Moléculaire
NARILIS, UNamur, Namur

Prof. Carine MICHIELS

Unité de Recherche en Biochimie et
Biologie Cellulaire
NARILIS, UNamur, Namur

Prof. Philippe LESNIK

Inserm UMR_S 1166
Université Pierre et Marie Curie
Paris, France

17 mai 2017

RESUME

Les macrophages sont des cellules inflammatoires clés jouant un rôle essentiel dans la formation, dans l'évolution ainsi que dans la résorption éventuelle d'une lésion athéroscléreuse (Glass and Witztum, 2001; Pluddemann et al., 2007). Depuis une quinzaine d'années maintenant, le concept de polarisation des monocytes-macrophages est très étudié, tant *in vitro* (Hirose et al., 2011) qu'*in vivo* (Khallou-Laschet et al., 2010). La détermination de leur phénotype et donc de leurs fonctions permet notamment d'évaluer le contexte inflammatoire dans le cas des lésions athéroscléreuses. Les macrophages M1 sont dits pro-inflammatoires et les macrophages M2, anti-inflammatoires. En fonction du microenvironnement cellulaire, le phénotype peut passer de M2 à M1 ou inversement (Khallou-Laschet et al., 2010). Ce passage d'un phénotype à l'autre est possible via une régulation de l'expression de gènes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires par des mécanismes transcriptionnels et épigénétiques (Ivashkiv, 2013; Lawrence and Natoli, 2011; Takeuchi and Akira, 2011).

Au cours de cette thèse, le modèle cellulaire utilisé a été la lignée de macrophages RAW 264.7, souvent choisie *in vitro* dans le cadre de l'athérosclérose. Nous avons donc commencé par mettre au point, évaluer et caractériser la polarisation des macrophages RAW 264.7 en étudiant l'expression de gènes marqueurs M1 et M2 aux niveaux ARNm et protéique. Ensuite, nous avons vérifié si les cellules polarisées étaient capables de former des cellules spumeuses lorsqu'elles étaient mises en présence de LDLs natives et modifiées. Nous avons mis en évidence que les LDLs oxydées à la myéloperoxydase (Mox-LDLs) semblent favoriser un phénotype M2, anti-inflammatoire, et un phénotype antioxydant, tout en induisant certains marqueurs M1 pro-inflammatoires. De plus, ces LDLs sont les plus internalisées par les macrophages, polarisés ou non. Ces données ont été validées avec des macrophages obtenus à partir de cellules de moelle osseuse provenant de souris C57BL/6.

Par la suite, la polarisation des macrophages a été étudiée au sein des lésions athéroscléreuses d'un modèle *in vivo*, les souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}. Ce travail, réalisé en collaboration avec le laboratoire de B. Robaye (IRIBHM, ULB, Gosselies), nous a permis de conclure que dans ce modèle - si les lésions sont bien réduites, avec une réduction globale des macrophages -, il ne semble pas y avoir de différence dans le ratio entre cellules M1 et M2 dans les plaques athéroscléreuses, comparées à celles des souris *ApoE*^{-/-}.

Enfin, dans un modèle plus complexe, nous avons montré que les patients hémodialysés, caractérisés par une athérosclérose accélérée, possèdent plus de monocytes polarisés M2 que des individus sains. De plus, cette augmentation du pourcentage de monocytes circulants M2 s'accompagne d'une augmentation de la concentration en M-CSF plasmatique chez ces patients.

A l'avenir, il serait intéressant d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la modulation de la polarisation des monocytes-macrophages, notamment en présence de LDLs oxydées, au sein des lésions athéroscléreuses et de mieux comprendre les rôles respectifs des cellules M1 et M2 dans l'athérogenèse, des lésions précoces aux lésions tardives.

SUMMARY

Macrophages are key inflammatory cells, which are involved in atherosclerotic lesion formation, evolution and resorption (Glass and Witztum, 2001; Pluddemann et al., 2007). Since about 15 years now, the concept of monocyte-macrophage polarization has been intensively studied *in vitro* (Hirose et al., 2011) and *in vivo* (Khallou-Laschet et al., 2010). Indeed, characterization of macrophage phenotype and functions can also help to characterize the inflammatory state of the lesions. M1 macrophages are pro-inflammatory, while M2 macrophages are anti-inflammatory. The macrophage phenotype can switch from M2 to M1 or *vice-versa*, because of changes of the microenvironment within the lesion (Khallou-Laschet et al., 2010). This switch can happen through the regulation of the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory genes via transcriptional and epigenetic mechanisms (Ivashkiv, 2013; Lawrence and Natoli, 2011; Takeuchi and Akira, 2011).

In this study, we choose to work with the RAW 264.7 murine cell line, often used in culture in the context of atherosclerosis. We have started the study by setting up, evaluating and characterizing the polarization of RAW 264.7 macrophages by monitoring the expression of M1 and M2 marker genes at the mRNA and protein levels. Then, we checked whether M1 and M2 polarized cells were able to form foam cells, by incubating them with native and modified LDLs. We have shown that LDLs oxidized with myeloperoxidase (Mox-LDLs) seem to favour the M2 anti-inflammatory phenotype as well as the antioxidant phenotype, while also favouring the expression of some pro-inflammatory M1 genes. Moreover, these LDLs were the most efficiently engulfed by (non)-polarized macrophages. All these data have been validated on macrophages derived from bone marrow cells of C57BL/6 mice.

Afterwards, macrophage polarization has been studied within atherosclerotic lesions of the *in vivo* *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-} mouse model. This work was carried out in collaboration with the laboratory of B. Robaye (IRIBHM, ULB, Gosselies). From this study we concluded that in this model, although lesions are clearly reduced compared to *ApoE*^{-/-} mice, with a significant overall reduction in macrophages, there was no change in the ratio of M1 to M2 cells in the lesions.

Finally, in a more complex model, we have showed that patients undergoing haemodialysis, prone to accelerated atherosclerosis, display higher levels of M2 circulating monocytes as compared to healthy individuals. Furthermore, this increase in the percentage of M2 circulating monocytes is coupled with an increase of the M-CSF plasmatic concentration in these patients.

Further experiments are needed to identify the molecular actors involved in the modulation of monocyte-macrophage polarization, for instance in the presence of oxidized LDLs, within the atherosclerotic lesions.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....I

RESUME..... III

SUMMARYIV

TABLE DES MATIERES V

ABREVIATIONS VIII

AVANT-PROPOS.....XIV

I. INTRODUCTION 1

1. Macrophages..... 1

1.1 Fonctions et polarisation 1

1.1.1 Origine et fonctions des macrophages 1

1.1.1.1 Monocytes : origine, hétérogénéité et rôles 1

1.1.1.2 Macrophages : origine, hétérogénéité et fonctions 4

1.1.2 Polarisation des macrophages..... 11

1.1.2.1 Macrophages et polarisation 11

1.1.2.1.1 Macrophages M1..... 11

1.1.2.1.2 Macrophages M2..... 12

1.1.2.1.3 Macrophages Mox 14

1.1.2.2 Gènes marqueurs de la polarisation..... 14

1.1.2.2.1 Les marqueurs M1 14

1.1.2.2.2 Les marqueurs M2 17

1.1.2.2.3 Les marqueurs Mox..... 20

1.1.2.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans la polarisation..... 21

1.1.2.4 Sources des macrophages afin d'étudier la polarisation *in vitro* 23

1.1.2.5 Polarisation des macrophages *in vivo* 24

2. Macrophages et athérosclérose..... 27

2.1 Maladies cardiovasculaires et athérosclérose..... 27

2.1.1 Contexte général, définition et facteurs de risques 27

2.1.2 Formation d'une plaque athéroscléreuse / Athérogenèse..... 29

2.1.3 Cholestérol et lipoprotéines 32

2.1.3.1 Cholestérol..... 32

2.1.3.1.1 Synthèse du cholestérol..... 32

2.1.3.1.2 Régulation de sa synthèse et internalisation 33

2.1.3.1.3 Apport exogène du cholestérol 33

2.1.3.2 Lipoprotéines 34

2.1.3.2.1 Chylomicrons 34

2.1.3.2.2 VLDLs..... 36

2.1.3.2.3 LDLs 37

2.1.3.2.4 HDLs..... 38

2.1.4 Mécanismes d'oxydation des LDLs 41

2.1.4.1 Modifications par des ions métalliques de transition..... 42

2.1.4.1.1 Le cation Fe²⁺ (groupement hème) 42

2.1.4.1.2 Le sulfate de cuivre (CuSO₄) 42

2.1.4.2 Modifications par des systèmes enzymatiques 44

2.1.4.2.1 Les NAD(P)H oxydases 44

2.1.4.2.2 La xanthine oxydase..... 45

2.1.4.2.3 Les lipoxygénases.....	45
2.1.4.2.4 La myéloperoxydase (MPO)	47
2.1.4.2.4.1 Origine et synthèse	47
2.1.4.2.4.2 Mécanismes enzymatiques de la MPO.....	48
2.1.4.2.4.3 Rôles physiologiques de la MPO.....	49
2.1.4.2.4.4 Rôle de la MPO dans l'athérosclérose	50
2.1.4.2.4.5 Oxydation des lipoprotéines en présence de MPO <i>in vitro</i>	52
2.1.4.3 Modifications des LDLs <i>in vivo</i>	53
2.1.5 Formation de cellules spumeuses	54
2.1.5.1 Récepteurs aux LDLs natives (LDL-R).....	54
2.1.5.2 Récepteurs « scavenger ».....	55
2.1.5.2.1 Récepteurs « scavenger » de classe A.....	55
2.1.5.2.2 Récepteurs « scavenger » de classe B.....	56
2.1.5.2.3 Récepteurs « scavenger » de classe E.....	57
2.1.5.3 Transporteurs de type ABC-ATPases.....	58
2.1.5.4 Autres récepteurs aux lipoprotéines : TLR4 et FcγRIII	59
2.2 Polarisation des macrophages dans les lésions athéroscléreuses.....	59
2.2.1 Comportement dynamique des macrophages M1 et M2 dans les plaques <i>in vivo</i>	60
2.2.2 LDLs et polarisation des macrophages	62
3. Etude <i>in vivo</i> de l'impact de la polarisation des macrophages sur l'évolution des lésions athéroscléreuses	64
3.1 Modèles murins de base afin d'étudier l'athérosclérose	65
3.2 Modèles murins ciblés	67
3.2.1 Modèles murins avec des profils de lipoprotéines plus proches des profils humains	68
3.2.1.1 Souris <i>Ldl-r^{-/-}</i> x <i>Apobec^{-/-}</i>	68
3.2.1.2 Souris <i>Ldl-r^{-/-}</i> x Tg <i>APOB100</i>	68
3.2.1.3 Souris transgéniques <i>CETP-APOB100</i> humaines.....	69
3.2.2 Modèles murins ciblés sur la régression des lésions : les souris Reversa	69
3.2.3 Modèles murins ciblés sur le métabolisme des HDLs	70
3.2.4 Modèle murin d'hypercholestérolémie familiale par xélogreffe d'hépatocytes	70
3.2.5 Modèles murins exploitant la technique d'édition de génome CRISPR- Cas9	71
3.3 Modèle murin utilisé dans ce travail : les souris <i>ApoE^{-/-}</i> x <i>P2y₆^{-/-}</i>	72
3.3.1.1. Les récepteurs purinergiques P2Y et le récepteur P2Y ₆	72
3.3.1.2. Souris <i>P2y₆^{-/-}</i> et souris <i>P2y₆^{-/-}</i> x <i>ApoE^{-/-}</i>	73
II. OBJECTIFS DU TRAVAIL	74
III. RESULTATS	76
3.1 Effet comparatif des LDLs oxydées sur la polarisation de macrophages murins.	77
3.1.1 Article publié dans le journal « Mediators of Inflammation »	77
3.1.2 Etablissement du phénotype « Mox » dans la lignée RAW 264.7 et effets des LDLs oxydées.....	107
3.1.3 Expression des récepteurs « scavenger » dans les macrophages M1 et M2	107

3.2 Implication possible de P2Y ₆ dans la polarisation des macrophages.	109
3.2.1 Effet de l'UDP sur la polarisation des macrophages <i>in vitro</i>	109
3.2.2 Effet de l'inactivation de P2y ₆ dans le modèle de souris <i>ApoE</i> ^{-/-} sur la polarisation des macrophages au sein des lésions athéroscléreuses.....	110
3.3 Etude de la polarisation des monocytes et des marqueurs inflammatoires et du stress oxydatif chez des patients hémodialysés	112
3.3.1 Article en préparation.....	112
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	132
Les LDLs oxydées influencent-elles la polarisation des macrophages ? Et si oui, quel type de LDLs oxydées ?.....	133
P2Y ₆ joue-t-il un rôle dans la polarisation des macrophages présents dans les lésions athéroscléreuses ?	137
Les monocytes sont-ils déjà pré-polarisés dans la circulation ? - Cas des patients hémodialysés.....	139
L'athérosclérose, une maladie inflammatoire qui ne se résoud pas ?.....	141
Quelques autres pistes d'intervention pour limiter l'athérogénèse?	144
Conclusion générale	146
V. REFERENCES.....	148
VI. ANNEXES	207
Annexe 1. Matériels et méthodes complémentaires.....	207
Annexe 2. Etude de la cytotoxicité du LPS.....	209
Annexe 3. Caractérisation des LDLs oxydées par le sulfate de cuivre et par la myéloperoxydase.	210
Annexe 4. Autres méthodes de caractérisation des Mox-LDLs.	211
Annexe 5. Internalisation des LDLs natives et oxydées par les macrophages (non-) polarisés.	212
Annexe 6. Polarisation des macrophages et expression des récepteurs de type « scavenger » et des PRR.....	213

ABBREVIATIONS

3-Cl-Tyr	3-chlorotyrosine
3-NO ₂ -Tyr	3-nitrotyrosine
ABCA	« ATP-Binding Cassette type A »
ABP	« Albumin-binding protein »
AC	« Adenyl cyclase »
Ac-LDLs	« Acetylated LDLs »
ACAT	« Acyl CoA-cholesterol acyltransferase »
AIM	« Apoptotic inhibitor »
ALOX-15	« Arachidonate 15-lipoxygenase »
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	« Activator protein-1 »
ApoB/E	Apolipoprotein-B/E
Apobec-1	« ApoB mRNA editing catalytic polypeptide-1 »
ARE	« Antioxidant response element »
Arg1	Arginase-1
ATF6	« Activating transcription factor 6 »
ATMs	« Adipose tissue macrophages »
AVC	Accident vasculaire cérébral
BAD	« Bcl2-associated death promotor »
BAX	« Bcl2-associated X protein »
BCL2	« B-cell lymphoma-2 »
BET	Bromodomaine et domaine extra-terminal
BVR	Biliverdine réductase
c-MAF	« Musculoaponeurotic fibrosarcoma proto-oncogene »
c-Myc	« c-Myelocytomatosis oncogene »
CAMs	« Classically-activated macrophages »
CCL5	« Chemokine (C-C motif) ligand 5 »
CCR2	« C-C chemokine receptor type 2 »
CD36	« Cluster of Differentiation-36 »
CD62L	« L-selectin »
Cdk9-cycline	« <i>Cyclin-dependent kinase-9</i> »
CEL	« Carboxyl ester lipase »
CETP	« Cholesterol ester transfer protein »
ChemR23	« Chemerin Receptor 23 »
CHOP-10	« C/EBP homologous protein-10 »
CLN	Calnexine
CLRs	« C-type lectin receptors »
CO	« Carbon oxide »
COPII	« Coat protein complex II »
COX-2	Cyclooxygénase-2 inductible
CREB	« cAMP response element-binding protein »
CRISPR-Cas9	« clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated »
CRP	« C-reactive protein »
CRT	Calréticuline
CSF-R	« Colony stimulating factor-receptor »
CTLDs	« C-type lectin-like domains »
CUL3	« Cullin 3 »
CuSO ₄	Sulfate de cuivre

Abréviations

CX3CR1	« C-X3-C chemokine receptor type 1 »
CXCL9	« Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 »
CysR	Domaine N-terminal riche en cystéine
DAG	Diacylglycérol
DAMPs	« Danger associated molecular patterns »
DKO	« Double knock-out »
Domaines SH2	Domaines « Src Homology 2 »
EGF-A	« Epidermal growth factor-like A »
EGFP	« Epidermal growth factor precursor »
ENG	« Engolin »
eNOS (ou NOS-3)	« endothelial Nitric Oxide Synthase »
ESL-1	« E-selectin ligand-1 »
Fab	Domaine variable de l'anticorps
FAD	« Flavin adenine dinucleotide »
FAH	« fumaryl acetoacetate hydrolase »
Fc	Domaine constant de l'anticorps
FcγRIII	« Fc γ receptor III »
Fizz1	« Transcription factor found in inflammatory zone 1 »
fMLP	« formyl-met-leu-phe »
FNII	Domaine fibronectine de type II
FPP	Farnésyl pyrophosphate
GAS	« γ-activated IFN sequence »
GM-CSF	« Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor »
GS28	« Golgi SNARE-28 kDa »
GPIIB/IIA	Glycoprotéine IIB/IIA
GPP	Géranyl pyrophosphate
GTP/GDP	Guanosine tri/di-phosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCF	Hypercholestérolémie familiale
HDLs	« High-density lipoproteins »
HDR	« homology-directed repair »
HIF	« Hypoxia inducible factor »
HL	« Hepatic lipase »
HLA-DR	« Human leucocyte antigen-antigen D related »
HMG CoA	« 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A »
HNE	Hydroxynonéal
HO-1	Hème oxygénase-1
HOCl	Acide hypochloreux
HpETE	Acide hydro(per)oxy-éicosatétraénoïque
HpODE	Acide hydro(per)oxy-octadécadinénoïque
HPRT	« Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase »
HSP	« Heat shock protein »
I-BET	« Inhibitor of BET proteins »
ICAM-1	« Intracellular adhesion molecule-1 »
ID3	« DNA-binding protein inhibitor-3 »
IDLs	« Intermediate-density lipoproteins »
IDO	« Indoleamine 2,3-dioxygenase »
IFNGR	« Interferon-γ receptor »
IFNγ	Interféron-γ

Abréviations

IGF1	« Insulin-like growth factor-1 »
IgG	Immunoglobuline G
IκB	« Inhibitory-B proteins κB »
IKKα	« Inhibitory-binding protein κB kinase »
IL-10	Interleukine-10
IL-1Ra	« Interleukin-1 receptor antagonist »
IL-2Rγ	« IL-2 receptor subunit gamma »
iNOS (ou NOS-2)	« inducible Nitric Oxide Synthase »
INSIG-1	« Insulin-induced gene-1 »
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
IPAF	« ICE-protease-activating factor »
IPP	Isopentényl pyrophosphate
IRAK	« Interleukin-1 receptor-associated kinase »
IRE1α	« serine/threonine-protein kinase endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1α »
IRF	« Interferon regulating factor »
ISRE	« Interferon sensitive response element »
IPS-1	« interferon promoter stimulator-1 »
Jak	« Janus kinase »
JMJD3	« Jumoji-domain containing-3 » ou « JmjC-domain containing protein-3 »
JNK	« cJun N-terminal kinase »
KDM6B	« Lysine demethylase-6B »
KDR (= VEGFR2)	« Kinase insert domain receptor »
Keap1	« Kelch-like ECH-associated protein 1 »
KLF4	« Krüppel-like factor 4 »
LA	« LDL-receptor type A »
LBP	« LPS-binding protein »
LCAT	« Lecithin cholesterol acyltransferase »
LDL-R	« Low-density lipoprotein-receptor »
LDLs	« Low-density lipoproteins »
LFA-1	« Lymphocyte function-associated antigen-1 »
LOX	Lipoxygénase
LOX-1	« Lectin-like oxidized LDL receptor-1 »
LPL	« Lipoprotein lipase »
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	« LDL-R-related protein »
LTA	« Lipoteichoic acid »
LXA ₄	Lipoxine-A ₄
LXR	« Liver X receptor »
Ly6C	« Lymphocyte 6 antigen complex »
M-CSF	« Macrophage-colony stimulating factor »
MAC-1	« Macrophage-1 antigen »
MAL	« MyD88-adaptor-like »
MAPK	« Mitogen-activated protein kinase »
MCP-1	« Monocyte chemoattractant protein-1 »
MD-2	« Lymphocyte antigen 96 »
MDA	Malondialdéhyde
MDMs	Macrophages dérivés de monocytes
MEC	Matrice extracellulaire
MerTK	« Mer tyrosine kinase »
Met(O)	« Methionine sulfoxide »

Abréviations

MHC-II	« Major histocompatibility complex-type II »
MHem (= HA-mac)	Macrophages trouvés dans les plaques athéroscléreuses hémorragiques
miR	« microRNA »
mmLDLs	« minimally modified LDLs »
MMPs	Métalloprotéinases de matrice
Mo-pt	Molybdoptérine
MP	Membrane plasmique
MPO	Myéloperoxydase
MpOx-LDLs/Mox-LDLs	« Myeloperoxidase-oxidized-LDLs »
MRC1	« Mannose receptor C-type 1 »
MSR1	« Macrophage scavenger receptor-1 »
MTP ou Mtp	« Microsomal triglyceride transfer protein »
MyD88(s)	« Myeloid differentiation primary response gene 88 (s : spliced variant) »
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAIP5	« NLR family, apoptosis inhibitory protein-5 »
NALP1	« NACHT, LRR and PYR domains-containing protein-1 »
Nat-LDLs	« Native-LDLs »
NCoR	« Nuclear receptor corepressor »
NEMO (= IKK γ)	« NF κ B essential modulator »
NF κ B	« Nuclear factor-kappa B »
NHEJ	« non-homologous end joining »
NIK	« NF κ B-inducing kinase »
NKT	« Natural killer T cells »
NLRs	« Nod-like receptors »
nNOS (ou NOS-1)	« neuronal Nitric Oxide Synthase »
NO	« Nitric oxide »
NO $_2^-$	Nitrite
NOD	« Nucleotide binding-oligomerization domain-containing protein »
NOX	NAD(P)H oxydase
NPC1-L1	« Niemann-Pick C1-like 1 »
Nrf2	« Nuclear factor-erythroid-derived 2-like 2 »
NT	Non transplanté
NTBC	« 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione »
O $_2^-$	Anion superoxyde
Olr1	« Oxidized low-density lipoprotein-1 »
ONOO $^-$	Peroxynitrite
Ox-LDLs	« Copper sulfate-oxidized-LDLs »
oxPAPC	« oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine »
P-TEFb	« Positive transcription elongation factor-b »
p300-CBP	« p300-Creb Binding Protein »
P5C	« Pyrroline 5-carboxylate »
PAMPs	« Pathogen associated molecular patterns »
PCSK9	« Proprotein convertase subtilisin/kenin type-9 »
PCTV	« Pre-chylomicron transport vesicles »
PDGF	« Platelet-derived growth factor »
PECAM-1	« Platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1 »

Abréviations

PGF	« Platelet growth factor »
PI3K	« Phosphoinositide 3-kinase »
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
pIpc	« polyinosinic-polycytidylic acid »
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase-C
PMA	« phorbol 12-myristate 13-acetate »
PMN	Polymorphonucléaires neutrophiles
PPAR γ	« Peroxisome proliferator-activated receptor γ »
PRRs	« Pattern recognition receptors »
PSGL-1	« P-selectin glycoprotein ligand-1 »
PTVs	« Protein transport vesicles »
PU.1	« 31-kDa transforming protein », liant les régions de l'ADN riches en purine
PUFA	« Polyunsaturated fatty acid »
RAB	« Ras related protein »
Rag2	« Recombination activating gene-2 »
RE	Réticulum endoplasmique
RHOF	« Ras homolog family member F »
RLRs	« RIG-I-like receptors »
RNH ₂ Cl	Chloramines
RNH ₃	Amines
RNS	« Reactive nitrogen species »
ROS	« Reactive oxygen species »
RTK	Récepteurs à tyrosine kinase
RvE1/RvD	Résolvine E1/D
SCAP	« SREBP cleavage-activating protein »
SCARB1	« Scavenger receptor class B-1 »
SIGIRR	« Single immunoglobulin and Toll-Interleukin 1 receptor (TIR) domain »
SIRPA	« Signal-regulatory protein- α »
sMAF	« small musculoaponeurotic fibrosarcoma »
SMRT	« Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors »
SOCS	« Suppressor of cytokine signaling protein »
SOD	« Superoxide dismutase »
sPLA ₂	Phospholipase A ₂ sécrétoire
SR-A	« Scavenger receptor-type A »
SR-B	« Scavenger receptor-type B »
SRE	« Sterol regulatory element »
SREBP	« Sterol response element binding protein »
SRP	« Signal recognition particle »
SRXN1	Sulfirédoxine-1
SSD	« Sterol-sensing domain »
ST2 (= IL-1RL1)	« Interleukin-1 receptor like-1 »
STAT	« Signal transducer and activator of transcription »
TAK	« Transforming growth factor- β -activated kinase »
TAMs	« Tumor-associated macrophages »
TAP	« TAK-binding protein »
TBARS	« Thiobarbituric acid reactive substances »
TGF- β	« Transforming growth factor- β »
Th1/Th2	« T helper-1 » / « T helper-2 »

Abréviations

TIE2/TEK	Gène codant pour « TEK tyrosine kinase » ou « angiopoietin-1 receptor »
TLRs	« Toll-like receptors »
TNF α	« Tumor necrosis factor α »
Tollip	« Toll-interacting protein »
TRAF6	« TNF-receptor associated factor 6 »
TRAM (= TICAM-2)	« TRIM-related adapter molecule »
TRIAD3A	« Triad domain-containing protein 3 ou « E3 ubiquitin-protein ligase RNF216 »
TRIF (= TICAM-1)	« TIR-containing adapter molecule »
TXNRD1	« Thioredoxin reductase-1 »
Tyk	« Tyrosine kinase »
Ubc13	« Ubiquitin C-13 »
Ucv1a	« Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1a »
UPR	« Unfolded protein response »
v-/t-SNARE	« Vesicle-/Target-membranes-soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment protein receptor »
VAMP7	« Vesicle-associated membrane protein-7 »
VCAM-1	« Vascular cell adhesion molecule-1 »
VLA-4	« Very late antigen-4 »
VLDLs	« Very low-density lipoproteins »
VTVs	« VLDL transport vesicles »
XDH	« Xanthine reductase »
XO	« Xanthine oxidase »
XOR	« Xanthine oxidoreductase »
YAC	« Yeast artificial chromosome »
YM1 (= Ch3l3)	« Chitinase 3-like 3 lectin »

Avant-propos

AVANT-PROPOS

Cellules de l'immunité innée, les monocytes-macrophages interviennent dans plusieurs processus afin d'assurer *in fine* le maintien de l'homéostasie du tissulaire.

Dans les années 1970, Mackaness et son équipe ont découvert que des stimuli du microenvironnement étaient capables de moduler la physiologie des macrophages, leur permettant ainsi d'améliorer leur activité bactéricide (Mackaness, 1977). Ceci a permis d'établir plus tard, *in vitro*, une classification des macrophages, basée sur celle de la nomenclature des cellules immunitaires Th1/Th2. Les macrophages sont donc aujourd'hui caractérisés par l'expression de plusieurs gènes dits « marqueurs de polarisation ». Les plus étudiés et les mieux caractérisés sont les macrophages M1, dits « pro-inflammatoires » et les macrophages M2, dits « anti-inflammatoires », tous deux appartenant à un continuum de polarisation (He and Carter, 2015; Labonte et al., 2014; Mantovani et al., 2007; Mosser, 2003; Mosser and Edwards, 2008; Murray et al., 2014). Bien que ce type de classification soit relativement facile à définir et à utiliser *in vitro*, elle ne reflète que de façon incomplète la réalité *in vivo* et il faudra à l'avenir revoir cette classification en intégrant mieux les fonctionnalités des macrophages.

Les monocytes-macrophages sont un des types cellulaires principaux intervenant dans l'initiation et la progression de certaines maladies inflammatoires chroniques dont l'athérosclérose (pour une revue, voir (Randolph, 2014)). Il s'agit bien d'une maladie vasculaire inflammatoire chronique caractérisée notamment par un dysfonctionnement endothélial et par l'accumulation de lipoprotéines de faible densité dans l'intima d'artères de gros ou moyen calibres (Tabas et al., 2015). Il est en effet accepté depuis plusieurs années qu'une concentration élevée de LDLs plasmatiques, mais aussi la production de LDLs oxydées, sont des facteurs clés dans l'initiation et l'évolution des lésions athéroscléreuses, elles-mêmes à la base des maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral. Plusieurs systèmes oxydatifs des LDLs existent *in vivo*. Dans ce travail, nous avons privilégié l'oxydation des LDLs à la myéloperoxydase, enzyme pro-inflammatoire, présente dans les lésions athéroscléreuses. Nous avons comparé leurs effets à ceux déclenchés par les LDLs natives, mais aussi par les LDLs oxydées au cuivre, qui restent la référence, bien qu'elles s'avèrent peu pertinentes, du fait des concentrations en sels de cuivre utilisées.

Les LDLs oxydées, au contraire des LDLs natives, ne sont plus reconnues par le LDL-R, mais par des récepteurs « scavenger », exprimés en membrane des macrophages et non régulés par la concentration intracellulaire en cholestérol. Cette reconnaissance mène à une internalisation massive des LDLs, permettant la formation de cellules spumeuses qui s'accumulent dans les lésions (Moore and Freeman, 2006).

Vu que les monocytes et macrophages sont au cœur de ce travail, nous avons choisi de les introduire en premier lieu avant d'aborder leur implication dans le contexte de l'athérosclérose, qui sera abordée dans un deuxième temps. L'introduction de cette thèse se terminera par une description de différents modèles murins utilisés afin de comprendre l'initiation et le développement de cette maladie, et plus récemment pour certains de ceux-ci, pour étudier le comportement des macrophages au sein de ces lésions. Ces modèles sont également utiles pour comprendre le métabolisme des lipoprotéines par exemple ou pour développer des thérapies adaptées.

Introduction

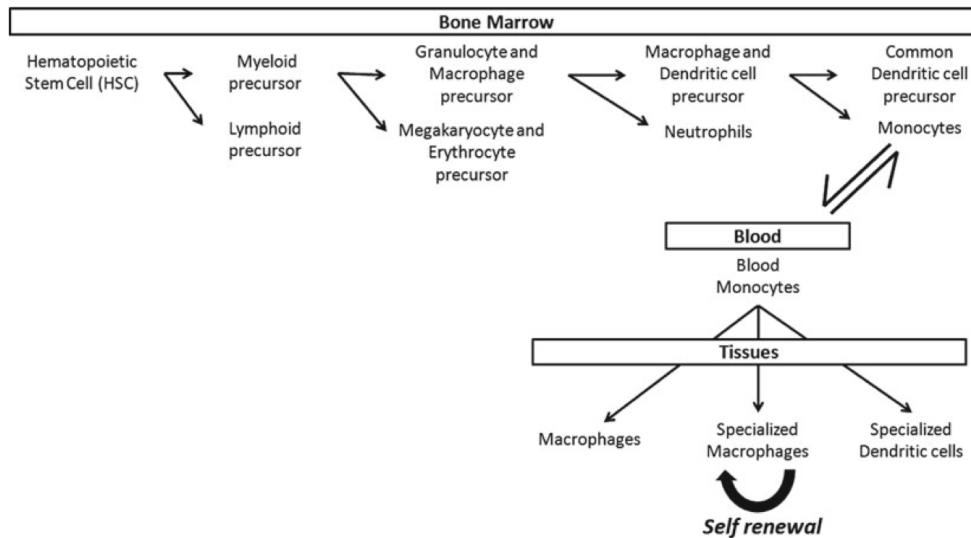


Figure I.1.1. Développement de la lignée myéloïde.

Le précurseur de l'ensemble des cellules myéloïdes est la cellule souche hématopoïétique, localisée dans la moelle osseuse. Elle se différencie tout d'abord en précurseur lymphoïde et en précurseur myéloïde. Ce dernier permet de donner le précurseur des mégacaryocytes et des érythrocytes, ainsi que le précurseur des granulocytes et des macrophages. Il s'agit donc de ce précurseur qui est à l'origine des neutrophiles, mais aussi à l'origine du précurseur des macrophages et cellules dendritiques. Enfin, ce dernier se différencie en précurseur de cellules dendritiques et en monocytes, qui migrent vers la circulation sanguine. Suite à un stimulus inflammatoire, les monocytes circulants seront recrutés dans les tissus.

Au fur et à mesure de la différenciation, les précurseurs perdent leur capacité d'auto-renouvellement et se spécialisent en un type de cellule myéloïde. Seuls les macrophages spécialisés ont conservé cette capacité d'auto-renouvellement, permettant ainsi de maintenir leur population au sein des tissus.

(Verschoor et al., 2012)

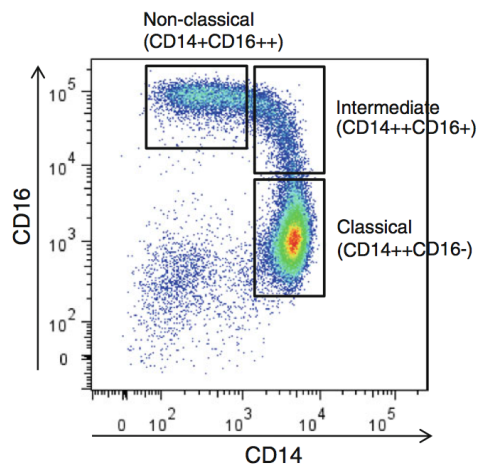


Figure I.1.2. Classification des monocytes humains.

Les monocytes sont classés suivant 3 catégories, en fonction de l'expression de CD14 et CD16 : les monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$), les monocytes intermédiaires ($CD14^{++}CD16^{+}$) et les monocytes non-classiques ($CD14^{+}CD16^{++}$).

(Wong et al., 2012)

I. INTRODUCTION

1. MACROPHAGES

1.1 Fonctions et polarisation

1.1.1 Origine et fonctions des macrophages

Les monocytes et les macrophages font partie des acteurs cellulaires clés dans l'initiation et le développement, voire dans la déstabilisation, des lésions athéroscléreuses (voir 2.1.2 Formation d'une plaque athéroscléreuse/Athérogenèse) (Galis et al., 1994; Kolodgie et al., 2001; Lafont, 2003; Newby, 2008).

En 1965, on pensait que les macrophages provenaient exclusivement des monocytes circulants, présents depuis au minimum 7 jours dans la circulation sanguine périphérique (Volkman and Gowans, 1965).

1.1.1.1 Monocytes : origine, hétérogénéité et rôles

Les monocytes circulants trouvent leur origine dans la moelle osseuse, à partir de cellules souches hématopoïétiques et plus particulièrement à partir d'un précurseur myéloïde commun se différenciant en un précurseur macrophage-granulocytaire, partagé avec les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) (Fig. I.1.1) (Verschoor et al., 2012).

De plus, Swirski et al. en 2009 ont montré, chez la souris, qu'il existerait un réservoir de monocytes, situé dans la pulpe rouge sous-capsulaire splénique. Les monocytes pourraient donc, en plus d'être recrutés à partir de la moelle osseuse, être recrutés à partir de la rate, en cas d'infections (Swirski et al., 2009).

Les monocytes sont mobilisés dans le sang via les récepteurs aux chémokines CCR2 et CX3CR1 (Combadiere et al., 2008). Ils représentent $\pm 10\%$ des leucocytes circulants chez l'homme et $\pm 5\%$ chez la souris (van Furth et al., 1979). En raison de leur temps de demi-vie court (3 jours chez l'homme, contre 1 jour chez la souris), ils sont actuellement considérés comme un réservoir de précurseurs myéloïdes permettant le maintien des populations de macrophages tissulaires et cellules dendritiques (Geissmann et al., 2003; Serbina and Pamer, 2006).

Les monocytes représentent un groupe de cellules hétérogènes, tant au niveau de leur taille, de leur granulosité ou de la morphologie de leur noyau (Gordon and Taylor, 2005; Passlick et al., 1989).

On peut les classer sur base de récepteurs spécifiques exprimés à leur surface, nommés différemment selon qu'il s'agisse de monocytes humains ou murins.

Dans le cas de l'**homme**, les monocytes sont classés en 3 catégories distinctes.

- Les monocytes CD14^{hi} CD16⁻ (CD64⁺) ou monocytes **classiques**/inflammatoires (1)
- Les monocytes CD14⁺ CD16⁺⁺ (CD64⁻) ou monocytes **non-classiques**/« résidents » (2)
- Les monocytes CD14⁺⁺ CD16⁺ CD64⁺, **classe intermédiaire** entre les monocytes et cellules dendritiques (3)

(Fig. I.1.2) (Gordon and Taylor, 2005; Passlick et al., 1989; Wong et al., 2012; Ziegler-Heitbrock et al., 1993).

A.

Monocytes humains					
Sous-type	% des GB	% des monocytes circulants	Temps de ½ vie	Marqueurs de surface	Fonctions principales
Classique CD14 ⁺ CD16 ⁻	± 10 %	± 85 %	1-2 jours	CD62L ⁺ , CD64 ⁺ , CCR2 ⁺⁺ , CCR5 ⁻ , CX3CR1 ⁻ , MHC-II ⁺ , CD163 ⁺	Phagocytose Effecteurs dans l'inflammation
Intermédiaire CD14 ⁺ CD16 ⁺		± 5 %	/	CD62L ⁻ , CD64 ⁺ , CCR2 ⁺ , CCR5 ⁺ , CX3CR1 ⁺ , MHC-II ⁺⁺ , CD163 ⁺	Phagocytose Effecteurs dans l'inflammation
Non classique CD14 ⁺ CD16 ⁺		± 10 %	/	CD62L ⁻ , CD64 ⁻ , CCR2 ⁻ , CCR5 ⁻ , CX3CR1 ⁺⁺ , MHC-II ⁺⁺ , CD163 ⁻	Surveillance « patrolling » Rôle antiviral

B.

Monocytes murins					
Sous-type	% des GB	% des monocytes circulants	Temps de ½ vie	Marqueurs de surface	Fonctions principales
Ly6C ⁺	± 5 %	± 60 %	18-20h	Gr-1 ⁺ , CD62L ⁺ , CD64 ⁺ , CCR2 ⁺ , CCR5 ⁻ , CX3CR1 ⁻ , MHC-II ⁻ , F4/80 ⁺	Phagocytose Effecteurs dans l'inflammation
Ly6C ⁻		± 40 %	5-7 jours	Gr-1 ⁻ , CD62L ⁻ , CD64 ⁺ , CCR2 ⁻ , CCR5 ⁻ , CX3CR1 ⁺ , MHC-II ⁻ , F4/80 ⁺	Surveillance « patrolling » Réparation tissulaire

Tableau I.1.1. Sous-types de monocytes humains (A) et murins (B) : récepteurs et rôles.

Adapté de (Hilgendorf and Swirski, 2012 et Italiani and Boraschi, 2014)

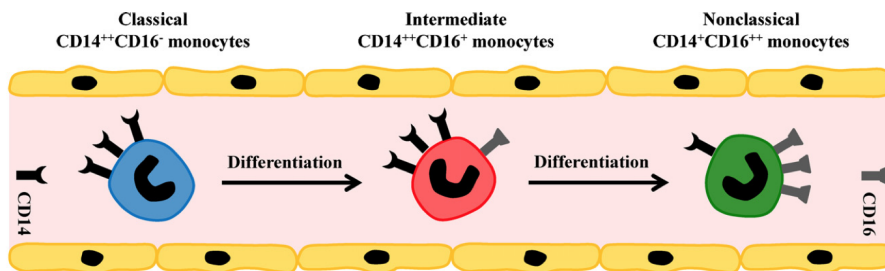


Figure I.1.3. Différenciation des monocytes humains.

Les monocytes non-classiques CD14⁺CD16⁺⁺ sont considérés comme le type de monocytes le plus mature, par rapport aux sous-types classique et intermédiaire. La longueur des télomères de ces monocytes est en effet plus courte et ils présentent plusieurs similarités avec les macrophages tissulaires. De plus, il a été montré qu'après transplantation de cellules souches hématopoïétiques chez des patients, la population de monocytes passe graduellement de monocytes classiques, à intermédiaires et enfin à non-classiques (Rogacev et al., 2015).

(Zawada et al., 2012)

En fonction de leur catégorie, ces monocytes expriment de façon différentielle plusieurs autres récepteurs, ce qui leur confère des rôles sensiblement différents (Tableau I.1.1 A). Les monocytes **classiques** (1) représentent 90 % de la population totale de monocytes circulants (Hilgendorf and Swirski, 2012; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Ils montrent une expression élevée de CCR2 (récepteur au MCP-1), CXCR1, CXCR2, CXCR4, CD62L, mais par contre, une expression faible de CX3CR1 et CCR5 (Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011). Par rapport aux deux autres types de monocytes, ce sont eux qui produisent le plus d'IL-10 (interleukine-10). Ils présenteraient un rôle pro-angiogénique de par la surexpression d'*ENG* (« engolin »), *TIE2/TEK* (codant pour la « TEK Tyrosine kinase » ou récepteur à l'angiopoïétine-1) et *KDR (VEGFR2)*. Ils interviendraient également dans la cicatrisation tissulaire et la coagulation (Fig. I.1.3) (Tallone et al., 2011; Wong et al., 2011; Zawada et al., 2012).

De plus, via une expression élevée de CD93, CD64, CD32, CD36, CD14, de la ficoline-1 et de SIRPA (« signal-regulatory protein- α »), leur activité phagocytaire est importante. Il en est de même pour l'activité de la MPO (myéloperoxydase).

Finalement, les monocytes CD14^{hi} joueraient un rôle dans les mécanismes de défense de l'immunité innée contre les pathogènes microbiens, via une expression élevée des gènes codant pour des protéines antimicrobiennes, tels que le gène encodant CD36 (Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011).

Les monocytes **non-classiques** (2), quant à eux, n'expriment pas CCR2 ni CD62L, tandis qu'ils surexpriment CX3CR1 (Tableau I.1.1 A). Ils jouent un rôle dans le « patrolling » et seraient donc impliqués dans la surveillance innée au sein des tissus (Tallone et al., 2011). Ils interviendraient également dans la surveillance au niveau de la barrière sang/endothélium, via leur capacité de roulement, afin de protéger l'organisme notamment contre les infections virales. Ce rôle pourrait être lié à une expression importante de gènes associés à la régulation du cytosquelette. C'est par exemple le cas de *RHOF* codant pour la RHO GTPase RHOF impliquée dans le réarrangement du cytosquelette, permettant ainsi la motilité cellulaire (Auffray et al., 2007; Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011). Par contre, ils auraient une capacité de phagocytose diminuée par rapport aux autres types de monocytes, à cause d'une expression réduite de *CD36* (Shantsila et al., 2011; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008; Tallone et al., 2011). La reconnaissance d'acides nucléiques ou de particules virales déclencherait la production d'IL-1 β et de TNF α (Cros et al., 2010). De plus, en conditions basales, il semblerait qu'ils ne produisent que peu ou pas de ROS (« reactive oxygen species ») et pas de MPO.

Ces monocytes sont considérés comme la forme la plus mature des 3 catégories. Leurs télomères seraient comparativement plus courts (Fig. I.1.3) (Merino et al., 2011).

Enfin les monocytes **intermédiaires** (3) expriment non seulement CCR1, mais aussi CCR2, CXCR2, CX3CR1 et CCR5 (Tableau I.1.1 A). Ce dernier récepteur est associé au recrutement des monocytes au sein des lésions et donc à la progression de l'athérosclérose (Pai et al., 2006; Rogacev et al., 2015; Zawada et al., 2011). En plus de ces récepteurs, ils surexpriment le récepteur « scavenger » CD36 (Tallone 2011), CD143 (« angiotensin-converting enzyme ») et TIE2 (récepteur de l'angiopoïétine) (Ulrich et al., 2006; Venneri et al., 2007).

Ils présenteraient un potentiel inflammatoire élevé : après une stimulation avec du LPS (lipopolysaccharide), ces monocytes produisent en quantité plus importante du TNF α et de l'IL-1 β . Ils produisent également des ROS en proportion plus importante par rapport

aux autres types de monocytes. Suite à une stimulation avec du LPS ou du zymosan, ils sont également capables de produire de l'IL-10 (Cros et al., 2010; Rossol et al., 2012; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008; Zawada et al., 2011).

En exprimant fortement le HLA-DR (« human leukocyte antigen-antigen D related »), un récepteur de surface cellulaire du MHC-II (« major histocompatibility complex-type II»), les monocytes intermédiaires interviennent aussi dans l'apprêtement de l'antigène (« antigen processing ») et dans la présentation des antigènes aux cellules T, induisant ainsi la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Cros et al., 2010).

En fonction de leur catégorie, les monocytes humains interviennent de façon différentielle dans le développement de l'athérosclérose. Il semblerait, en effet, que l'abondance de monocytes CD16⁺ **intermédiaires et non-classiques** soit corrélée avec une forte concentration de LDLs (« low-density lipoproteins »), triglycérides et cholestérol plasmatique total, mais aussi avec une faible concentration en HDLs (« high-density lipoproteins »). Un nombre élevé de ces monocytes pourrait être considéré comme un facteur de risque d'événements cardiovasculaires (Rogacev et al., 2014; Rothe et al., 1996; Rothe et al., 1999).

Selon plusieurs études, les monocytes **classiques** entretiendraient un environnement inflammatoire et fragiliseraient la cape fibreuse ce qui augmenterait le risque d'événements cardiovasculaires. Les monocytes **CD16⁺** auraient, eux, un effet plus marqué sur la taille de la plaque athéroscléreuse (Berg et al., 2012; Rogacev et al., 2012). Cependant, il existe peu de données permettant de différencier les effets des monocytes intermédiaires et non-classiques, tous deux CD16⁺. Il n'est pas exclu que leurs contributions respectives dans la progression de l'athérosclérose pourraient être différentes.

Chez la **souris**, les monocytes sont regroupés en 2 catégories :

- Les monocytes CCR2⁺ CD62L⁺ CX₃CR1^{low} Ly6C⁺, similaires aux monocytes humains CD14^{hi} CD16⁻ (1)
- Les monocytes CCR2⁻ CD62L⁻ CX₃CR1^{hi} Ly6C⁻, similaires aux monocytes humains CD14⁺ CD16⁺⁺ CD64⁺, mais aussi considérés comme des monocytes « résidents » (2)

(Geissmann et al., 2003; Gordon and Taylor, 2005) (Tableau I.1.1 B)

Ces deux classes de monocytes murins sont présents dans la circulation sanguine périphérique avec un ratio 6 : 4 (Ly6C^{hi} vs Ly6C^{low}, respectivement). En cas d'infection, le nombre de monocytes **Ly6C^{hi}** recrutés à partir de la moelle osseuse de façon dépendante de CCR2 augmente (Geissmann et al., 2003; Serbina and Pamer, 2006; Serbina et al., 2003). A l'inverse, leur mobilisation à partir de la rate se fait de manière indépendante de CCR2 (Tsou et al., 2007).

Cependant, en absence d'inflammation, il semblerait que les monocytes **Ly6C^{hi}** retournent au sein de la moelle osseuse et soient convertis en **Ly6C^{low}** avant d'entrer à nouveau dans la circulation périphérique (Geissmann et al., 2003; Sunderkotter et al., 2004).

Les monocytes murins de la catégorie (1) circulent, en conditions basales, dans le système vasculaire des organes, qu'ils soient lymphoïdes ou non. Ils sont impliqués dans la réponse inflammatoire liée à des infections par des micro-organismes, d'où leur appellation de **monocytes inflammatoires** (Randolph et al., 2008).

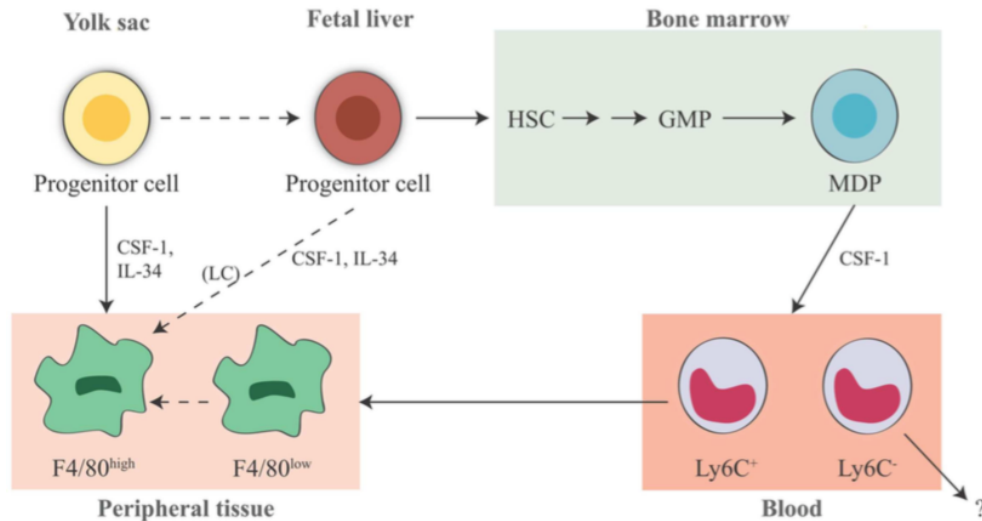


Figure I.1.4. Origine des macrophages.

Il peut y avoir trois origines aux macrophages.

Dans la vésicule vitelline, les cellules progénitrices (ou cellules souches hématopoïétiques) se différencient soit en macrophages des tissus périphériques (F4/80^{high}) via la présence de CSF-1 et d'IL-34 ou soit migrent vers le foie fœtal. Au sein du foie fœtal, les cellules progénitrices, en présence de CSF-1 et d'IL-34, se différencient en macrophages des tissus périphériques (F4/80^{high}) ou bien migrent vers la moelle osseuse et se différencient en HSC (« haematopoietic stem cells »), en GMP (« granulocyte-macrophage progenitor » puis en MDP (« macrophage and dendritic cell precursor »), pour enfin, en présence de CSF-1, se différencier en monocytes Ly6C⁺ ou Ly6C⁻ (cas de la souris). Ces monocytes, présents dans la circulation sanguine, peuvent, en fonction des stimuli, migrer vers les tissus périphériques, où ils se différencient en macrophages. Les macrophages issus directement de la vésicule vitelline expriment fortement F4/80 et sont présents dans le cerveau, la peau, le foie, le pancréas et la rate. Les macrophages présents dans les reins et les poumons ont, eux, deux origines puisqu'ils dérivent à la fois de la vésicule vitelline (F4/80^{hi}) et de la moelle osseuse (F4/80^{low}).

(Italiani and Boraschi, 2014)

Les monocytes murins de la catégorie (2) circulent dans la circulation sanguine. Il a été montré qu'ils seraient capables d'extravasation en cas d'infection avec *Listeria monocytogenes* et ils présenteraient des propriétés dites « M2-like » (voir 1.1.2 Polarisation des macrophages) (Auffray et al., 2007).

Dans le cas de l'athérosclérose, il semblerait que les monocytes Ly6C^{hi} migrent de façon préférentielle dans la paroi des artères enclines à développer des lésions et s'y différencient en macrophages. Ce processus serait dépendant des récepteurs aux chémokines CX3CR1, CCR2 et CCR5 (Swirski et al., 2007; Tacke et al., 2007). Les monocytes Ly6C^{low} nécessiteraient également CCR2 pour leur migration dans la paroi aortique. Il n'est pas exclu que d'autres chémokines, encore non identifiées, puissent être impliquées dans le recrutement et la différenciation des monocytes en macrophages dans la paroi artérielle (Tacke et al., 2007).

A l'heure actuelle, la façon dont l'hyperlipidémie influencerait la maturation et les fonctions des monocytes n'est pas encore bien comprise.

1.1.1.2 Macrophages : origine, hétérogénéité et fonctions

Les macrophages furent découverts par Ilya Metchnikoff à la fin du 19^e siècle (1892) (Metchnikoff and (eds. Gourko, 2000)).

Le consensus longtemps établi était que les macrophages trouvaient leur origine dans le précurseur macrophage-granulocytaire présent dans la moelle osseuse (Fig. I.1.1). Cependant, il a été montré que les macrophages présents dans les tissus adultes dérivent de trois sources: la vésicule vitelline, le foie fœtal et la moelle osseuse (Figs. I.1.4, I.1.5 et I.1.6) (Cumano and Godin, 2007; Epelman et al., 2014a; Geissmann et al., 2010; Ginhoux et al., 2010; Orkin and Zon, 2008; Tavian and Peault, 2005; Yona et al., 2013).

En effet, pendant l'hématopoïèse dite « primitive » (jour 6 et demi du stade embryonnaire chez la souris), ayant lieu dans l'ectoderme de la vésicule vitelline, apparaissent des macrophages résidents dans les tissus, directement issus d'une cellule progénitrice, sans passer par un progéniteur monocyttaire. Au jour 10 et demi, l'hématopoïèse est dite « définitive » : les cellules souches hématopoïétiques migrent vers le foie fœtal, devenant l'organe hématopoïétique principal pendant le restant du développement de l'embryon. Chez l'adulte, on retrouve dans divers tissus des macrophages dérivés de ces progéniteurs, qu'ils dérivent de la vésicule vitelline ou du foie fœtal. Par exemple, les cellules de Langerhans de la peau adulte auraient une origine mixte (vésicule vitelline et foie fœtal).

Après la naissance, l'hématopoïèse a lieu principalement dans la moelle osseuse, générant ainsi les monocytes circulants (ex. : monocytes Ly6C⁺ et Ly6C⁻ chez la souris), se différenciant ensuite dans les tissus en macrophages (Geissmann et al., 2010), mais générant aussi les autres cellules du système immunitaire (Orkin and Zon, 2008; Rieger and Schroeder, 2012; Takahashi and Naito, 1993).

Seuls les macrophages résidents du système intestinal font exception : ils dérivent tous des monocytes circulants (Bain et al., 2013).

Ces observations faites d'abord chez la souris, ont été confirmées chez l'homme qui présente d'ailleurs une organisation du système hématopoïétique embryonnaire/fœtal assez similaire (Cumano and Godin, 2007; Geissmann et al., 2010; Orkin and Zon, 2008; Tavian and Peault, 2005).

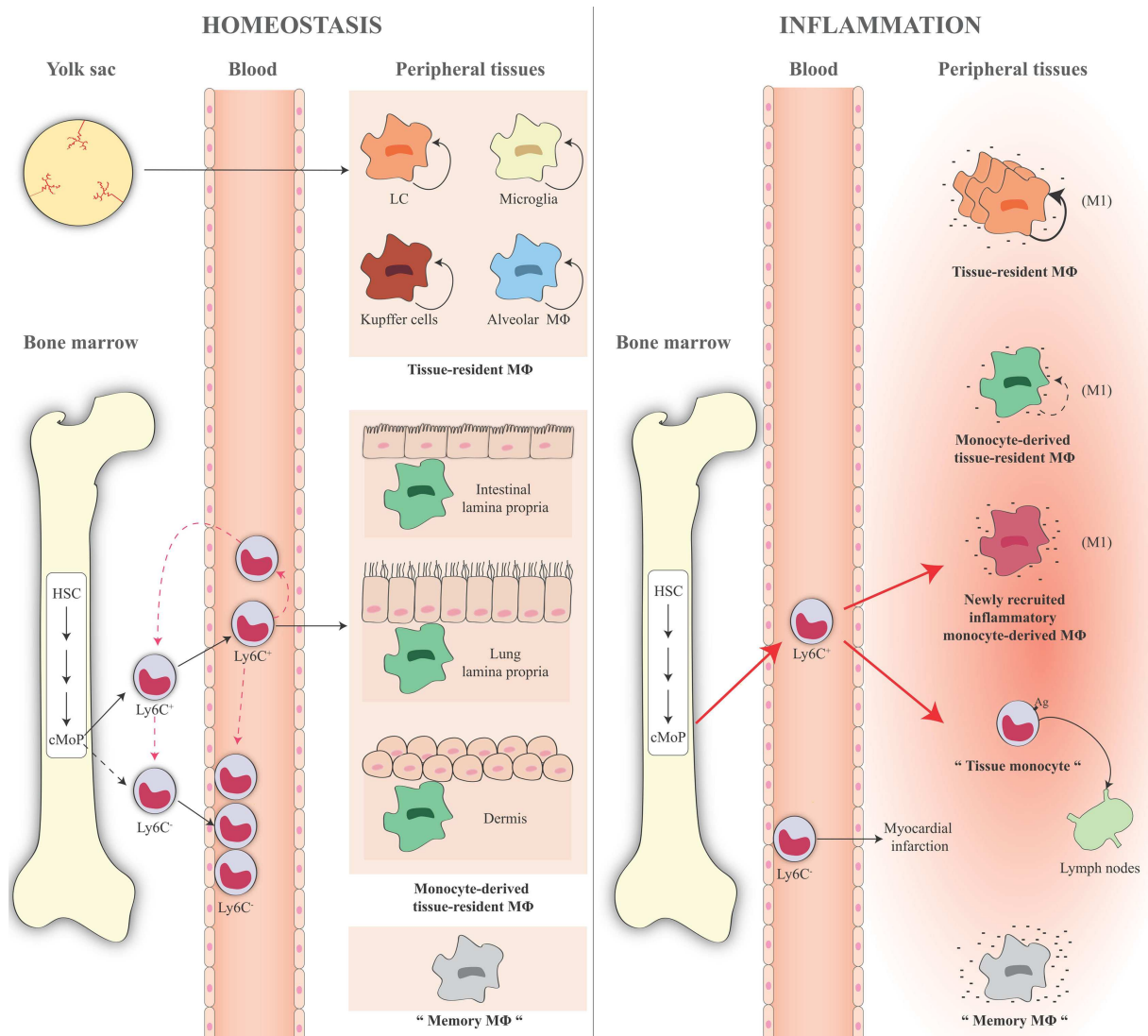


Figure I.1.5. Origine des macrophages

En conditions basales, les monocytes $Ly6C^+$ proviennent de la moelle osseuse et circulent dans le sang pour se différencier ensuite en macrophages dans les tissus tels que l'intestin, les poumons et le derme. D'autres macrophages proviennent directement de la vésicule vitelline, comme par exemple, les cellules de Kupffer, la microglie, les macrophages alvéolaires et les cellules de Langerhans. Ces macrophages persistent dans les tissus via leur capacité d'auto-prolifération.

Il existe également des macrophages « mémoires », présents à l'état basal dans le tissu et capables d'une réaction plus rapide face à un stimulus inflammatoire.

Une partie des monocytes $Ly6C^+$ devient des monocytes $Ly6C^-$, qui soit retournent dans la moelle osseuse en absence d'inflammation, soit circulent dans le sang, à la surface des cellules endothéliales.

En cas d'inflammation, le nombre de monocytes $Ly6C^+$ augmente au sein des tissus enflammés. Ces monocytes migrent soit vers les ganglions lymphatiques après reconnaissance d'un antigène, soit se différencient en macrophages inflammatoires suite à la présence de stimuli inflammatoires (DAMPs « Danger/Damage-associated molecular patterns », signaux de danger ou de dommages tissulaires ou PAMPs « Pathogen-associated molecular patterns », signaux provenant d'un pathogène). De plus, suite à la perte de macrophages à cause de la réaction inflammatoire, les macrophages résidents tissulaires augmentent leur capacité d'auto-prolifération.

(Italiani and Boraschi, 2014)

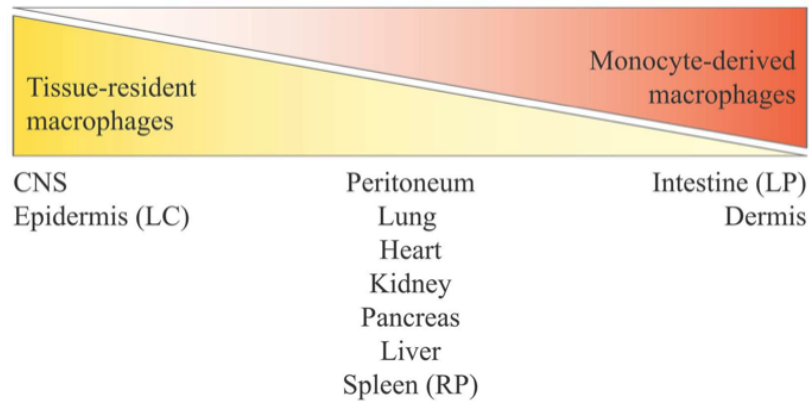


Figure I.1.6. Macrophages d'origine embryonnaire ou monocyttaire : distribution tissulaire.

Les macrophages dits « résidents » sont les macrophages issus de la vésicule vitelline de l'embryon.

La moelle osseuse est considérée comme le site d'hématopoïèse principal à l'âge adulte. L'hématopoïèse au sein de la moelle osseuse serait dérivée de celle dans le foie fœtal, au stade embryonnaire. Les macrophages dits « dérivés des monocytes » représentent donc à la fois les macrophages trouvant leur origine dans la moelle osseuse et dans le foie fœtal.

Les tissus présents au centre du schéma seraient les tissus dans lesquels les macrophages trouveraient leur origine à la fois à partir des monocytes et de macrophages résidents dans les tissus dérivés de la vésicule vitelline.

(Italiani and Boraschi, 2014)

En **conditions normales**, la population de macrophages spécialisés tissulaires résidents est maintenue grâce à une prolifération locale et non pas via un recrutement de nouveaux monocytes. C'est le cas des macrophages alvéolaires (poumons), des macrophages spléniques et plus précisément les macrophages situés dans la pulpe rouge, des macrophages métalophiles (zone marginale de la rate), des cellules de Kupffer (foie) et de la microglie (cerveau) (Crofton et al., 1978; Landsman et al., 2007; Mildner et al., 2007; Sawyer et al., 1982; Wijffels et al., 1994). Cette prolifération est dépendante des facteurs de croissance tels que le GM-CSF, M-CSF, les cytokines IL-4, IL-13 et IL-6 (Fig. I.1.5) (Jenkins et al., 2013; Sieweke and Allen, 2013). On peut aussi trouver quelques macrophages dérivés de monocytes circulants. En conditions homéostatiques, on trouve donc des macrophages résidents d'origines différentes comme illustré dans la figure I.1.5 et ce de manière variable selon les tissus (Italiani and Boraschi, 2014). Par exemple, les macrophages alvéolaires et les cellules de Kupffer du foie seraient bien dérivés de la vésicule vitelline et se maintiennent par auto-renouvellement.

En cas d'inflammation, suite à un signal chémotactique ou en réponse à des cytokines (tels l'IFN γ ou le TNF α), libérées suite à une blessure ou à une infection, les monocytes quittent la circulation sanguine et migrent vers le tissu où ils se différencient en macrophages (Baldrige et al., 2011). Dans le cas des souris, ce sont les monocytes Ly6C^{low} et non pas les Ly6C^{hi} qui se différencient en macrophages après diapédèse à partir de la circulation sanguine (Landsman et al., 2007).

Cette différenciation a lieu en présence notamment de CSFs (« Colony-Stimulating Factors »), c'est-à-dire le M-CSF (« macrophage-CSF » ou CSF-1) et le GM-CSF (« granulocyte/macrophage-CSF »), facteurs de croissance hématopoïétiques (Burgess and Metcalf, 1980). Ils reconnaissent différents récepteurs (CSF-R) distribués de façon différentielle en fonction des cellules myéloïdes (dont les monocytes). Ces différents facteurs de croissance ont la capacité de promouvoir la survie ou prolifération des macrophages, ainsi que leur différenciation et activation (Chitu and Stanley, 2006; Fleetwood et al., 2005).

Le M-CSF est produit de façon ubiquitaire par plusieurs tissus, permettant de contrôler le nombre de macrophages au sein de ces tissus (Stanley et al., 1997; Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). *In vitro*, il est possible de différencier des monocytes circulants humains après incubation avec du M-CSF. Ils deviennent alors des macrophages dérivés de monocytes ou « MDMs » (Akagawa, 2002; Martinez et al., 2006; Way et al., 2009).

Au contraire, le GM-CSF est, lui, détecté à des taux faibles dans la circulation sanguine. En cas d'inflammation ou en réponse à un stimulus antigénique, sa concentration augmente (Metcalf and Nicola, 1995). *In vitro*, lorsque des monocytes circulants sont incubés avec du GM-CSF, ils se différencient en cellules dendritiques inflammatoires ou dites « dérivées de monocytes » (Akagawa, 2002; Martinez et al., 2006; Naik et al., 2006; Way et al., 2009).

En cas d'inflammation, les macrophages tissulaires résidents prolifèrent aussi et se différencient en macrophages inflammatoires (Fig. I.1.5, côté droit) (Italiani and Boraschi, 2014).

De manière générale, les macrophages exercent différentes fonctions dont la plus importante est le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ils agissent à différents niveaux, notamment en éliminant les cellules sénescents, les débris apoptotiques et nécrotiques, en remodelant et réparant le tissu après une blessure, un choc physique ou une

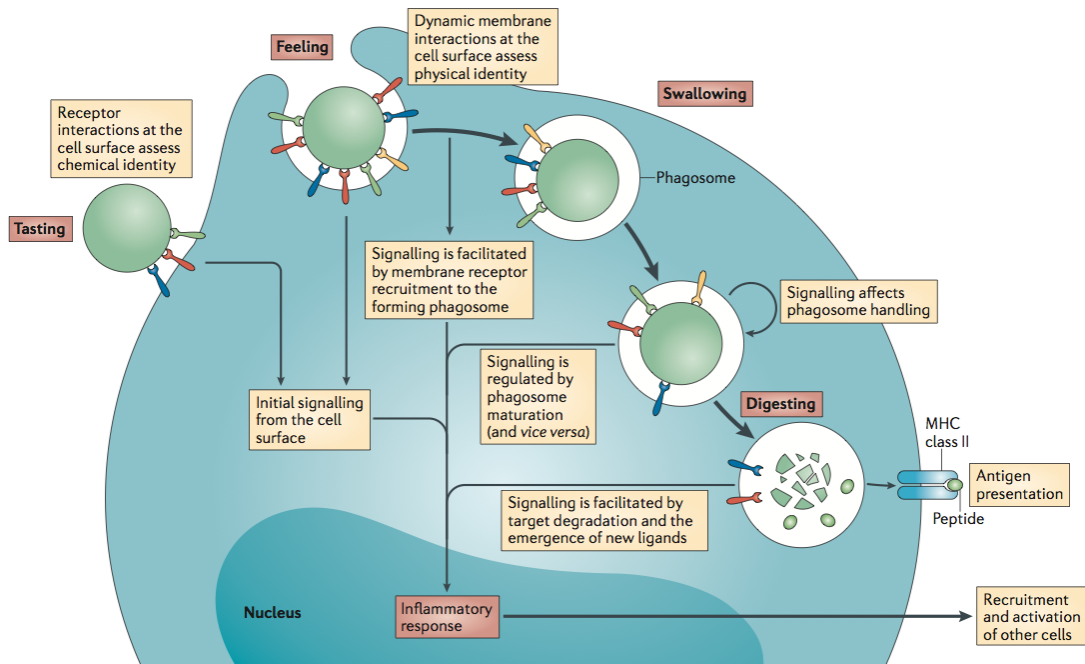


Figure I.1.7. Représentation des 4 fonctions innées assurées par le macrophage.

Après reconnaissance de la particule à phagocyter (ex. : via leurs PRRs) (étape de « sensing » ou « tasting »), le macrophage sécrète des chémokines induisant le recrutement et l'activation de cellules effectrices telles que les lymphocytes Th1 ou des cellules Natural Killer T, par exemple. Il s'agit de l'étape de chimiotaxie.

Suite à l'interaction récepteur-ligand entre le macrophage et la particule, l'adhérence du macrophage vis-à-vis de la particule augmente et la membrane cellulaire se prolonge, permettant la formation du phagosome. Cette étape est la phagocytose.

Le phagosome fusionne ensuite avec un lysosome, formant un phagolysosome. Ce dernier contient des molécules réactives toxiques et présente un pH acide, permettant de détruire la particule à des fins de recyclage, mais aussi de présentation des antigènes aux cellules T dans le cadre de la réponse immunitaire adaptative (étape de stimulation adaptative).

(Underhill and Goodridge, 2012)

PRRs	PAMPs	Signaling pathway activated
TLRs¹		
TLR1-TLR2	Triacylated lipopeptide	MyD88-dependent activation of NF-κB
TLR2-TLR6	Diacetylated lipopeptide	MyD88-dependent activation of NF-κB
TLR4	LPS	MyD88-dependent activation of NF-κB and TRIF-dependent activation of NF-κB and IRF3
TLR3	Poly(I:C)	TRIF-dependent activation of NF-κB and IRF3
TLR7	ssRNA	MyD88-dependent activation of NF-κB and IRFs
TLR9	CpG-DNA	MyD88-dependent activation of NF-κB and IRFs
RRLs²¹		
RIG-I	Paramyxoviridae, short blunt dsRNA bearing a 5' triphosphate (<50 bp), ²⁴ and short poly(I:C) (<300 bp) ²³	IPS-1-dependent activation of NF-κB and IRFs and inflammasome activation
MDA5	Picornaviridae, long dsRNA, and long poly(I:C) ²³	IPS-1-dependent activation of NF-κB and IRFs
LGP2	?	Positively regulating RLR signaling
NLRs^{1, 25}		
NOD2	Muramyl dipeptide	RIP2-dependent activation of NF-κB
NALP3	Uric acid crystal, silica, asbestos, hemozoin, zymosan, <i>C. albicans</i> , influenza virus, <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i>	Inflammasome activation
IPAF	Flagellin, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Shigella flexneri</i>	Inflammasome activation
AIM2	dsDNA	Inflammasome activation
CLRs³⁰		
Mincle	SAP130 nuclear protein, ²⁶ <i>Malassezia</i> species, ²⁸ trehalose dimycolate ²⁹	Syk-dependent signaling
Clec9a/DNGR-1	Necrotic cells ²⁷	Syk-dependent signaling

Tableau I.1.2. Classification des PRRs et des PAMPs associés.

(Kumagai and Akira, 2010)

infection, ainsi qu'en initiant et résolvant une réponse inflammatoire (Gilroy et al., 2004; Gordon, 2007; Lawrence et al., 2002). Quelle que soit leur origine, les macrophages sont considérés comme des cellules effectrices innées puisqu'ils ne nécessitent pas une pré-exposition à un antigène particulier pour initier une réponse. Ces différents rôles sont assurés via 4 fonctions innées : « le sensing », la chémotaxie, la phagocytose et la stimulation adaptative (Fig. I.1.7).

- Les macrophages possèdent une capacité de « **sensing** » de leur microenvironnement via la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques, comme, par exemple, les **PAMPs** (« Pathogen-associated molecular patterns »), motifs moléculaires de matériels exogènes. Les PAMPs sont reconnus par des PRRs (« Pattern Recognition Receptors »), exprimés en surface membranaire ou en intracellulaire (Tableau I.1.2). Les PRRs sont regroupés en 4 classes distinctes : les TLRs (« Toll-like receptors »), les RLRs (« RIG-I-like receptors »), les NLRs (« Nod-like receptors ») et les CLRs (« C-type lectin receptors »).

Les **TLRs** sont capables de reconnaître des composants de la paroi cellulaire bactérienne (ex. : le TLR2 et le TLR4 reconnaissent l'acide lipotéichoïque (LTA) et le LPS, respectivement). Ils sont exprimés en membrane cellulaire, avec un domaine extracellulaire leur permettant de reconnaître les bactéries présentes à l'extérieur des cellules. Certains TLRs (dont les TLR3, TLR7 et TLR9 notamment) sont exprimés dans les endosomes et reconnaissent les acides nucléiques de virus et bactéries (Kumagai and Akira, 2010). La reconnaissance d'un PAMP par un TLR induit la transcription de gènes pro-inflammatoires (ex. : IL-6, IL-1 TNF α), via les facteurs de transcription tels que NF κ B, AP1 (« adapter protein-1 ») ou IRF (« Interferon Regulatory Factor ») (Benoit et al., 2008; Martinez et al., 2009; Trinchieri and Sher, 2007).

Les **RLRs** sont des récepteurs intracellulaires reconnaissant l'ARN de virus se répliquant dans la cellule. Après liaison, le signal est transmis via IPS-1 (« IFN promoter stimulator-1 »), une protéine adaptatrice, pour induire la production d'interféron de type 1 et des réponses antivirales (Kawai and Akira, 2006; Kumagai and Akira, 2010).

Les **NLRs**, tels que NOD1 et NOD2 (« Nucleotide binding-oligomerization domain-containing protein »), sont des senseurs cytoplasmiques de PAMPs provenant de la paroi bactérienne, mais aussi de virus comme c'est le cas pour NOD2 reconnaissant le virus syncytial respiratoire (Akira et al., 2006; Kumagai and Akira, 2010; Sabbah et al., 2009). D'autres NLRs, tels que NALP1 (« NACHT, LRR and PYR domains-containing protein-1 »), NALP3, NAIP5 (« NLR family, apoptosis inhibitory protein-5 ») et IPAF (« ICE-protease-activating factor »), sont des composants de l'inflammasome, un complexe moléculaire regroupant un ou plusieurs NLRs ainsi que la caspase-1. Celle-ci est activée dans le complexe et clive des substrats comme la pro-IL-1 β en sa forme mature. L'inflammasome peut être activé par des composants bactériens et viraux ainsi que des acides nucléiques ou des cristaux d'acide urique ou de silice (Kumagai and Akira, 2010; Martinon et al., 2009; Martinon et al., 2006).

Enfin, les **CLRs** sont des récepteurs de ligands endogènes provenant de cellules endommagées ou nécrotiques (Kumagai and Akira, 2010; Yamasaki et al., 2008). De plus, des CLRs comme la dectine-1 ou MRC1, sont capables de

DAMP	Mode of emission	Cognate receptor	Reference (no.)
Adenosine triphosphate (ATP)	Mostly passively released; sometimes actively secreted	P2Y2; P2X7; (indirectly: NLRP3)	(9,113–122)
Biglycan (BGN)	Extracellular matrix	TLR2, TLR4, P2X4, P2X7	(123–125)
Calreticulin (CALR)	Mostly surface exposed; sometimes passively released	CD91	(117,126–131)
Fibrinogen	Extracellular matrix	TLR4	(124,132)
Fibronectin extra domain A	Extracellular matrix	TLR4?	(124,133)
Heat shock proteins HSP70/72, HSP90, HSP60	Surface exposed; actively secreted; passively released	TLR2, TLR4, CD91, SREC-1, FEEL-1	(9,10,134–142)
Heparan sulfate fragments	Extracellular matrix	TLR4	(124,143)
High-mobility group box 1 (HMGB1)	Mostly passively released; sometimes actively secreted	TLR2, TLR4, RAGE, TIM3	(9,141,144–150)
Hyaluronan fragments (fHA)	Extracellular matrix	TLR2, TLR4, NLRP3?	(9,124,142,151–156)
MHC class I chain-related proteins (MICs)	Surface exposed	NKG2D	(9,157–165)
Monosodium urate (MSU) or uric acid	Passively released	Purinergic receptors (indirect: NLRP3)	(5,113,122,166–170)
Nonmuscle myosin II-A heavy chain (NMHC-II)	Surface exposed	Pre-existing natural IgM antibodies	(9,171,172)
Nucleic acids (RNA, cytDNA, mtDNA)	Passively released (e.g. from nucleus, mitochondria, cytosol)	TLR3, TLR7, TLR9, RIG-I, AIM2, cGAS,	(30,141,142,173–191)
Oxidation-specific molecules/epitopes	Passively released	CD36, SR-A, TLR2/4, CD14, natural IgM antibodies	(192–197)
S100 proteins (e.g. S100 A1/8/9/12)	Passively released	RAGE, TLR4	(142,167,198–203)
Tenascin	Extracellular matrix	TLR4	(204,205)
UL16 binding proteins (ULBPs)	Surface exposed	NKG2D	(206–208)
Histone	Passively released (from nucleus)	TLR9	(209)

Tableau I.1.3. Liste des DAMPs les plus importants, associés à une mort ou un stress cellulaire et/ou à une blessure tissulaire.
(Land et al., 2016)

reconnaître des motifs β -glucan ou de polysaccharides de mannose et fucose au niveau de champignons ou de certaines bactéries, inhibant ainsi la production de cytokines telles que l'IL-12 et/ou le TNF α , et induisant la sécrétion d'IL-10, contribuant ainsi à une réponse plutôt anti-inflammatoire (Brown and Gordon, 2001; Knutson et al., 1998; Taylor et al., 2005b).

Les PPRs sont également capables de reconnaître des **DAMPs** (« Danger- ou Damage-associated molecular patterns »), molécules endogènes libérées en condition de stress cellulaire ou de blessure tissulaire (Tableau I.1.3). Ces DAMPs sont soit exposés en surface de la membrane plasmique des cellules stressées, soit sécrétés activement par les cellules stressées ou par des cellules en début d'apoptose, soit libérés passivement dans l'environnement extracellulaire par des cellules dont la membrane est altérée, soit libérés à partir de la matrice extracellulaire endommagée (Bianchi, 2007; Land, 2012; Land et al., 2016; Rubartelli and Lotze, 2007). Il est également possible que ces DAMPs ne proviennent pas toujours de cellules en condition de mort cellulaire, mais aussi de tissus ou cellules dont l'homéostasie est perturbée (Gallo and Gallucci, 2013; Land et al., 2016) (Tableau I.1.3).

Les DAMPs peuvent également être reconnus par des récepteurs dits « non classiques » tels que certains récepteurs purinergiques (ex. : P2X₇) liant par exemple l'ATP extracellulaire ou l'acide urique, mais aussi par des récepteurs « scavenger » (ex. : CD36) ou par les TLRs, tels que le TLR4, liant des ligands endogènes comme les Ox-LDLs. Les récepteurs « scavenger » sont également capables de reconnaître des ligands exogènes comme des constituants de la paroi cellulaire bactérienne (Bottcher et al., 2006; Chen et al., 2011b; Di Virgilio and Vuerich, 2015; Land et al., 2016; Martinez et al., 2009). Enfin, il existe également des récepteurs Fc (ex. : Fc γ ou Fc ϵ) interagissant avec des composants du complément ou des anticorps circulants, qui eux-mêmes reconnaissent des antigènes étrangers (Varin and Gordon, 2009).

- Afin d'aider à l'élimination du pathogène ou de la particule endogène, les macrophages sécrètent des chémokines, permettant le recrutement de cellules effectrices spécifiques. Il s'agit de la **chémotaxie**. Dans le cas d'une réponse pro-inflammatoire, les macrophages activés de manière classique (voir 1.1.2.1.1 Macrophages M1) sécrètent différentes chémokines telles que CCL3/4/5, CXCL8/9/10/11, induisant le recrutement de lymphocytes de type Th1, de neutrophiles, de monocytes et macrophages ou de cellules « Natural Killer » (NK) (Benoit et al., 2008; Mantovani et al., 2004). Lors d'une réponse anti-inflammatoire, les macrophages dits « M2 » sécrètent CCL17/22 ou CCL24, permettant la migration de lymphocytes de type Th2 et de cellules NK ou d'éosinophiles et basophiles, respectivement (voir 1.1.2 Polarisation des macrophages).
- Ensuite, les macrophages sont amenés à éliminer les particules étrangères, cellules endommagées et débris apoptotiques ou nécrotiques via la **phagocytose**, permettant d'assurer leur rôle dans l'homéostasie du tissu. Toute cellule mammalienne est capable d'internaliser des particules et des macromolécules via, par exemple, le mécanisme de pinocytose (Doherty and McMahon, 2009). Les macrophages, eux, sont considérés comme cellules

professionnelles de la phagocytose, internalisant des particules d'un diamètre de plus de 0,5 μm .

Déjà au stade embryonnaire, les macrophages phagocytent les cellules mortes de façon programmée, jouant ainsi un rôle dans l'organogenèse générale et la vasculogenèse (Pollard, 2009).

Le mécanisme précis par lequel la phagocytose a lieu varie en fonction du type de particule, de sa taille, mais aussi de son aptitude à contourner ou pas ce processus de défense de l'hôte. Par exemple, c'est le cas de *Brucella abortus*, qui est capable d'échapper à la phagocytose en se répliquant dans une niche associée au réticulum endoplasmique, puis en activant une voie modifiée de l'autophagie afin de favoriser sa persistance et propagation dans les cellules (Aderem and Underhill, 1999; Kim et al., 2016; Underhill and Ozinsky, 2002; Xavier et al., 2013).

De manière générale, l'interaction récepteur-ligand induit « l'activation » de la cellule phagocytaire, qui augmente sa capacité d'adhérence vis-à-vis de la particule à phagocyter. Ce contact induit également la diffusion latérale membranaire et le regroupement (« clustering ») des récepteurs de la phagocytose (Jaqaman et al., 2011; Jaumouille et al., 2014; Wong et al., 2016), initiant l'activation des cascades de signalisation menant à l'extension des pseudopodes, ou extensions membranaires, qui encerclent la particule (voir Fig. I.1.7). Cette étape est suivie d'une fusion des extensions membranaires afin de former le phagosome, via le recrutement et l'action concertée de plusieurs protéines, dont les protéines contenant un domaine BAR (« Bin-amphiphysin-Rvs »), la dynamine-2, l'actine et la myosine (pour une revue, (Levin et al., 2016)).

Une fois le phagosome formé et détaché de la membrane plasmique, il subit une série de transformations de son contenu membranaire et luminal, c'est l'étape de maturation. Il fusionne tout d'abord avec des endosomes précoces et acquiert ainsi la GTPase RAB5 active (Roberts et al., 2000; Vieira et al., 2003; Wink et al., 2011). Le phagosome précoce fusionne ensuite avec des endosomes tardifs, le transformant en phagosome tardif, caractérisé par l'acquisition de la GTPase RAB7 active et un pH luminal plus acide dû à l'acquisition de pompes à protons de type V-ATPase. Enfin, le phagosome tardif fusionne avec les lysosomes, devenant ainsi un phagolysosome. C'est au cours de cette étape que le phagosome acquiert la majorité de ses propriétés et constituants nécessaires pour la dégradation de la cible (Levin et al., 2016). Il s'enrichit également en LAMP-1 et 2 (« lysosome-associated membrane proteins »), indispensables pour les étapes de maturation tardives et la dégradation des microorganismes (Binker et al., 2007; Huynh et al., 2007). Le phagolysosome présente un pH très acide de 4,5 à 5 et contient plusieurs enzymes de lyse et des ROS, grâce à l'action de NOX-2, membre de la famille des NADPH oxydases (Levin et al., 2016; Wink et al., 2011). Ces propriétés acquises par le phagolysosome lui permettent d'atteindre l'étape de résolution, dans laquelle les composants de la particule phagocytée sont dégradés par des enzymes hydrolytiques (DNase de type II pour les acides nucléiques, protéases, lipases, lipase acide lysosomale pour la dé-estérification du cholestérol estérifié), puis recyclés ou préparés pour la réponse adaptative (voir ci-dessous) (Aderem and Underhill, 1999; Elhelu, 1983; Freeman and Grinstein, 2014; Underhill and Goodridge, 2012).

Receptors	Ligands	References
Opsonic receptors		
Fc receptors		
FcγRI (CD64) [†]	High affinity IgG1 = IgG3 >IgG4*	(27, 208)
FcγRIIIa (CD32a)	Low to medium affinity IgG1 >IgG2, IgG3, IgG4*	(27, 208)
FcγRIIIc (CD32c)	Low-affinity IgG1, IgG3, IgG4*	(27, 208)
FcγRIIIa (CD16a)	High affinity IgG3, low to medium affinity IgG1 >IgG4*	(27, 208)
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2	(209)
FcεRI	IgE	(210)
CRI (CD35)	C1q, C4b, C3b, mannan-binding lectin	(211)
Integrins		
CR3 (αMβ2, CD11b/CD18, Mac-1)	iC3b, Factor X, factor H, t-PA, fibrinogen, kininogen, fibronectin, collagens, elastase, plasminogen, ICAM, GP1b, denatured proteins	(212, 213)
CR4 (αXβ2, CD11c/CD18, gp150/95)	iC3b, fibrinogen, ICAM, denatured proteins	(46, 212, 214–216)
α5β1 (VLA-5)	Fibronectin, osteopontin	(46)
Pattern-recognition receptors		
Dectin-1 (CLEC7A) [‡]	β1,3-glucans	(217)
CD14	Lipopolysaccharide-binding protein	(218)
Mannose receptor (CD206)	Mannan	(219)
BAI1	Lipopolysaccharide	(220)
Scavenger receptors		
CD36 [§]	<i>Plasmodium falciparum</i> -infected erythrocytes	(221)
MARCO	Bacteria	(222)
Scavenger receptor A (CD204)	Lipopolysaccharide, lipoteichoic acid	(223, 224)
Apoptotic corpse receptors		
PS receptors		
TIM-4	Phosphatidylserine	(110, 111)
BAI1	Phosphatidylserine	(225)
Stabilin-2	Phosphatidylserine	(226)
CD300f	Phosphatidylserine	(227)
TAM receptors	Gas6, protein S	(228, 229)
LRP1 (CD91)	C1q/calreticulin	(230)
Integrins		
αVβ3	MFG-E8, Del-1, vitronectin, vWF, PECAM-1, tenascin, BSP, osteopontin, thrombospondin, LAP-TGFβ, fibrinogen	(46, 49, 51)
αVβ5	MFG-E8, Del-1, vitronectin, osteopontin, BSP	(46, 51, 231)
Scavenger receptors		
CD36	Oxidized lipids including PS and PC	(232)
SCARF-1	C1q opsonized PS	(233)

*Affinity descriptions are for IgGs in immune complexes. Monomeric IgG1 and IgG4 only bind FcγRI and monomeric IgG3 binds FcγRI and FcγRIIIA.

[†]Expressed four- to fivefold higher in M1 versus M2 macrophages.

[‡]Expressed 20-fold higher in M2 versus M1 macrophages.

[§]Expressed >30-fold higher in M2 versus M1 macrophages.

Tableau I.1.4. Exemples de récepteurs et ligands humains impliqués dans la phagocytose. (Freeman and Grinstein, 2014)

En ce qui concerne le recyclage de la membrane phagosomale, déjà pendant les étapes précoces et intermédiaires de la maturation, des composants de la membrane sont recyclés en membrane plasmique, transportés vers le réseau trans-golgien ou bourgeonnent en vésicules intraluminales pour être dégradés par la suite. Le sort de la membrane du phagosome mature est encore aujourd'hui peu étudié (Levin et al., 2016).

Par conséquent, le processus de phagocytose nécessite l'expression d'environ une centaine de gènes (Tableau I.1.4) (Freeman and Grinstein, 2014; Hume et al., 2010).

Il est intéressant de noter que l'internalisation des cibles sera différente en fonction du phénotype du macrophage. Ce point sera abordé au paragraphe 1.1.2 Polarisation des macrophages (Guilliams et al., 2014; Lefevre et al., 2013).

- Enfin, les macrophages possèdent également une capacité dite de « **stimulation adaptative** ». En effet, après internalisation du matériel étranger, ils le détruisent et génèrent des séquences peptidiques antigéniques afin de les présenter aux lymphocytes T via les récepteurs MHC-II (Fig. I.1.8). Ceci permet l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative (Jensen, 2007).

En plus de ces rôles, les macrophages interviennent également dans le métabolisme et le recyclage du groupement hème et du fer après internalisation des érythrocytes, via l'expression de CD163, récepteur à l'haptoglobine-hémoglobine (Kristiansen et al., 2001; Schaer et al., 2001).

Ils expriment, de plus, des récepteurs aux collagènes, à l'élastine et aux protéoglycans. Ils produisent des inhibiteurs d'(anti)-protéinases extracellulaires dans le but de moduler les fonctions de la matrice extracellulaire (MEC), et des protéines plasmatiques, mais aussi des fonctions cellulaires comme la défense de l'hôte contre les infections ou la réparation tissulaire ((Hiemstra, 2002) ; pour une revue, voir (Gordon et al., 2014)).

Il est donc important que les macrophages possèdent cette aptitude de flexibilité (changement de fonctions et donc de phénotype) dans la reconnaissance et la réponse à beaucoup de stimuli différents.

Enfin, certains macrophages sont dits spécialisés au sein de certains tissus et organes. Ils acquièrent donc des caractéristiques différentes (Fig. I.1.9) (pour une revue, voir (Epelman et al., 2014b)).

Les histiocytes représentent les macrophages du tissu conjonctif, dans lequel ils joueraient un rôle principalement dans la phagocytose et la présentation efficace des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ afin d'initier une réponse immunitaire (Cline, 1994).

Dans le système nerveux central, les cellules microgliales formant la microglie, interagissent avec les régions pré- et post-synaptiques des neurones, régulant ainsi leur survie ou leur mort cellulaire programmée lors de contacts prolongés (Nayak et al., 2014; Wake et al., 2013). De ce fait, en induisant l'apoptose de neurones en excès, la microglie permet de contrôler le développement de l'hippocampe et du cervelet, tout en occasionnant peu d'inflammation grâce à une phagocytose rapide des neurones apoptotiques (Paolicelli et al., 2011). Enfin, la microglie joue un rôle important dans la formation de la couche V du cortex cérébral, lieu où ces macrophages sécrètent des facteurs de croissance tels que l'IGF1 (Ueno et al., 2013).

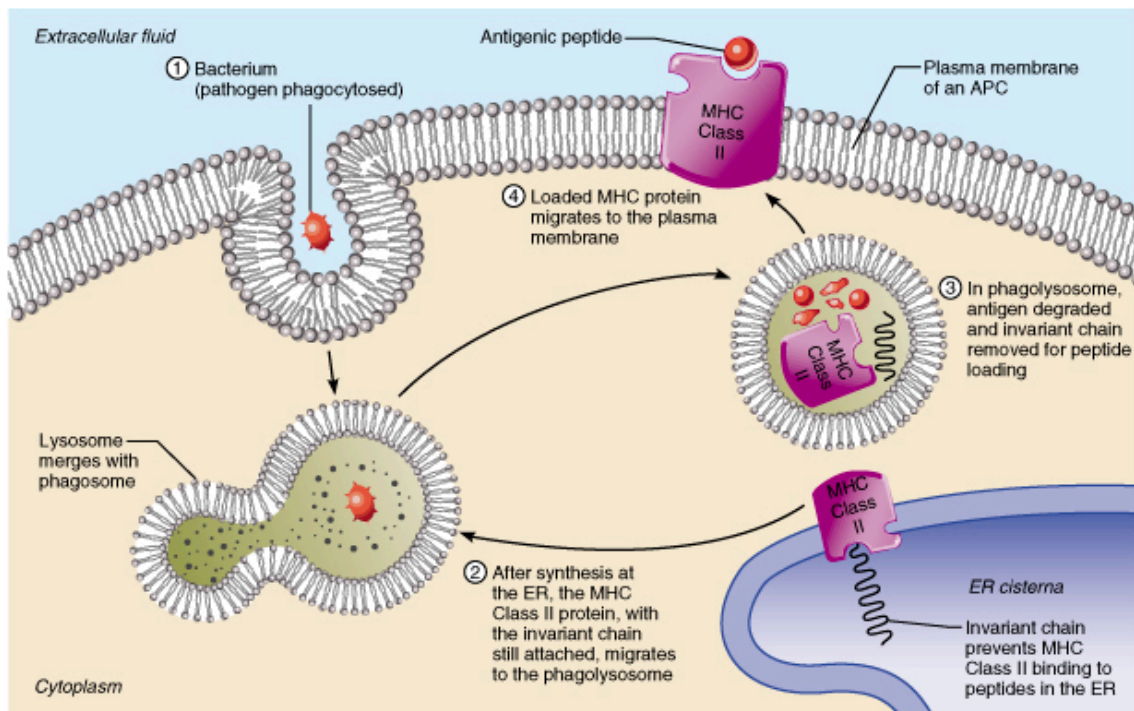


Figure. I.1.8. Présentation des antigènes aux lymphocytes T.

Après phagocytose de la particule exogène par le macrophage et formation du phagosome, ce dernier fusionne avec un lysosome, permettant la dégradation du microorganisme (par exemple).

Simultanément, les protéines MHC de classe II sont synthétisées dans le RE, avec la chaîne invariante attachée, les empêchant ainsi de se lier à des antigènes présents dans le RE. Elles migrent ensuite vers le phagolysosome, dans lequel la chaîne invariante se détache et dans lequel elles se lient à un peptide provenant de la particule exogène. Chargées avec le peptide antigénique, elles migrent ensuite vers la membrane plasmique, où elles sont reconnues par des récepteurs des lymphocytes T.

(www.apsbiology.org)

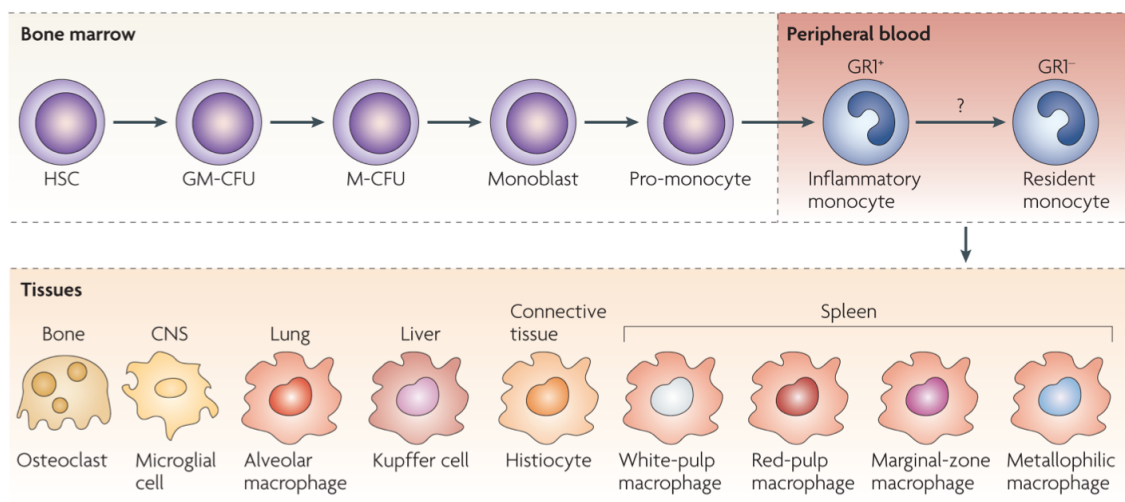


Figure I.1.9. Hétérogénéité des macrophages.

Exemple chez la souris. L'hétérogénéité et la diversité des macrophages chez l'homme sont comparables.

(Mosser and Edwards, 2008)

Les macrophages alvéolaires, quant à eux, sont présents dans les septa alvéolaires des poumons. Au contraire des autres types de macrophages, ils sont en contact direct avec l'environnement, permettant la reconnaissance et phagocytose de facteurs provenant de l'épithélium alvéolaire dont le surfactant, de bactéries commensales ou de particules inhalées par exemple (Guilliams et al., 2013). Leur rôle de phagocytose est essentiel notamment afin d'empêcher la protéinose alvéolaire, qui consiste en une accumulation des composants du surfactant (Dranoff et al., 1994; Guilliams et al., 2013). De ce fait, ils jouent donc un rôle crucial afin d'assurer l'homéostasie du tissu pulmonaire, la défense contre les microorganismes, la réponse envers les substances étrangères et d'assurer le remodelage du tissu (Hussell and Bell, 2014).

Dans la rate, deux types de macrophages interviennent avec des fonctions différentes : les macrophages de la pulpe rouge splénique et les macrophages de la zone marginale splénique, bordant les massifs de la pulpe blanche. Les premiers sont impliqués dans la phagocytose des globules rouges sénescents et dans l'internalisation du fer à des fins de recyclage (Kohyama et al., 2009). En effet, pendant le vieillissement des globules rouges, l'accumulation de modifications biochimiques au niveau de leurs membranes, telles que l'externalisation de la phosphatidylsérine, la perte de résidus d'acide sialique ou la présence de conjugués lipides-protéines oxydés, permet au macrophage de les identifier et de les éliminer (Beaumont and Canonne-Hergaux, 2005). Les macrophages de la zone marginale splénique, eux, interviennent dans la limitation des infections transmissibles par le sang (A-Gonzalez et al., 2013).

Il existe également des macrophages spécialisés dans le foie, appelés cellules de Kupffer. Ces cellules bordent les capillaires sinusoides irriguant et drainant le foie. Elles sont responsables de la phagocytose de bactéries ayant pénétré dans le foie ou de déchets métaboliques tels que les érythrocytes sénescents ou des composants de l'hémoglobine (Epelman et al., 2014b). Elles jouent donc un rôle d'épuration et de dégradation du noyau hémique en biliverdine, qui sera ensuite éliminée via la bile.

Dans le tissu adipeux, les macrophages jouent encore d'autres rôles, tels que dans le métabolisme des lipides, l'adipogenèse et dans la thermogenèse adaptative (Nguyen et al., 2011).

Enfin, les ostéoclastes constituent les macrophages du tissu osseux. Ils interviennent non seulement dans le remodelage osseux, mais aussi dans la déminéralisation osseuse via leur activité ostéolytique et dans le renouvellement normal de l'os (Kodama et al., 1991).

A l'instar des monocytes, les macrophages sont donc des cellules d'une grande plasticité et très hétérogènes. Ils sont réceptifs aux stimuli présents dans leur microenvironnement et acquièrent alors différents phénotypes fonctionnels. En effet, lorsqu'un macrophage, en état de repos (ex. : histiocytes), répond à une stimulation ou des signaux du microenvironnement, il s'agit d'une activation. Elle entraîne l'expression de marqueurs particuliers par le macrophage, et donc l'acquisition d'un phénotype spécifique, dépendant du tissu et du microenvironnement dans lequel le macrophage se trouve. Le macrophage est donc dit « polarisé ». Selon Murray, la polarisation des macrophages se définit comme « une estimation de l'activation des macrophages à un moment et à un endroit donné » (Lawrence and Natoli, 2011; Mosser and Edwards, 2008; Murray, 2016; Wolfs et al., 2011).

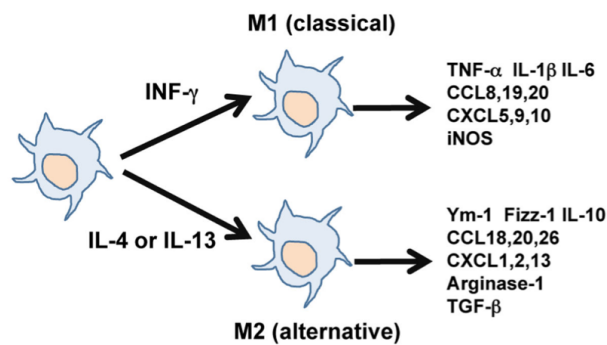


Figure I.1.10. Phénotypes M1 et M2.

Le phénotype M1 est obtenu *in vitro*, lorsque des macrophages non polarisés, M0, sont incubés en présence d' $\text{INF}\gamma$. Seul, cet inducteur n'est pas suffisant pour la polarisation du macrophage. L'ajout de $\text{TNF}\alpha$ ou d'un inducteur du $\text{TNF}\alpha$ (ex. : LPS) est nécessaire. Ces macrophages, dits « classiques », surexpriment des gènes pro-inflammatoires tels que le $\text{TNF}\alpha$, l' iNOS ou l' IL-6 . Au contraire, les macrophages M2 sont obtenus en présence d' IL-4 et/ou d' IL-13 et sont dits « alternatifs ». Ils surexpriment des gènes anti-inflammatoires tels que Arg1 , Fizz-1 et Ym1 chez la souris ou IL-10 , $\text{TGF-}\beta$ et CCL18 chez l'homme. (He and Carter, 2015)

1.1.2 Polarisation des macrophages

1.1.2.1 Macrophages et polarisation

Les recherches impliquant les macrophages se sont longtemps focalisées sur les macrophages dits M0 ou non polarisés (histiocytes). Cependant, dans les années 1970, Mackaness et son équipe ont découvert que des signaux du microenvironnement cellulaire étaient capables de moduler la physiologie des macrophages, afin d'améliorer leur activité microbicide (Mackaness, 1977; Mosser and Edwards, 2008). Au fil des années, ces cellules effectrices ont été classées en fonction des marqueurs géniques qu'elles expriment et de leurs fonctions principales. Le concept de polarisation des macrophages commence à être bien décrit, non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans les pathologies telles que le cancer, le diabète et l'athérosclérose, mais aussi de manière plus générale dans les maladies inflammatoires.

La classification des macrophages est calquée sur celle de la nomenclature des cellules immunitaires Th1/Th2 : les macrophages sont dits M1 ou M2 selon le type de stimulation utilisé (Fig. I.1.10). Chacun de ces phénotypes appartient à un continuum de polarisation (Fig. I.1.11) (He and Carter, 2015; Labonte et al., 2014; Lopez-Castejon et al., 2010; Mantovani et al., 2007; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2009; Mosser, 2003; Mosser and Edwards, 2008).

Récemment, un groupe de biologistes spécialisés sur le macrophage ont rédigé un guide expérimental et des recommandations pour la nomenclature (« Macrophage activation and polarization : nomenclature and experimental guidelines »), proposant des règles de protocoles standardisés à utiliser en cas d'étude de la polarisation, ainsi qu'une façon universelle de nommer les macrophages polarisés, sur base des stimuli de polarisation utilisés (ex. : macrophages M1 = M(LPS+IFN γ) (Murray et al., 2014).

1.1.2.1.1 Macrophages M1

Le phénotype M1 correspond à des macrophages dits activés « classiquement » (CAMs ou « classically activated macrophages ») (Fig. I.1.12). Il est obtenu lorsque les macrophages sont exposés à de l'IFN γ . La présence seule d'interféron- γ (IFN γ) a pour propriété de préparer (« priming ») le macrophage à l'activation, mais ne l'active pas en lui-même. La combinaison avec du TNF α ou un inducteur de TNF α est donc nécessaire. Cet inducteur peut être un microorganisme ou un produit microbien tel que le LPS se liant à un récepteur TLR, induisant *in fine* la production de TNF α (Mosser, 2003). Dans certaines études, l'ajout de GM-CSF dans le milieu peut aussi être utilisé afin de différencier des monocytes humains en macrophages M1 (Tableau I.1.5) (Fleetwood et al., 2009). Ce tableau récapitule les différentes conditions de polarisation de macrophages décrites dans la littérature, en précisant la source des macrophages. Les mécanismes moléculaires conduisant à la polarisation des macrophages seront décrits au point 1.1.2.3.

En réponse à ces stimuli, le macrophage acquiert alors des propriétés pro-inflammatoires. Ces cellules M1 favorisent une réponse Th1 et sont principalement impliquées dans la défense de l'hôte envers les microorganismes intracellulaires, de par leur action microbicide. Elles jouent également un rôle dans la destruction tissulaire et ont des propriétés anti-tumorales. En effet, elles exercent des activités cytotoxiques et

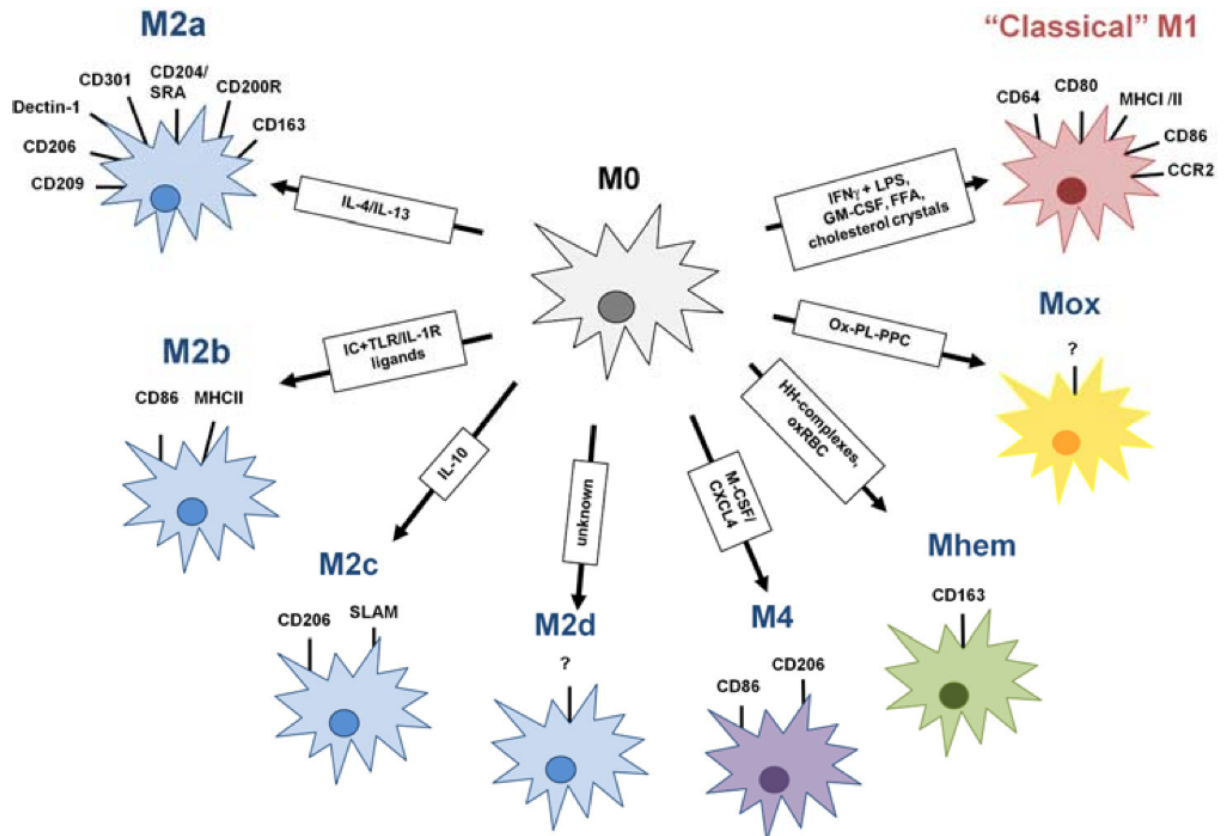


Figure I.1.11. Diversité des phénotypes de macrophages.

En plus des phénotypes M1 et M2, représentant les extrêmes du spectre de polarisation, plusieurs autres types de macrophages polarisés existent. Dans la catégorie des macrophages M2, il y a également les macrophages M2c et M2d, peu caractérisés à l'heure actuelle. Le phénotype M2c est acquis en présence d'IL-10, tandis que très peu est connu sur les macrophages M2d. En plus de ces phénotypes, il en existe d'autres, notamment impliqués dans l'athérosclérose. Les macrophages M4 sont eux obtenus lorsque des macrophages M0 sont incubés avec du M-CSF et du CXCL4 et seraient impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire, via une surexpression de métalloprotéinases de matrice. Les macrophages Mhem (ou HA-mac), polarisés en présence de complexes hémoglobine/haptoglobine et en présence de globules rouges oxydés, sont retrouvés dans les plaques hémorragiques athéroscléreuseuses chez l'homme.

Enfin, le phénotype Mox a été caractérisé chez la souris *Ldl-r^{-/-}* et représenterait 30 % des macrophages des lésions athéroscléreuseuses. Ce phénotype est acquis en présence de phospholipides oxydés.

(Labonte et al., 2014)

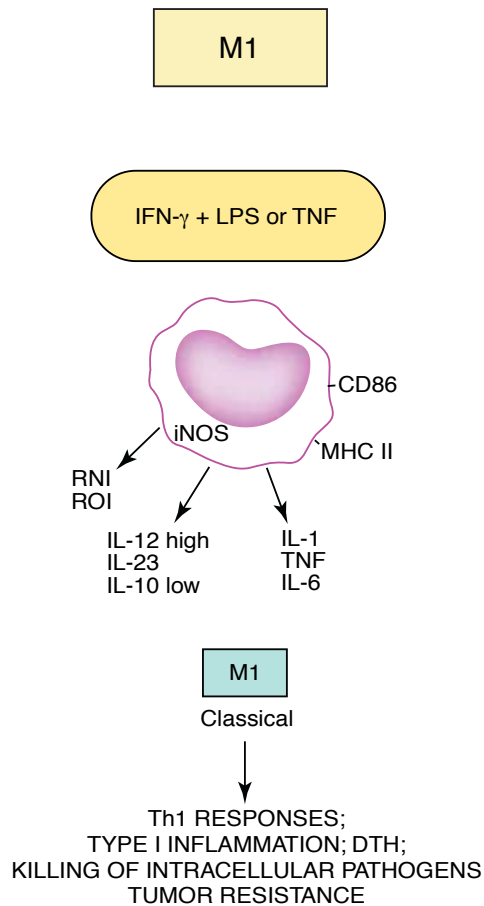


Figure I.1.12. Macrophages M1.

Les macrophages M1 ou « classiques » sont polarisés en présence d'IFN γ et d'un inducteur du TNF α , dont le plus communément utilisé est le LPS. Ils jouent notamment un rôle dans l'inflammation, la défense de l'hôte envers les microorganismes intracellulaires ainsi que dans la résistance tumorale.

Adapté de (Mantovani et al., 2004)

Auteurs	Méthode de polarisation	Marqueurs de polarisation utilisés	Source de macrophages
(Adamson et al., 2016)	<p>M1 : LPS (1 µg/ml) + IFNγ 10 U/ml M2 : IL-4 (10 ng/ml) Temps : non précisé</p>	<p>M1 : <i>iNOS</i>, <i>IL-6</i>, <i>Tnfα</i>, <i>IL-1β</i>, <i>Ccl2</i> M2 : <i>Arg1</i>, <i>Mgl1</i>, <i>Mgl2</i>, <i>IL-10</i>, <i>Mrc1</i>, <i>Ym1</i> (RT-qPCR)</p>	<p>Cellules RAW 264.7 murines BMDMs : monocytes murins différenciés en macrophages via ajout de milieu L-929 (10 %) pendant 7 jours</p>
(Davis, 2013)	<p>M1 : IFNγ (10 à 200 U/ml) + LPS (1 à 100 ng/ml) - 6 à 8h M2 : IL-4/IL-13 (10 à 20 U/ml) - 18h</p>	<p>M1 : <i>Tnfα</i>, <i>iNOS</i>, <i>IL-12p40</i> M2 : <i>Arg1</i>, <i>Fizz1</i>, <i>IL-10</i> (RT-qPCR)</p>	<p>BMDMs : monocytes murins différenciés en macrophages via ajout de milieu L-929 (20 %) pendant 6-7 jours</p>
(Fleetwood et al., 2009)	<p>BMDMs : M1 : monocytes différenciés avec du GM-CSF (1000 U/ml) = GM-BMM M2 : monocytes différenciés avec du M-CSF (5000 U/ml) = BMM 7 jours</p>	<p>M1 : <i>Tnfα</i>, <i>IL-12p35</i>, <i>IL-12p40</i>, <i>IL-23p19</i>, <i>Ccl17</i> M2 : <i>Ccl5</i>, <i>Ccl12</i>, <i>Cxcl10</i>, <i>Stat1</i>, <i>Stat2</i>, <i>Irf7</i>, <i>IL-10</i> (RT-qPCR)</p>	<p>BMDMs : voir méthode de polarisation</p>
(Genin et al., 2015)	<p>M1 : LPS (10 pg/ml) + IFNγ (20 ng/ml) - 24h M2 : IL-4 (20 ng/ml) + IL-13 (20 ng/ml) - 24h, 48h et 72h</p>	<p>M1 : <i>TNFα</i>, <i>IL-6</i>, <i>IL-1β</i>, <i>CXCL10</i>, <i>CD80</i>, <i>HLA-DR</i> (RT-qPCR) IL-6, <i>CXCL10</i> (ELISA) M2 : <i>CD206</i>, <i>CD163</i>, <i>Fibronectin</i>, <i>IL-10</i>, <i>CCL18</i>, <i>CCL2</i> (RT-qPCR) IL-10, <i>CCL18</i> (ELISA)</p>	<p>Monocytes humains immortalisés Thp1, différenciés en macrophages avec du PMA (150 nM) (24h), puis RPMI seul (24h)</p>
(Hirose et al., 2011)	<p>M1 : LPS (10 pg/ml) + IFNγ (20 ng/ml) M2 : IL-4 (20 ng/ml) 18h</p>	<p>M1 : <i>TNFα</i>, <i>IL-1β</i>, <i>IL-6</i> (RT-qPCR) CD86 (FACS) M2 : <i>IL-10</i>, <i>MRC1</i> (RT-qPCR) MRC1 (FACS)</p>	<p>Monocytes circulants humains différenciés en macrophages avec du M-CSF (100 ng/ml) pendant 7 jours</p>

(Isa et al., 2011)	M2 : IL-13 (15 ng/ml) + 1 µM rosiglitazone – 72h	M2 : <i>MRC1, IL-Ra</i> (RT-qPCR)	Monocytes circulants humains différenciés en macrophages après adhérence pendant 7 jours Thp1 (PMA pendant 72h)
(Joshi et al., 2014)	M1 : LPS (10 ng/ml) – 24h BMDMs : M1 : GM-CSF (75 ng/ml) M2 : M-CSF (50 ng/ml) 7 jours	M1 : <i>Il-1, Tnfα, Mmp9, uPA</i> M2 : <i>Tgf-β, Ym1, Mmr, Mgl1</i> (RT-qPCR)	Cellules de tumeurs de souris C57BL/6 WT ou <i>Rac2</i> ^{-/-} : purification des cellules myéloïdes CD11b, via méthode de MACS BMDMs
(Khallou-Laschet et al., 2010)	M1 : LPS (100 ng/ml) + IFNγ (100 U/ml) M2 : IL-4 (5 ng/ml)	M1 : <i>iNOS, Arg2, Il-6</i> M2 : <i>Arg1, Ym1/2</i> (RT-qPCR et ELISA (sauf <i>Ym1/2</i>)) (IF : <i>Arg1</i> (M2), <i>Arg2</i> (M1))	BMDMs provenant de souris C57BL/6 WT et <i>ApoE</i> KO. Monocytes différenciés en macrophages via l'ajout de milieu L-929 (20 %) pendant 7 jours
(Liu et al., 2016)	M1 : LPS (1 µg/ml)	M1 : CD11b (FACS) IL-6, TNFα (ELISA) p65, SOCS1 (WB) M2 : CD206 (FACS)	Monocytes humains immortalisés Thp1, différenciés en macrophages avec du PMA (100 ng/ml) (72h)
(Lopez-Castejon et al., 2010)	M1 : LPS (1 µg/ml) + IFNγ (20 ng/ml) – 4h M2 : IL-4 (20 ng/ml) – 48h	M1 : <i>Il-1β, Il-12β, Il-6, iNOS, Il-12α</i> M2 : <i>Fizz1, Arg1, Ym1, Ccl22</i> (RT-qPCR)	Macrophages péritonéaux de souris C57BL/6
(Martinez et al., 2006)	M1 : LPS (100 ng/ml) + IFNγ (20 ng/ml) M2 : IL-4 (20 ng/ml) 18h	Analyse de profil transcriptionnel via PCA (« Principal Component Analysis ») et ontologie de gènes	Monocytes circulants humains, différenciés en macrophages via l'ajout de M-CSF (100 ng/ml) pendant 7 jours
(Ying et al., 2013)	M1 : LPS (100 ng/ml) + IFNγ (50 ng/ml) M2 : IL-4 (10 ng/ml) + IL-13 (10 ng/ml)	M1 : <i>Cd86, Cd69, Cd80, Il-1β, Tnfα</i> (RT-qPCR) CD11c (FACS) - p65 (WB) M2 : <i>Arg1, Pparγ</i> (RT-qPCR) MRC1 (FACS)	BMDMs : monocytes murins différenciés en macrophages via ajout de milieu L-929 (10 %) pendant 6-7 jours

Tableau I.1.5. Liste non exhaustive de protocoles de polarisation de macrophages à travers la littérature.

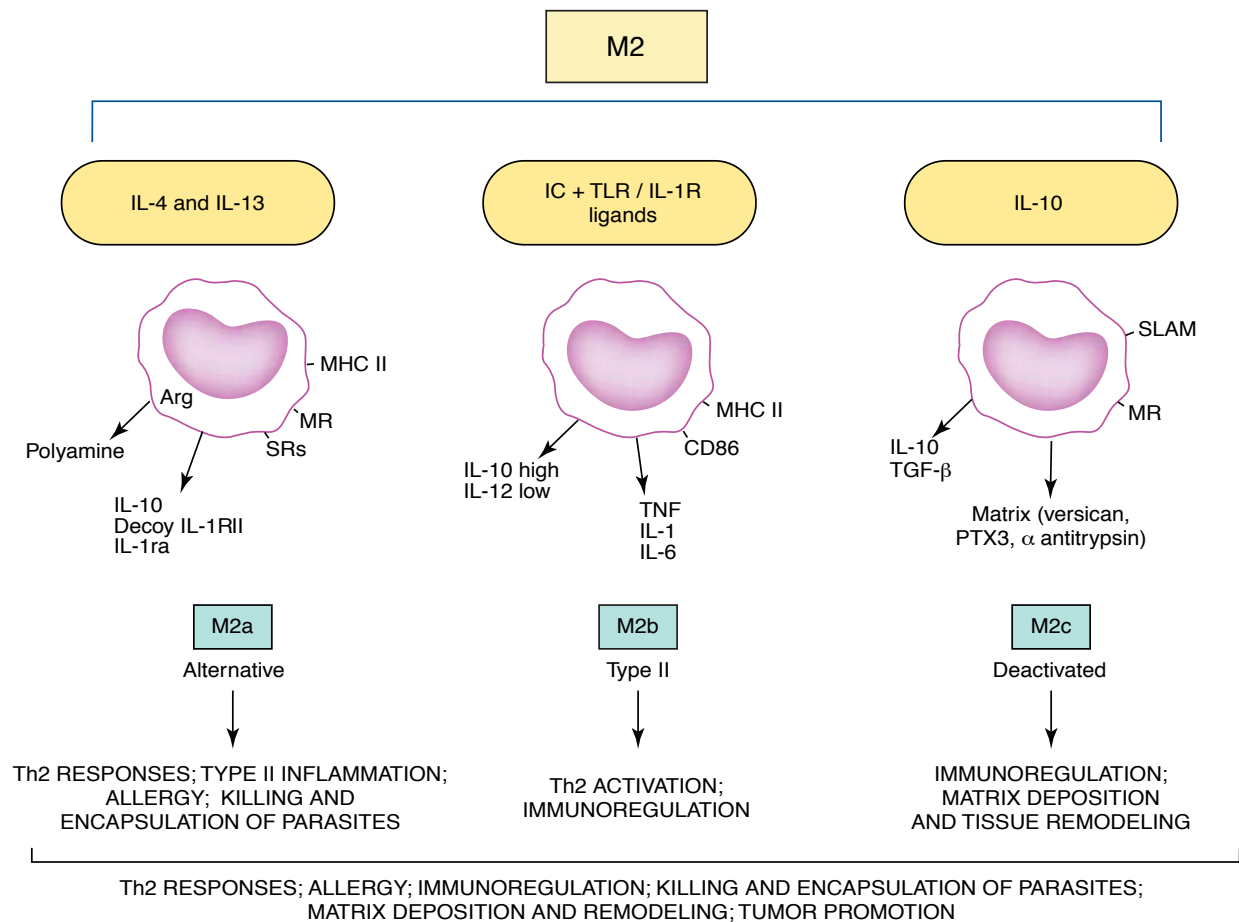


Figure I.1.13. Macrophages M2.

Les macrophages M2, contrairement aux macrophages M1, sont considérés comme anti-inflammatoires. Malgré leur rôle commun dans le remodelage tissulaire, le développement tumoral et l'immunorégulation, ils sont classés en trois sous-classes : les macrophages M2a dits « activés de manière alternative », les macrophages M2b et les M2c. Ces trois-sous classes ont été créées car ces cellules sont générées via différents stimuli : en effet, les macrophages M2a sont polarisés via l'IL-4 et l'IL-13 ; les M2b via l'activation des TLRs et en présence de complexes immuns (IC) ou par les agonistes de l'IL-1R ; les M2c via l'IL-10. Les plus étudiés sont les macrophages M2a, impliqués dans les réponses anti-inflammatoires (Th2), dans des réactions d'encapsulation et d'élimination des parasites, mais aussi dans les réactions d'allergie.

Adapté de (Mantovani et al., 2004)

antiprolifératives via la production efficace de ROS (« Reactive Oxygen Species »), de RNS (« Reactive Nitrogen Species ») et de cytokines pro-inflammatoires (ex. : IL-6, IL-12, IL-23, TNF α). Elles produisent, de plus, de grandes quantités d'oxyde nitrique (NO), produit à partir d'arginine, via une surexpression de l'« inducible Nitric Oxide Synthase » (iNOS ou NOS-2) (Fig. I.1.12) (Ezekowitz and Gordon, 1984; Mantovani et al., 2004; Sica and Mantovani, 2012; Van Ginderachter et al., 2006). Elles expriment également fortement les récepteurs Fc γ tels que Fc γ RIII. Les particules coatées avec des IgG seront plus efficacement internalisées par les macrophages M1 (Guilliams et al., 2014; Lefevre et al., 2013).

Grâce à une surexpression de protéines telles que les molécules MHC-II et les molécules CD80 et CD86, les macrophages M1 possèdent aussi une capacité élevée de présenter les antigènes aux cellules T dans le cadre de la réponse immunitaire adaptative (Mosser, 2003).

Cependant, l'état inflammatoire ne doit pas être persistant afin de limiter les dommages tissulaires empêchant la cicatrisation et les dommages à l'ADN pouvant prédisposer le tissu à une transformation néoplasique (Dacosta and Kinare, 1991; Van Ginderachter et al., 2006; Wolfs et al., 2011). L'activité de ces cellules doit donc être régulée pour empêcher la destruction incontrôlée du tissu. Un équilibre est possible grâce au développement de mécanismes anti-inflammatoires de résolution. Parmi ceux-ci, nous pouvons signaler la polarisation des macrophages en cellules M2 anti-inflammatoires.

1.1.2.1.2 Macrophages M2

Contrairement aux macrophages M1, le type M2 est anti-inflammatoire et dit activé de manière alternative (« alternatively activated macrophage ») (Fig. I.1.13). En fonction du stimulus, les macrophages M2 se subdivisent en sous-types, ce qui peut compliquer l'étude du phénotype M2 en soi, mais atteste encore une fois du large éventail de phénotypes au sein des macrophages (Tableau I.1.5).

Les macrophages sont classés dans le groupe M2a après exposition à un mélange d'IL-4 et IL-13, dans le groupe M2b lorsqu'ils sont exposés à des complexes immuns ou des agonistes des TLRs ou IL-1R, et dans le groupe M2c après avoir été mis en présence d'IL-10, ou encore de glucocorticoïdes ou de sécostéroïdes (telle la vitamine D3) (Fritz, 2009; Goerdts and Orfanos, 1999; Gordon, 2003; Gordon and Martinez, 2010; Gordon and Taylor, 2005; Libby et al., 2010; Mantovani et al., 2004). L'incubation avec de l'IL-4 et/ou l'IL-13 est généralement la plus courante (Davis et al., 2013; Genin et al., 2015; Ying et al., 2013) et c'est celle que nous avons choisie au cours de ce travail.

Les monocytes humains peuvent également être différenciés *in vitro* en macrophages M2, en présence de M-CSF (Tableau I.1.5) (Fleetwood et al., 2009).

Ces macrophages présentent une capacité diminuée à produire des cytokines inflammatoires (IL-12, IL-6, ...) et des ROS, limitant ainsi l'oxydation des LDLs au niveau des lésions athéroscléreuses. Cependant, les macrophages M2b sont l'exception puisqu'ils produisent des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α), de façon combinée avec une production faible d'IL-12 et haute d'IL-10, généralement considérée comme une cytokine plutôt anti-inflammatoire (Mosser, 2003). La capacité des macrophages M2 à produire des cytokines inflammatoires est donc variable, en fonction du stimulus utilisé pour l'activation (Mantovani et al., 2007).

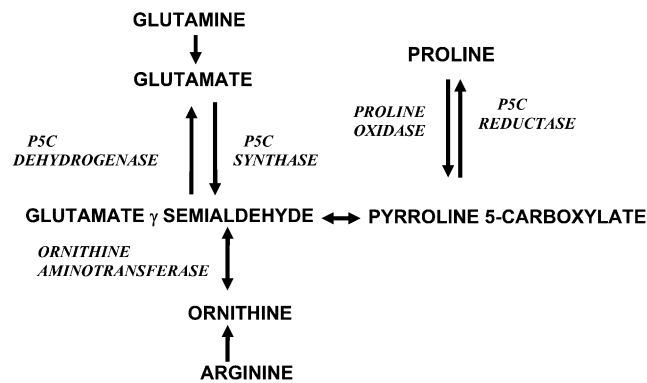


Figure I.1.14. Voie de synthèse de la proline.

La L-arginine, sous l'action de l'enzyme arginase, est convertie en L-ornithine. Celle-ci, via l'action de l'ornithine γ -aminotransférase, est convertie en acide glutamique γ -semialdéhyde qui permet alors soit la synthèse de glutamate et donc de glutamine ou soit la synthèse de proline via l'action de la pyrroline 5-carboxylate (P5C) synthase, transformant l'acide glutamique γ -semialdéhyde en P5C. La réaction produisant de la proline à partir de P5C est catalysée par la P5C réductase. Avec l'hydroxyproline, la proline correspond à 23 % de la molécule de collagène. La P5C synthase est exprimée exclusivement dans l'intestin, seul organe capable de produire de la proline à partir de glutamine. (Watford, 2008)

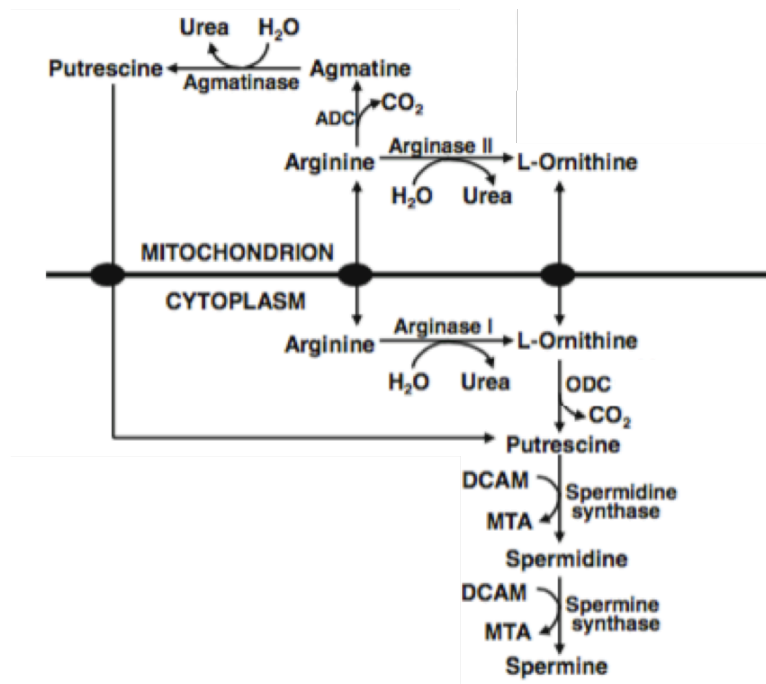


Figure I.1.15. Synthèse des polyamines.

La L-arginine, sous l'action de l'enzyme arginase, est convertie en L-ornithine. Dans le cytoplasme, cette dernière peut également être convertie en putrescine via l'ornithine décarboxylase (ODC) et ainsi ouvrir la voie à la synthèse des polyamines, importantes pour l'expression des gènes, la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. La spermidine synthase catalyse la formation de spermidine à partir de putrescine, permettant ainsi la formation de spermine via l'action de la spermine synthase. Cette dernière réaction est réversible et catalysée par la spermine oxydase (non montré ici).

La putrescine peut aussi être dérivée de l'agmatine (elle-même provenant de la L-arginine) par une réaction catalysée dans la mitochondrie par l'agmatinase.

Adapté de (Wu et al., 2013)

Les macrophages M2 surexpriment, de plus, les récepteurs « scavenger » (dont CD36; voir 2.1.5.2 Récepteurs « scavenger »), les récepteurs au mannose tels que MRC1 et les récepteurs au galactose.

Ils jouent un rôle important dans l'encapsulation et l'élimination de parasites extracellulaires tels les helminthes (Noel et al., 2004). Ils agissent également dans le contrôle et la résolution de l'inflammation via la production de médiateurs anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10, IL-1Ra) (Mantovani et al., 2007; Mege, 2010; Noel et al., 2004; Van Ginderachter et al., 2006), mais aussi dans l'immuno-régulation, en atténuant les réponses immunes. Ils participent aux réactions allergiques ainsi qu'à leur exacerbation, en favorisant la production élevée de cytokines Th2 et IL-10 (Fig. I.1.13) (Noel et al., 2004). En effet, une corrélation, entre le pourcentage de macrophages M2 et la sévérité de l'asthme lié à une allergie, a été démontrée (Melgert et al., 2011). De plus, des monocytes CD14⁺CD16⁺ présentant un phénotype « M2-like » ont été détectés chez des patients souffrant d'asthme bronchial et allergique (Veremeyko et al., 2013). Cependant, il est intéressant de noter qu'il semblerait que les macrophages M1 joueraient également un rôle, en produisant des cytokines inflammatoires telle l'IL-1 β et de l'oxyde nitrique, favorisant ainsi l'exacerbation des allergies via notamment des dommages pulmonaires (Khanduja et al., 2011; Moreira and Hogaboam, 2011; Tsutsui et al., 2004; Zeiger et al., 2011).

De plus, les macrophages M2 sont impliqués dans la protection, la réparation et le remodelage tissulaires grâce à l'expression de l'arginase-1 (ARG1), isoforme cytosolique, qui permet l'obtention de L-ornithine et d'urée à partir de la L-arginine, contribuant d'une part à limiter la production de NO et d'autre part à favoriser la réparation tissulaire (Figs. I.1.14 et I.1.15). En effet, la L-ornithine, via l'action de différentes enzymes, est convertie en proline : hydroxylée, la proline est l'acide aminé prédominant, correspondant à jusqu'à 23 % de la molécule de collagène (Fig. I.1.14) (Barbul, 2008) (Wu 2013). En outre, la L-ornithine et la L-arginine peuvent également être converties en polyamines (la putrescine, spermine, spermidine dérivant de la L-ornithine ; l'agmatine dérivant de la L-arginine), jouant un rôle important dans l'expression génique, la progression du cycle cellulaire et la prolifération des cellules (Fig. I.1.15) (Barbul, 2008; De Bandt et al., 2006; Hesse et al., 2001; Watford, 2008; Wu et al., 2013a). Une réponse M2 incontrôlée peut donc, dans ce cas-ci, mener à une fibrose. Signalons par exemple l'implication possible des macrophages M2 et du TGF- β , dans la fibrose associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (Pesce et al., 2009; Vidal et al., 2008).

Ces macrophages exercent aussi d'autres fonctions importantes, aidant à la réparation et au remodelage tissulaire, telles que la stimulation de l'angiogenèse et l'élimination des débris cellulaires, via une surexpression de récepteurs « scavenger » (ex. : CD36, MRC1, CD163) ou « scavenger-like » (ex. : stabiline-1), favorisant la phagocytose (Kzhyshkowska et al., 2006; Tiemessen et al., 2007; Wolfs et al., 2011).

Enfin, un lien entre la présence de cellules M2 et la progression du développement tumoral a été établi (voir 1.1.2.5 Polarisation des macrophages *in vivo*).

Il est intéressant de noter que les macrophages M1 et M2 se caractérisent par des profils d'expression de chémokines, de cytokines, de récepteurs membranaires et de récepteurs aux chémokines différents. Ceux-ci sont présentés au tableau I.1.6 et la figure I.1.16 (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2006).

Gene Name	Gene Symbol	M1	M2	M1:M2 Ratio
Membrane receptors				
CCR7	<i>CCR7</i>	5,893	55	107
Interleukin 2 receptor chain	<i>IL2RA</i>	4,062	181	22
Interleukin 15 receptor chain	<i>IL15RA</i>	2,867	178	16
Interleukin 7 receptor	<i>IL7R</i>	1,553	115	13
G protein-coupled receptor 86	<i>GPR86</i>	342	1,852	-5
Purinergic receptor P2Y5	<i>P2RY5</i>	284	2,610	-9
Transforming growth factor receptor II	<i>TGFB2</i>	218	2,274	-10
Histamine receptor H1	<i>HRH1</i>	182	1,918	-11
Toll-like receptor 5	<i>TLR5</i>	76	915	-12
C-type lectin receptor DCL-1	<i>DCL-1</i>	179	2,265	-13
Macrophage scavenger receptor 1	<i>MSR1</i>	7	107	-14
CXCR4	<i>CXCR4</i>	168	2,678	-16
C-type lectin superfamily member 12	<i>DECTIN1</i>	130	2,520	-19
G protein-coupled receptor 105	<i>P2RY14</i>	16	416	-25
CD209	<i>DCSIGN</i>	315	8,355	-27
C-type lectin superfamily member 13	<i>CLECSF13</i>	93	2,946	-32
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	<i>MS4A6A</i>	247	8,064	-33
CD36	<i>CD36</i>	73	2,713	-37
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	<i>MS4A4A</i>	16	688	-43
Mannose receptor C type I	<i>MRC1</i>	173	7,343	-43
Cytokines and chemokines				
CXCL11	<i>CXCL11</i>	4,084	19	212
CCL19	<i>CCL19</i>	13,338	103	130
CXCL10	<i>CXCL10</i>	11,659	199	59
CXCL9	<i>CXCL9</i>	15,121	260	58
Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 2	<i>TNF</i>	977	47	21
CCL5	<i>CCL5</i>	6,468	334	19
CCL15	<i>CCL15</i>	2,402	164	15
Interleukin 12B	<i>IL12B</i>	198	20	10
Interleukin 15	<i>IL15</i>	259	29	9
Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 10	<i>TRAIL</i>	2,354	343	7
Interleukin 6	<i>IL6</i>	591	83	7
CCL20	<i>CCL20</i>	316	47	7
Visfatin	<i>PBEF1</i>	2,297	446	5
Endothelial cell growth factor 1	<i>ECGF1</i>	1,636	370	4
Insulin-like growth factor 1	<i>IGF1</i>	217	1,212	-6
CCL23	<i>CCL23</i>	270	3,542	-13
CCL18	<i>CCL18</i>	290	5,457	-19
CCL13	<i>CCL13</i>	133	5,028	-38

Tableau I.1.6. Exemples de cytokines, chémokines et récepteurs membranaires exprimés de façon différentielle dans les macrophages M1 et M2.

Adapté de (Martinez et al., 2006)

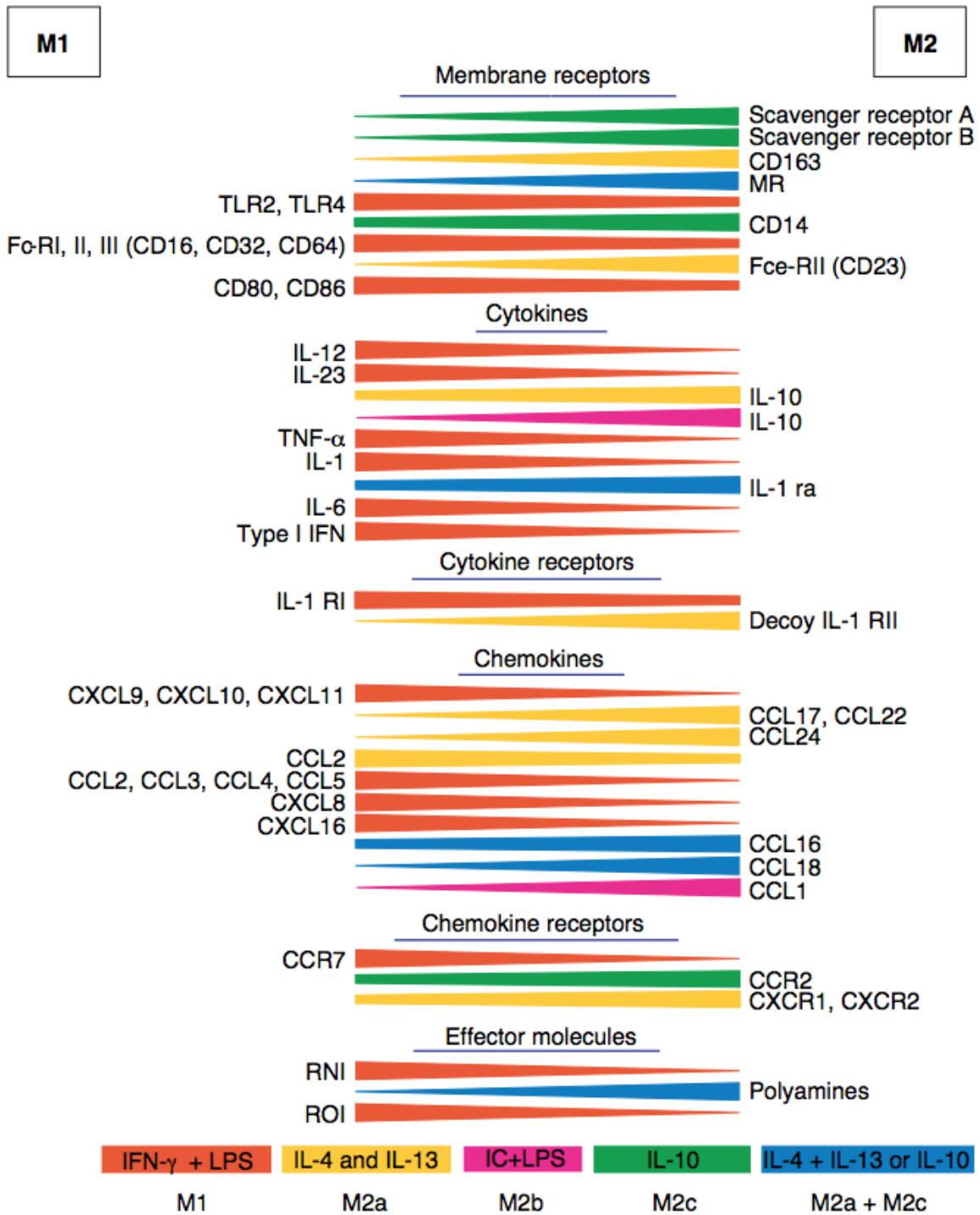


Figure I.1.16. Exemples de récepteurs membranaires, de récepteurs aux chémokines, de cytokines et de chémokines exprimés dans les macrophages M1 et M2 (M2a, M2b et M2c). (Mantovani et al., 2004)

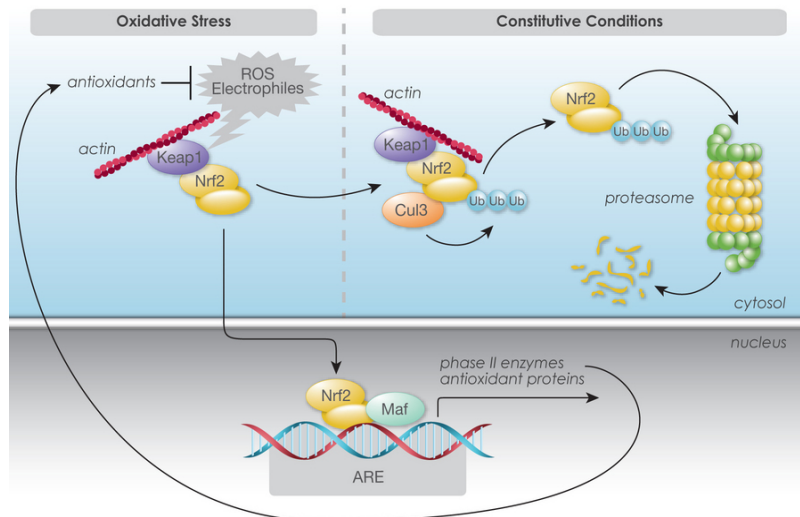


Figure I.1.17. Voie de signalisation de NRF2.

A l'état basal, KEAP1, sous forme dimérique, séquestre NRF2 constitutivement exprimé dans le cytoplasme, en interagissant avec l'actine. KEAP1 est également associée à la CULLIN3 (CUL3), une ubiquitine ligase, lui permettant de cibler NRF2 pour une ubiquitination au niveau des résidus lysines du domaine NEH2 et une dégradation subséquente de NRF2 par le protéasome 26S. En cas de changement du statut redox, des espèces réactives (ex.: ROS, RNS) ou électrophiles provoquent des modifications au niveau des résidus cystéines de KEAP1, induisant sa dissociation de CUL3. NRF2 n'est donc pas ubiquitinylé et se stabilise. Les nouvelles formes traduites de NRF2 s'accumulent dans le cytoplasme, pour ensuite être transloquées vers le noyau, se dimériser avec sMAF (« small MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog) »), s'associer à une séquence ARE (« antioxidant responsive element ») et permettre la transcription de gènes cytoprotecteurs tel que *HO-1* (hème oxygénase-1) (Loboda 2016). (www.caymanchem.com/article/2168)

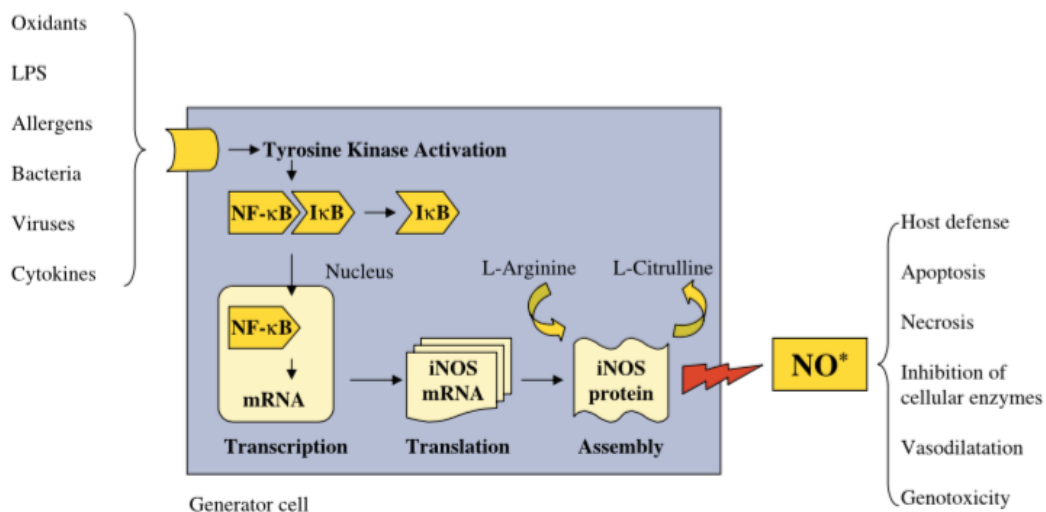


Figure I.1.18. L'oxyde nitrique.

Plusieurs stimuli (LPS, bactéries, virus, cytokines) sont capables d'induire l'activation de NFκB et sa translocation dans le noyau. NFκB induit alors la transcription de l'iNOS. L'iNOS est capable de métaboliser la L-arginine en L-citrulline et oxyde nitrique (NO). Le NO joue notamment un rôle dans la vasodilatation, mais aussi dans la défense de l'hôte contre les microorganismes. Produit en excès, il peut également avoir plusieurs effets négatifs comme l'induction de l'apoptose des macrophages, suite à l'activation des caspases. (Ricciardolo et al., 2004)

1.1.2.1.3 Macrophages Mox

D'autres phénotypes de macrophages ont été décrits (ex.: M3, M4, M_{Hem}), et notamment le phénotype Mox, caractérisé en 2010 par l'équipe de Leitinger (Kadl et al., 2010). Ces macrophages acquièrent leur phénotype en présence de phospholipides athérogènes tels que l'oxPAPC (ou « oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine ») et sont associés au microenvironnement riche en Ox-LDLs des lésions athéromateuses (Kadl et al., 2010; Pello et al., 2011). Cette classe de macrophages représenterait jusqu'à 30 % des macrophages présents dans les plaques athérosclérotiques avancées chez les souris *Ldl-r^{-/-}* (« low-density lipoprotein receptor »). Ils sont caractérisés par l'expression élevée de gènes sous le contrôle de NRF2 (« nuclear factor-erythroid-derived 2-like 2 ») (Fig. I.1.17), facteur de transcription régulé par des changements redox dans la cellule: ces gènes sont entre autres la *hème oxygénase-1* (*Ho-1*), la *sulfirédoxine-1* (*Srxn1*) et la *thiorédoxine réductase-1* (*Txnrd1*) (Kadl et al., 2010). Ces macrophages présentent des capacités de phagocytose et de chimiotaxie faibles par rapport aux macrophages de type M1 et M2 (Kadl et al., 2010) ce qui, selon Kadl et al. (2010), favoriserait le dépôt de débris cellulaires, perpétuant ainsi un état inflammatoire. Ils semblent, de plus, surexprimer des gènes pro-inflammatoires, dont *Cox-2* et *Il-1 β* , bien qu'à un niveau plus faible que dans les macrophages M1. Ils pourraient ainsi contribuer à la progression ou à la déstabilisation des plaques athérosclérotiques, en induisant des dommages tissulaires ou en maintenant un état pro-inflammatoire (Kadl et al., 2010). Toutefois, ce phénotype a été décrit principalement par une seule équipe et le modèle murin utilisé pour les dénominer au niveau des lésions, les souris KO pour le récepteur aux LDL natives, n'est pas le plus pertinent dans le contexte de l'athérosclérose (voir 3.1 Modèles de base afin d'étudier l'athérosclérose).

Les différents types de macrophages polarisés *in vitro* ont été caractérisés en analysant leurs transcriptomes (pour une revue récente, voir (Novoselov et al., 2015)). La plupart des auteurs se limitent toutefois à quelques marqueurs, fréquemment utilisés afin de vérifier l'état de polarisation M1, M2 ou Mox. Les marqueurs choisis dans cette étude sont décrits dans le paragraphe qui suit.

1.1.2.2 Gènes marqueurs de la polarisation

Au cours de cette étude, nous nous sommes focalisés sur quelques gènes marqueurs, avec les fonctions principales qui leur sont associées.

1.1.2.2.1 Les marqueurs M1

- iNOS (« inducible Nitric Oxide Synthase »)

Un des premiers marqueurs M1 étudié, en tous les cas pour les **macrophages murins**, est l'*iNOS* (encodée par *Nos-2*). Cette enzyme soluble est capable de catalyser la formation d'oxyde nitrique (NO) et de citrulline, à partir de L-arginine (Fig. I.1.18) (Mills et al., 2000; Pesce et al., 2009; Ricciardolo et al., 2004; Shimokawa and Tsutsui, 2010). Elle entre donc en compétition pour la L-arginine avec l'arginase (Fig. I.1.19). Au contraire de l'*eNOS* (*endothelial NOS* ou *Nos-3*) ou de la *nNOS* (*neuronal NOS* ou *Nos-1*) (Fig. I.1.20), l'expression de l'*iNOS* n'est pas constitutive, mais inductible par des stimuli tels que les endotoxines microbiennes (ex. : LPS) ou des cytokines pro-inflammatoires

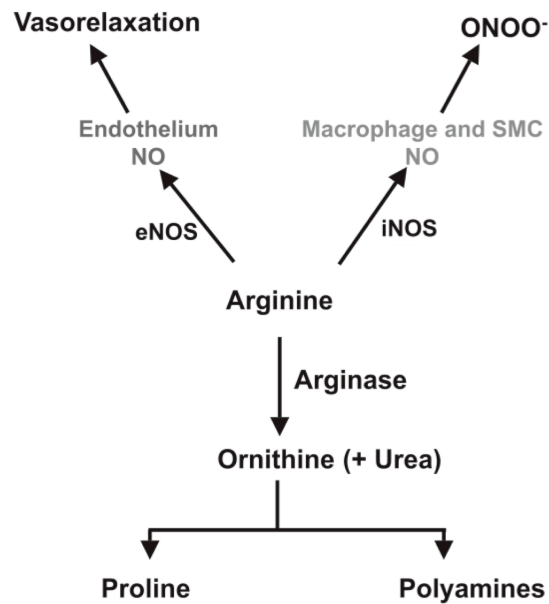


Figure I.1.19. Compétition entre l'iNOS et l'arginase-1 pour la L-arginine.

L'arginine peut à la fois directement servir de substrat pour la synthèse de protéines ou indirectement en étant clivée en urée et ornithine via l'arginase. Elle peut aussi servir à générer le NO (oxyde nitrique), via l'action de l'iNOS. L'expression d'ARG1 est induite par des cytokines anti-inflammatoires. Cependant, bien qu'elle intervienne dans la résolution de l'inflammation, elle peut être aussi pro-athérogène quand son expression augmente dans les cellules endothéliales. En effet, dans ces conditions, elle peut diminuer la production en NO, réduisant ainsi l'effet vasodilatateur de ce dernier.

(Getz and Reardon, 2006)

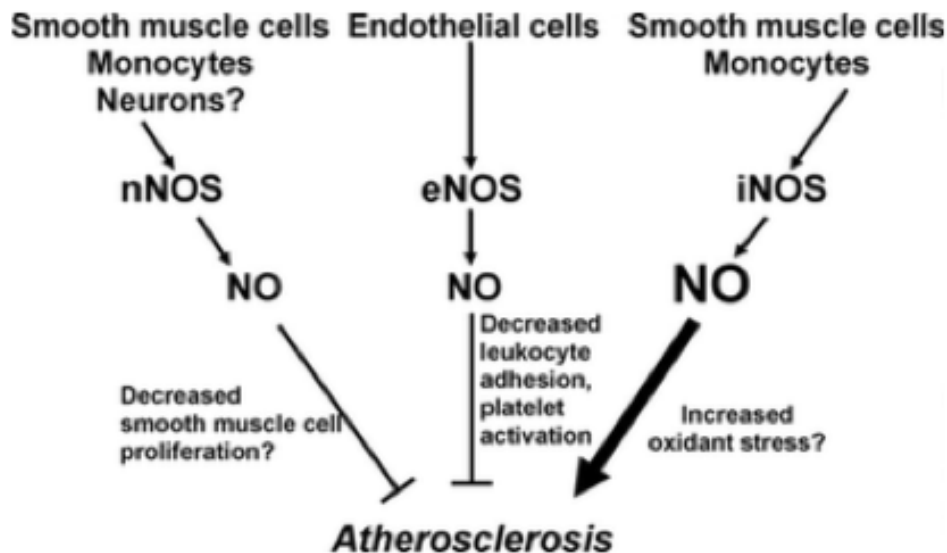


Figure I.1.20. Les trois NOS « Nitric Oxide Synthase ».

Les trois NOS sont exprimées dans les lésions athéroscléreuseuses. La nNOS (« neuronal NOS ») est exprimée dans les neurones, mais aussi dans les monocytes. La eNOS (« endothelial NOS ») est principalement exprimée dans les cellules endothéliales, tandis que l'iNOS (« inducible NOS ») est exprimée dans les monocytes/macrophages et les cellules musculaires lisses. Contrairement à la nNOS et à la eNOS qui limitent la progression des plaques, l'iNOS l'exacerbe.

(Lowenstein, 2006)

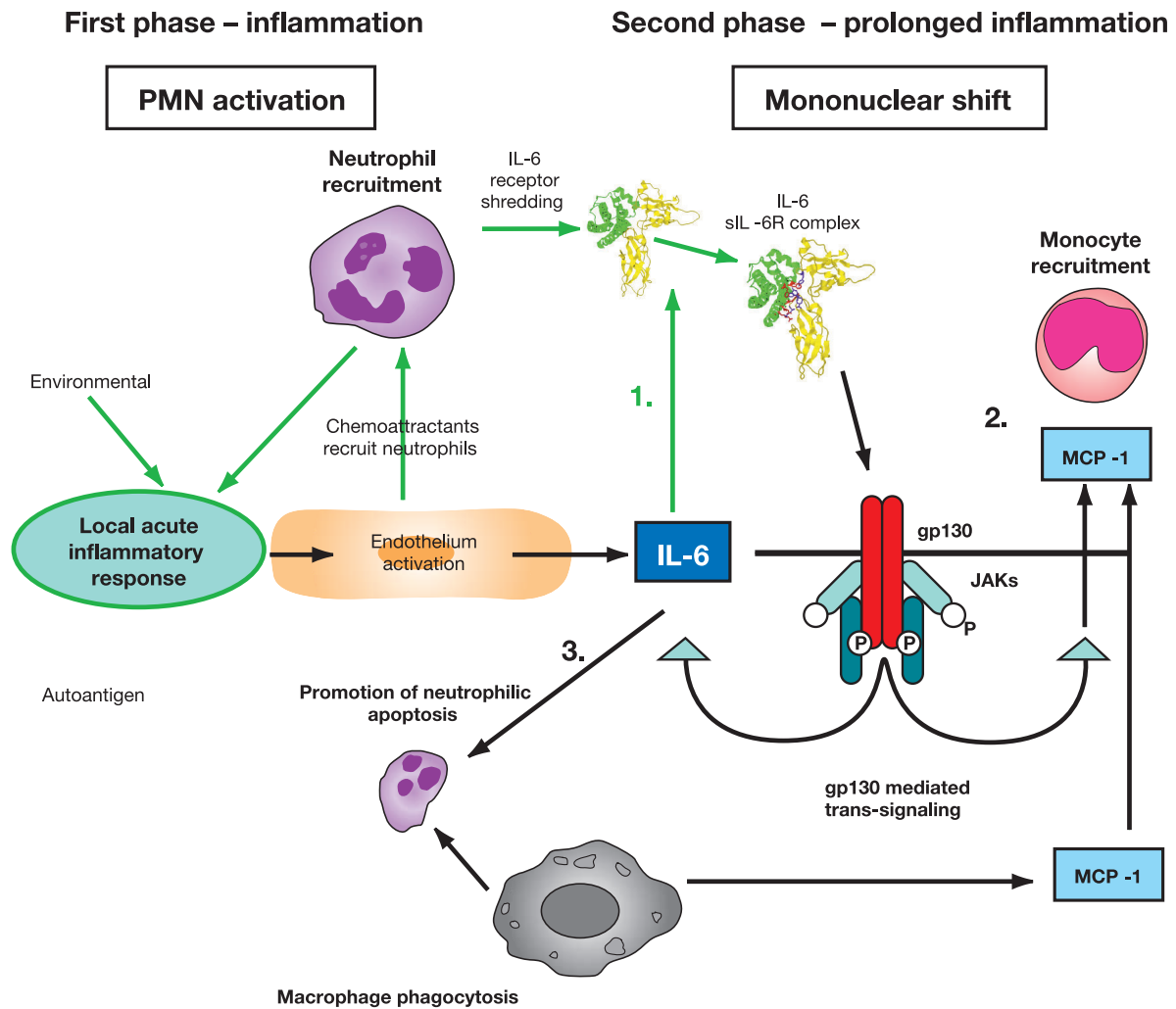


Figure I.1.21. Rôle de l'IL-6 dans la transition de la réponse inflammatoire aiguë à chronique.

La phase aiguë de l'inflammation est notamment caractérisée par le recrutement et l'activation des neutrophiles, cellules capables de produire des espèces oxygénées et des enzymes jouant un rôle dans la défense de l'hôte contre les microorganismes notamment. Suite à la réponse inflammatoire aiguë et en cas d'inflammation prolongée, l'IL-6 se lie à son récepteur soluble sIL-6R α (1), pour ensuite se lier à la protéine gp130, exprimée en membrane des cellules endothéliales. Cette liaison augmente à la fois la sécrétion d'IL-6 et de MCP-1. MCP-1, sécrété par les cellules endothéliales activées, permet ainsi le recrutement des monocytes au site de l'inflammation (2).

La transition d'une population de neutrophiles vers une population de monocytes se fait non seulement par l'accumulation des monocytes, mais aussi par l'élimination des neutrophiles. Les neutrophiles apoptotiques sont reconnus par les macrophages qui les phagocytent (3). Cette phagocytose, de part l'induction d'une augmentation de la sécrétion de TGF- β et de MCP-1 et d'une diminution de celle de l'IL-8, favorise le recrutement de monocytes.

(Gabay, 2006)

(ex. : IFN γ), et son activité est indépendante du calcium. Un environnement oxydant est donc souvent responsable de son induction, et ainsi de la production de NO, lui permettant alors d'agir dans la défense de l'hôte via une action bactéricide, dans la résistance tumorale et dans la respiration oxydative des macrophages (Fig. I.1.18) (Gotoh and Mori, 1999; Lowenstein, 2006; Ricciardolo et al., 2004; Shimokawa and Tsutsui, 2010). Produit en faibles quantités, mais de manière constitutive par la eNOS, le NO a comme fonction principale de réguler la vasodilatation. Mais il est également impliqué dans la réponse immune et joue aussi le rôle de neurotransmetteur (Getz and Reardon, 2006; Gotoh and Mori, 1999; Nathan, 2003; Shimokawa and Tsutsui, 2010). Quand il est produit en fortes quantités, suite à l'induction de l'iNOS, il peut devenir toxique, directement ou indirectement via la production de peroxy-nitrite. Cette dernière molécule, très réactive, est produite quand il y a production simultanée de NO et de O $_2^-$ (anion superoxyde), ce qui est le cas en conditions inflammatoires (Fig. I.1.19).

Un excès de production d'oxyde nitrique peut avoir pour effet de mener à l'apoptose des macrophages notamment, via une activation des caspases. Dans le noyau, il a également été montré que le NO peut causer des mutations ou des cassures double-brin dans l'ADN et peut aussi inhiber certaines enzymes de réparation de l'ADN (Kwon et al., 1991; Nguyen et al., 1992; Routledge et al., 1994). Il peut également être dommageable en réagissant avec les groupements thiols ou le Fe $^{2+}$ au niveau des sites actifs de certaines enzymes (Gotoh and Mori, 1999; Hibbs et al., 1988; Molina y Vedia et al., 1992).

Par contre, pour les **macrophages humains**, les choses semblent beaucoup moins claires et beaucoup plus controversées. En effet, une stimulation *in vitro* via la voie TLR + IFN γ n'induit que peu ou pas d'expression d'iNOS ou de production de NO alors que les fonctions de ces macrophages M1 sont similaires à celles chez la souris (Lawrence and Natoli, 2011; Murray and Wynn, 2011).

- IL-6 (« Interleukin-6 »)

Le gène de l'*interleukine-6* (*IL-6*) encode une cytokine tout d'abord impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation, via l'induction de la production de protéines de la phase aiguë telles que CRP. En combinaison avec son récepteur soluble sIL-6R α , elle intervient aussi dans la transition de la réponse inflammatoire aiguë en une réponse inflammatoire chronique. Elle la médie en induisant le recrutement des monocytes (cellules principales de la phase chronique) tout en induisant l'apoptose des neutrophiles (cellules principales de la phase aiguë) (Fig. I.1.21). Son rôle majeur est de servir de molécule messagère entre les cellules impliquées dans l'inflammation (Gabay, 2006).

Elle est sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les macrophages et les cellules T. Dans le cas de la réponse aiguë, l'induction de l'expression de l'IL-6 a lieu lorsqu'il y a reconnaissance de PAMPs par les PRRs de la cellule (voir 1.1.1.2 Macrophages : origine, hétérogénéité et fonctions et Tableau I.1.2). Elle joue donc un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes (Schuett et al., 2009; van der Poll et al., 1997). Elle peut également être induite par des cytokines de l'inflammation telles que l'IL-1, le TNF α , l'IFN ou le PDGF (Schuett et al., 2009).

Il a été de plus démontré que l'IL-6 intervient dans le développement de la plaque athéroscléreuse et dans son instabilité. En effet, l'IL-6 est impliquée dans la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs pro-thrombotiques, dans l'activation de métalloprotéinases de matrice (MMPs) ainsi que dans la modification de lipoprotéines via les phospholipases (Schuett et al., 2009).

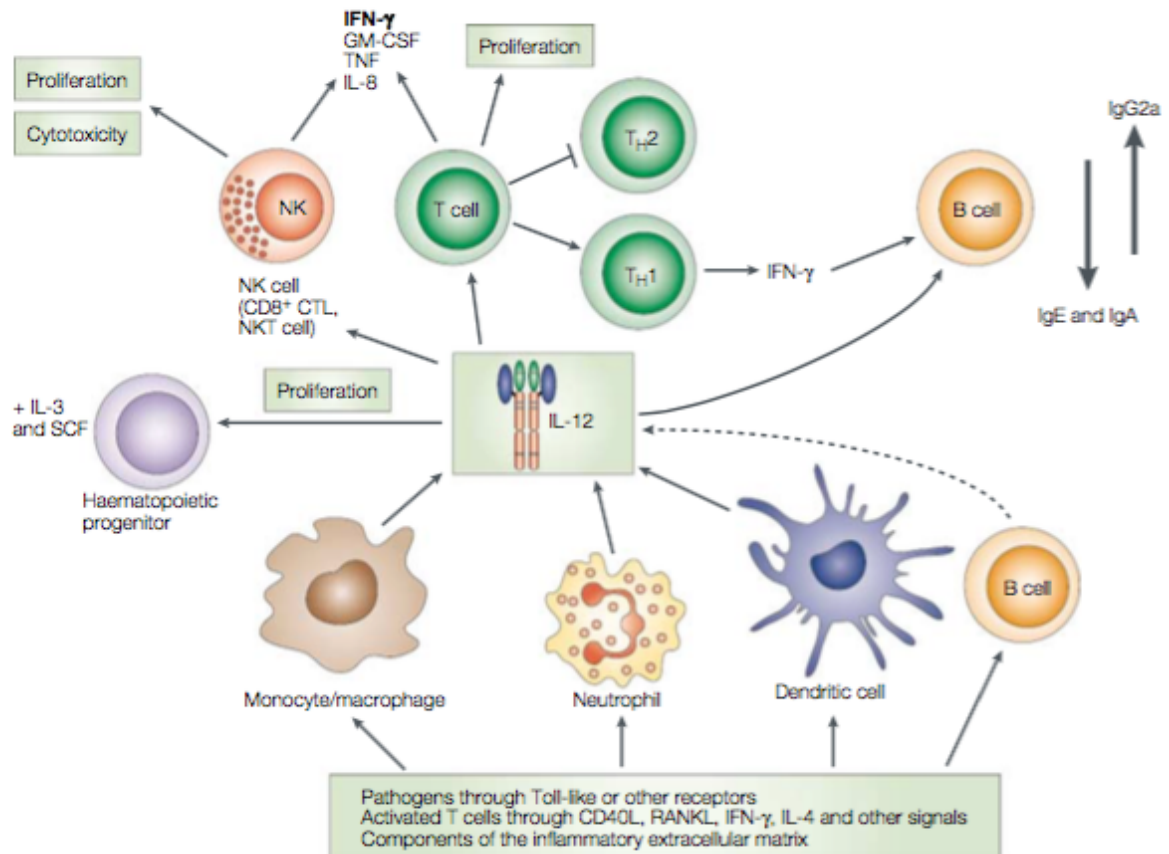


Figure I.1.22. Schéma récapitulatif des rôles principaux de l'interleukine-12, avec les cellules la produisant et ses cellules cibles.
 (Trinchieri, 2003)

De plus, de par son action, l'IL-6 promeut le dysfonctionnement endothélial, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, le recrutement de cellules inflammatoires, mais aussi la formation de macrophages spumeux via son effet inducteur sur l'expression des récepteurs « scavenger » CD36 et SR-A.

Cette cytokine peut également jouer un rôle protecteur en diminuant la concentration de cytokines pro-inflammatoires, sans effet sur la concentration en cytokines anti-inflammatoires et en stimulant la production de l'IL-1Ra, un médiateur anti-inflammatoire (Gabay et al., 1997; Schuett et al., 2009; Xing et al., 1998).

- IL-12 (« Interleukin-12 »)

L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique pro-inflammatoire, produite principalement par les cellules dendritiques, les monocytes et macrophages via notamment l'activation de récepteurs TLRs (D'Andrea et al., 1992; Macatonia et al., 1995; Trinchieri, 2003).

Elle joue différents rôles, en ciblant par exemple les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules NK et cellules T, et les cellules B (Fig. I.1.22). En effet, en combinaison avec l'IL-3 et le SCF (« stem-cell factor »), elle est capable d'induire la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. De plus, elle peut également induire la prolifération des cellules « Natural Killer » (NK) et cellules T, favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , induire une augmentation de l'expression de médiateurs cytotoxiques dans les cellules NK et la différenciation des cellules T en cellules Th1 (Fig. I.1.22). L'IL-12 est également capable d'induire, directement ou indirectement via la production d'IFN γ par les cellules Th1, une augmentation de l'activation des cellules B et la production d'immunoglobulines associées à la réponse inflammatoire, comme l'IgG2a (cas de la souris) (Fig. I.1.22) (pour une revue, voir (Trinchieri, 2003)).

Enfin, il a été montré que l'IL-12 est exprimée dans les lésions athéroscléreuse murines (Davenport and Tipping, 2003; Lee et al., 1999) et humaines (Uyemura et al., 1996). De plus, il semblerait que l'injection d'IL-12, chez des souris *ApoE*^{-/-}, accélère le développement de lésions athéroscléreuse (Lee et al., 1999).

- Arg2 (« Arginase-2 »)

L'arginase-2 (ARG2), une enzyme mitochondriale, est exprimée dans les tissus extra-hépatiques (rein et prostate, principalement). Elle catalyse l'étape convertissant la L-arginine en L-ornithine et en urée, éliminant l'excès d'azote lié au métabolisme des acides aminés et empêchant l'accumulation toxique d'ammoniaque. Via la conversion de la L-arginine en L-ornithine, elle permet la synthèse de polyamines telles que la spermidine ou la spermine, mais de façon préférentielle permet la synthèse de glutamate et celle de proline, précurseur du collagène. En effet, elle est co-localisée dans la mitochondrie avec l'ornithine aminotransférase (Fig. I.1.14 et I.1.15) (Getz and Reardon, 2006; Li et al., 2001a; Marathe et al., 2006).

Elle est induite, tout comme l'iNOS, par le LPS dans les macrophages murins dérivés de moëlle osseuse (Khallou-Laschet et al., 2010) et ceux de la lignée RAW 264.7 (Gotoh and Mori, 1999). Bien que son rôle reste méconnu, elle jouerait un rôle plutôt inflammatoire comme l'ont démontré Ming et al. dans des modèles murins (Ming et al., 2012).

- TNF-alpha (« Tumor necrosis factor-alpha »)

Dernier marqueur M1 étudié, le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire soluble homotrimerique, qui comme l'IL-6 est impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation. Elle est produite principalement par les macrophages, en réponse à des stimuli inflammatoires comme par exemple l'IL-1 ou des composants de la paroi bactérienne tel le LPS. Elle est également produite par d'autres cellules telles que les cellules endothéliales, les neutrophiles, les lymphocytes CD4⁺ ou les éosinophiles (pour une revue, voir (Wajant et al., 2003)).

Cette cytokine exerce plusieurs fonctions grâce à sa liaison avec le récepteur TNFR1, exprimé dans la plupart des tissus, ou avec le récepteur TNFR2, exprimé en membrane des cellules immunitaires. Sa liaison avec TNFR1 induit l'activation de réponses associées avec l'induction de l'expression de molécules d'adhérence, de l'apoptose et de la résistance aux infections bactériennes (Mackay et al., 1993; Rothe et al., 1993; Tartaglia et al., 1993a). Sa liaison avec TNFR2 induit, quant à elle, la prolifération des cellules T notamment ((Tartaglia et al., 1993b), pour une revue voir (Wajant et al., 2003)).

Des équipes comme Boesten et al. (2005) et Branen et al. (2004) ont démontré que le TNF α intervient dans la progression de l'athérosclérose. Boesten et al. ont travaillé sur le modèle de souris transgénique *ApoE*3Leiden*, des souris hyperlipidémiques, croisé avec le modèle de souris *Tnf α ^{-/-}*. Les souris *ApoE*3 Leiden Tnf α ^{-/-}* présentent moins de lésions avancées que les souris *ApoE*3Leiden*. Les données sur ce modèle suggèrent que le TNF α induirait une augmentation de la nécrose au sein des lésions, diminuerait l'apoptose et favoriserait la progression des lésions (Boesten et al., 2005). De son côté, l'équipe de Jovinge a travaillé avec des souris *ApoE^{-/-} x Tnf α ^{-/-}*, dans lesquelles elle a observé une diminution de 50 % de la taille des lésions après 10 semaines sous régime riche en lipides (Branen et al., 2004).

De plus, le TNF α favoriserait la dégradation de la matrice via l'activation de plusieurs métalloprotéinases de matrice, facilitant ainsi l'influx de cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire (Galis et al., 1995; Rajavashisth et al., 1999).

Enfin, plusieurs études ont montré qu'une concentration plasmatique élevée en TNF α est associée avec un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires (Levine et al., 1990; Ridker et al., 1997; Ridker et al., 2000).

1.1.2.2.2 Les marqueurs M2

- ARG1 (« Arginase-1 »)

Contrairement à l'arginase-2, l'arginase-1, un marqueur M2, est une enzyme cytoplasmique (Fig. I.1.15), codée par un gène différent et exprimée de manière constitutive dans le foie. Elle est également exprimée dans les macrophages. La régulation de son expression est complexe et fait intervenir un grand nombre de facteurs de transcription, dont RXR, PPAR γ , PPAR δ , STAT6, C/EBP β , KLF, mais pas LXR (pour une revue, voir (Yang and Ming, 2014)). Elle est induite par des stimuli, tels que l'IL-4 et l'IL-13. Elle a comme fonction, à l'instar de l'arginase-2, de catalyser la dernière étape du cycle de l'urée (Gotoh and Mori, 1999; Li et al., 2001a; Marathe et al., 2006; Pesce et al., 2009; Teupser et al., 2006).

L'arginine provient de la circulation sanguine, de la dégradation de protéines intracellulaires ou de la régénération à partir de citrulline via le cycle citrulline-NO (Gotoh and Mori, 1999; Hecker et al., 1990). Dans ce cas-ci, l'ornithine sera préférentiellement convertie en polyamines (spermidine, putrescine), en raison de la co-localisation d'ARG1 avec l'ornithine décarboxylase (ODC) dans le cytosol (Fig. I.1.15) (Li et al., 2001a).

L'arginase et l'iNOS entrent donc en compétition pour la L-arginine, entraînant ainsi une diminution de la production de NO. Dans les macrophages RAW 264.7, cette diminution réduit leur apoptose (Gotoh and Mori, 1999). Elle compromet aussi la capacité de macrophages péritonéaux murins à tuer les microorganismes intracellulaires (Rutschman et al., 2001). Elle empêcherait aussi l'activation d'une réponse immunitaire excessive (Fig. I.1.19). En effet, un équilibre est nécessaire entre une activation adéquate des macrophages inflammatoires et la résolution de l'inflammation : cet équilibre permet le déclenchement de réponses immunes efficaces et ciblées (Marathe et al., 2006).

Parce que l'arginase-1 favorise la production de polyamines biogènes et de proline, elle intervient dans la prolifération cellulaire et la cicatrisation, mais aussi dans l'angiogenèse, avec comme buts finaux, la protection, le remodelage et la réparation du tissu endommagé (voir 1.1.2.1.2. Macrophages M2) (Fig. I.1.19) (Barbul, 2008; De Bandt et al., 2006; Li et al., 2001a; Mantovani et al., 2005; Marathe et al., 2006; Wolfs et al., 2011).

- MRC1 (CD206) (« Mannose receptor C-type 1 »)

Cette protéine transmembranaire de type 1 a pour fonction principale d'initier la phagocytose de microorganismes (ex.: bactéries, levures, virus, ...). Il s'agit en réalité d'une glycoprotéine, qui possède 8 domaines de type lectine C permettant la liaison à des glycoprotéines portées par des microorganismes, riches en résidus terminaux mannose, fucose ou N-acétylglucosamine, sulfatés. La liaison aux sucres se fait en présence de calcium (Boskovic et al., 2006; Harris et al., 1992; Martinez-Pomares et al., 2001). Le MRC1 est également un récepteur pour plusieurs collagènes.

Il semblerait que le récepteur au mannose soit impliqué dans le système immunitaire dans la reconnaissance du soi et du non-soi. C'est pour cette raison qu'on l'associe à la famille des PRRs (Martinez-Pomares et al., 2001).

Il joue également un rôle dans la résolution de l'inflammation, via l'endocytose d'hydrolases lysosomales, de tPA, ou de MPO. Il permet donc l'élimination de la circulation de protéines glycosylées pro-inflammatoires (Gazi and Martinez-Pomares, 2009).

- IL-10 (« Interleukin-10 »)

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire nécessaire afin de limiter le processus inflammatoire. Elle est sécrétée par les lymphocytes de type 2 et les macrophages.

Cette cytokine a pour fonction de réguler la prolifération et/ou différenciation des cellules B, cellules NK, cellules T, mastocytes, granulocytes, cellules dendritiques, kératinocytes et cellules endothéliales. De plus, elle est capable d'inhiber l'activation des cellules T, des monocytes et des macrophages (de Vries, 1995; de Waal Malefyt et al., 1991), pour une revue voir (Moore et al., 2001)).

L'IL-10 a été détectée dans les lésions athéroscléreuses précoces et avancées humaines (Mallat et al., 1999b; Uyemura et al., 1996) et son expression est associée à une faible expression de l'iNOS et à peu de mort cellulaire (Mallat et al., 1999b).

Elle a comme rôle d'inhiber plusieurs processus cellulaires jouant un rôle important dans la progression de la plaque, sa rupture ou la thrombose. En effet, elle intervient dans l'inhibition de l'activation de NFκB, de la production de MMPs, de l'expression du facteur tissulaire et de COX2, de la production de cytokines pro-inflammatoires et de la mort cellulaire ((Arai et al., 1995; Halvorsen et al., 2005; Jungi et al., 1994; Lacraz et al., 1995; Mallat et al., 1999a; Wang et al., 1995), pour une revue voir (Moore et al., 2001)).

Mallat et al. ont notamment montré que les lésions de souris C57BL/6J, déficientes pour l'*Il-10* et nourries avec un régime athérogène, accumulent trois fois plus de lipides que celles de souris WT. Ils ont également observé une augmentation de l'infiltration de cellules T, de l'expression de l'IFNγ et une diminution du contenu en collagène dans les lésions. De plus, l'injection d'IL-10 murine chez ces souris induit une diminution de 60 % de la taille des lésions (Mallat et al., 1999a).

L'IL-10 stimulerait également l'internalisation du cholestérol de lipoprotéines modifiées et augmenterait l'efflux de cholestérol des macrophages (Han et al., 2009).

- MGL2 (« Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin-2 »)

Chez l'homme, un seul gène encode MGL, tandis que chez la souris, 2 gènes encodent MGL1 et MGL2. MGL a été détecté dans les macrophages tumoraux, les histiocytes et les cellules dendritiques (Denda-Nagai et al., 2002; Higashi et al., 2002; Imai et al., 1995; Mizuochi et al., 1997; Sato et al., 1992). Cependant, la distribution tissulaire précise de MGL1 et MGL2 chez la souris n'est pas complètement établie. Denda-Nagai et al. les ont décrit en membrane des macrophages et des cellules dendritiques dans divers tissus (Denda-Nagai et al., 2010). Leur expression est également induite suite à une activation alternative des macrophages par l'IL-4 et/ou l'IL-13 (Raes et al., 2005a).

MGL1 et MGL2 participeraient à la reconnaissance de motifs glycosylés de cellules du soi altérées et de pathogènes via leur spécificité pour le galactose et la N-acétylgalactosamine (Denda-Nagai et al., 2010).

- YM1 (ou CHIL3L3 « Chitinase 3-like 3 »)

Comme MGL2 ou l'arginase-1, YM1 est exprimée seulement chez la souris. Très peu est actuellement connu sur cette protéine.

Il s'agit d'une protéine chitinase-like, bien qu'elle ne possède pas d'activité chitinase, c'est-à-dire qu'elle n'est pas capable d'hydrolyser les liens glycosidiques de la chitine (Chang et al., 2001). Elle aurait plutôt une activité β-N-acétylhexosaminidase (Harbord et al., 2002).

Elle a été qualifiée de lectine possédant une affinité spécifique pour les oligomères de GlcN, de GalN, les polymères de GlcN et l'héparine. Cette affinité pour l'héparine suggérerait, selon Chang et al. (2001), que l'héparine et l'héparan sulfate pourraient être des ligands physiologiques *in vivo*, pendant l'inflammation et/ou le remodelage tissulaire (Chang et al., 2001). L'interaction avec ses ligands se fait de manière dépendante du pH et indépendamment des ions Ca²⁺ et Mg²⁺ (Chang et al., 2001). Elle induirait également la chimotaxie des éosinophiles (Owhashi et al., 2000).

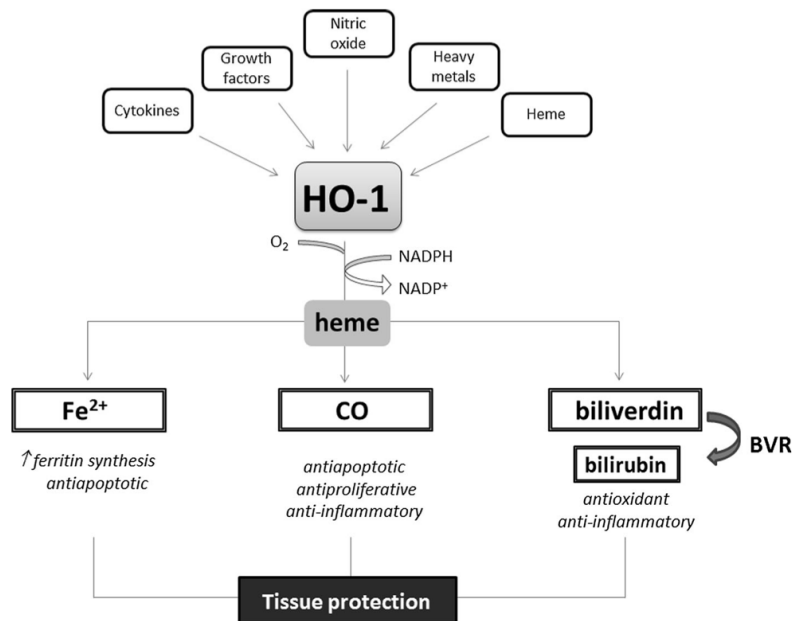


Figure I.1.23. La hème oxygénase.

La HO-1 est une enzyme constitutivement exprimée et inducible par différents facteurs tels que des cytokines (ex. : $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$), de l'oxyde nitrique (NO), des métaux lourds, le groupement hème ou des facteurs de croissance. Une fois induite, l'enzyme HO-1, en présence de NADPH, dégrade le hème en 3 produits bioactifs : les ions Fe^{2+} , le CO et la biliverdine, qui par l'action de la biliverdine réductase (BVR), est transformée en bilirubine. Ces produits ont des propriétés anti-apoptotiques, anti-prolifératives, anti-oxydantes et anti-inflammatoires, assurant la protection des tissus. (Loboda et al., 2016)

L'expression d'YM1 est augmentée dans les macrophages activés suite à une infection parasitaire. YM1 est également surexprimée dans les macrophages M2 et dans les neutrophiles (Harbord et al., 2002; Raes et al., 2005b).

1.1.2.2.3 Les marqueurs Mox

- HO-1 (« Heme oxygenase-1 »)

Afin d'étudier le phénotype Mox, les marqueurs cyto-protecteurs et antioxydants *HO-1* et *Srxn1*, dont l'expression est régulée par NRF2, ont été choisis. Chez les mammifères, il existe deux isoformes d'HO, HO-1 et HO-2. Au contraire d'HO-2 qui est constitutivement exprimé, HO-1 est une forme inductible, suite à différents stimuli tels que l'oxyde nitrique, des facteurs de croissance, des cytokines, des métaux lourds ou des lipides modifiés, par exemple (Fig. I.1.23) (Alam et al., 1999; Loboda et al., 2008). Enfin, l'hème est considéré comme un DAMP et sa présence dans le milieu extracellulaire, détectée via les PRRs tels que le TLR4, induit l'expression de *Ho-1*.

Cette enzyme catalyse l'étape limitante dans la dégradation du groupement hème, en monoxyde de carbone et biliverdine, avec libération de Fe^{2+} . L'accumulation de fer induit l'expression de la ferritine, protéine protectrice qui séquestre les ions de fer, toxiques. Avec le CO (monoxyde de carbone) qui a des propriétés anti-apoptotiques, antiprolifératives et anti-inflammatoires, la biliverdine joue un rôle protecteur. De concert avec la bilirubine, cette dernière est un antioxydant puissant (Fig. I.1.23) (Balla et al., 1992; Loboda et al., 2016).

Il a été montré que l'expression de *HO-1* augmentait aussi dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages de la paroi vasculaire lorsqu'ils sont mis en présence d'Ox-LDLs. Au contraire, l'expression d'*HO-1* ne change pas dans les cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires lorsqu'elles sont incubées avec des LDLs natives (Ishikawa et al., 1997; Wang et al., 1998; Yamaguchi et al., 1993). Il semblerait que l'expression d'*HO-1* soit induite par certains composants des Ox-LDLs, et en particulier des phospholipides oxydés contenant de l'acide arachidonique tels que le PAPC (1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-phosphatidylcholine) oxydé (Ishikawa et al., 2001a; Ishikawa et al., 2001b; Kadl et al., 2010). Elle jouerait un rôle antioxydant, prévenant le développement de l'athérosclérose. Ishikawa et al., en 1997, ont notamment montré que l'induction de l'expression d'*HO-1* par les Ox-LDLs entraîne une inhibition du recrutement des monocytes, importants dans l'évolution des plaques, l'inhibition de l'expression d'*HO-1* ayant l'effet contraire (Ishikawa et al., 1997). Il est également ressorti, dans une étude sur une cohorte de patients, que la présence d'une répétition de dinucléotides (GT) variant en longueur dans la région du promoteur d'*HO-1*, constitue un polymorphisme modulant la transcription du gène. En effet, lorsque le nombre de répétitions est faible (moins de 25 GT), *HO-1* est surexprimée et cette surexpression est associée avec un effet protecteur après angioplastie (Exner et al., 2001). De même, l'étude de Pechlaner (2015) a montré que des patients avec plus de 32 répétitions de GT présentent un risque de maladie cardiovasculaire plus élevé ainsi qu'une athérogenèse accélérée (Pechlaner et al., 2015).

- SRXN1 (« Sulfiredoxin-1 »)

Le deuxième gène marqueur des macrophages Mox est *SRXN1*. La sulfirédoxine-1 est également une enzyme anti-oxydante, à l'instar d'HO-1, et fut découverte chez la levure

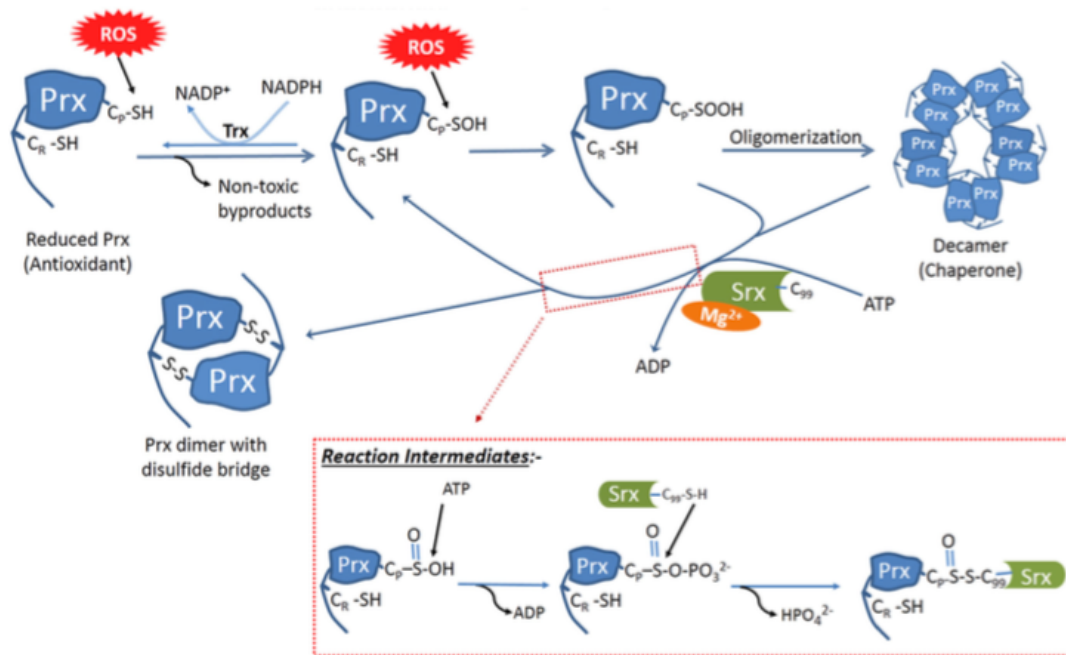


Figure I.1.24. Mode d'action de la sulfirédoxine.

La sulfirédoxine agit en tant qu'antioxydant afin de réduire la forme hyperoxydée de certaines peroxyrédoxines. En présence de Mg^{2+} et d' ATP , elle phosphoryle la peroxyrédoxine et forme un intermédiaire thiosulfinate, pouvant être réduit par d'autres enzymes réduisant les thiols. Chez la levure, la sulfirédoxine contient deux cystéines, dont la première agit de concert avec la deuxième possédant des propriétés enzymatiques afin de recycler l'intermédiaire thiosulfinate. La sulfirédoxine humaine ne contenant qu'une seule cystéine, une source extérieure de thiols, telle la thiorédoxine ou le glutathion, est donc nécessaire afin de réduire l'intermédiaire. (Mishra et al., 2015)

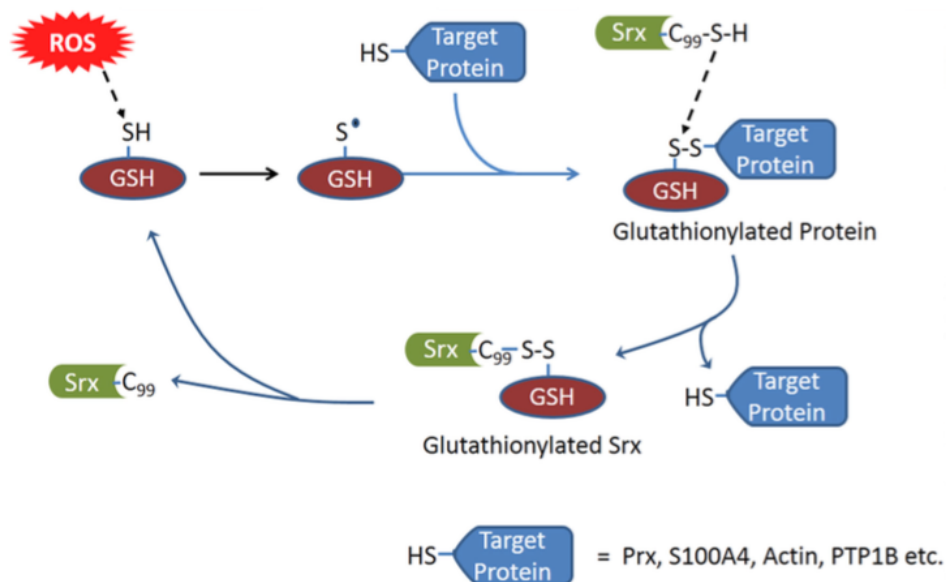


Figure I.1.25. Rôle de la sulfirédoxine dans la déglutathionylation de substrats.

Suite à un stress oxydatif, l'agent oxydant peut réagir avec la fonction GSH pour former un radical GS^* . Le GS^* peut réagir directement avec le groupement thiol d'une protéine, formant une protéine glutathionylée, empêchant ainsi l'oxydation séquentielle de groupements thiols en acide sulfonique et donc la dégradation subséquente de la protéine par le protéasome. La sulfirédoxine, grâce à son résidu cystéine conservé (C_{99}), est ensuite impliquée dans la déglutathionylation de la protéine. (Mishra et al., 2015)

par Biteau en 2003. Elle appartient à une famille d'antioxydants chez les eucaryotes, dont tous les membres possèdent un résidu cystéine conservé (Biteau et al., 2003). Elle est capable de réduire la forme hyperoxydée des peroxyrédoxines à 2 cystéines (2-Cys Prx) (Fig. I.1.24) et elle est également impliquée dans la déglutathionylation de plusieurs substrats tels que l'actine ou la « protein tyrosine phosphatase 1B » (Fig. I.1.25) (Mishra et al., 2015).

A l'heure actuelle, peu est connu sur cette enzyme. Il a cependant été montré que l'expression de *SRXN1* est régulée par les stress oxydatifs. Elle est induite en réponse à la présence d' H_2O_2 , tandis qu'une invalidation du gène codant pour *SRXN1* entraîne une diminution de la résistance à l' H_2O_2 (Biteau et al., 2003).

Enfin, une étude a été menée par Kunnas, en 2016, sur une cohorte de patients finlandais dont 336 sujets diagnostiqués avec de l'hypertension et 480 patients contrôles. Il en est ressorti que 3 polymorphismes de *NRF2* et un polymorphisme de *SRXN1* étaient associés à un risque accru d'accident cérébro-vasculaire (risque entre 5 et 14 fois plus important en fonction du polymorphisme). Ces patients présentaient une expression de *NRF2* cytoplasmique faible ainsi qu'une expression de *SRXN1* diminuée (Kunnas et al., 2016).

En plus de ces marqueurs, il peut être intéressant de combiner leur détection, par exemple, en immunocytochimie ou en immunohistochimie, avec un marqueur spécifique des macrophages, tels que F4/80 ou CD68 (Austyn and Gordon, 1981; Holness and Simmons, 1993).

1.1.2.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans la polarisation

Les différents signaux émis dans le microenvironnement cellulaire (cytokines, facteurs de croissance, PAMPs et DAMPs) mènent à la polarisation des macrophages entraînant un changement de leur phénotype et de leurs fonctions. Les mécanismes moléculaires en aval de ces signaux induisant une réponse transcriptionnelle spécifique commencent seulement à être décryptés et font l'objet de nombreuses études.

Lawrence et Natoli (2011) sont parmi les premiers à s'être penchés sur le problème. Au cours de leurs recherches, ils ont découvert que PU.1 (31 kDa-transforming protein, liant les régions riches en purine) contrôle « l'organisation génomique et le répertoire régulateur transcriptionnel des macrophages » (Fig. I.1.26) (Lawrence and Natoli, 2011).

De par la présence de PU.1, les histones H3 monométhylées au niveau de la lysine 4 (H3K4me1) se placent localement, là où PU.1 s'est lié à l'ADN, et rendent alors l'ADN accessible aux facteurs de transcription. Ceux-ci, régulés par des stimuli externes, vont pouvoir moduler la fonction des macrophages. Ils sont en plus spécifiques des stimuli reçus par la cellule (Lawrence and Natoli, 2011).

Rappelons que pour induire la **polarisation M1**, on combine généralement l' $IFN\gamma$ avec un activateur de $NF\kappa B$, que ce soit le $TNF\alpha$ ou le LPS (Fig. I.1.27). En effet l' $IFN\gamma$ seul a la propriété de préparer le macrophage (« priming »), en activant le facteur de transcription STAT1 (Fig. I.1.28), mais ne suffit pas pour induire la polarisation (Mosser, 2003; Palsson-McDermott and O'Neill, 2004).

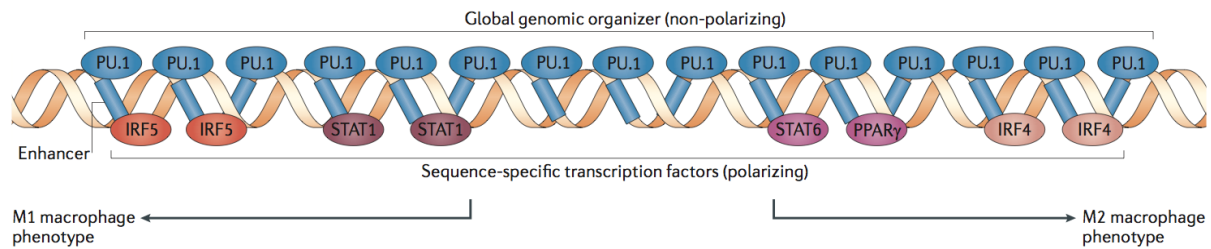


Figure I.1.26. Contrôle transcriptionnel de la polarisation chez les macrophages.

Les histones H3 monométhylées au niveau de la lysine 4 se placent localement lorsque PU.1 (31 kDa-transforming protein, liant les régions de l'ADN riches en purine) est lié à l'ADN : l'ADN est alors accessible aux facteurs de transcription, déterminant le phénotype du macrophage. La liaison de STAT1 (« signal transducer and activator of transcription-1 ») et IRF5 (« interferon-regulatory factor-5 ») régule l'expression de gènes marqueurs M1, tandis que la liaison de STAT6, IRF4 et PPAR γ (« peroxisome proliferator-activated receptor- γ ») régule l'expression de gènes marqueurs M2.

(Lawrence and Natoli, 2011)

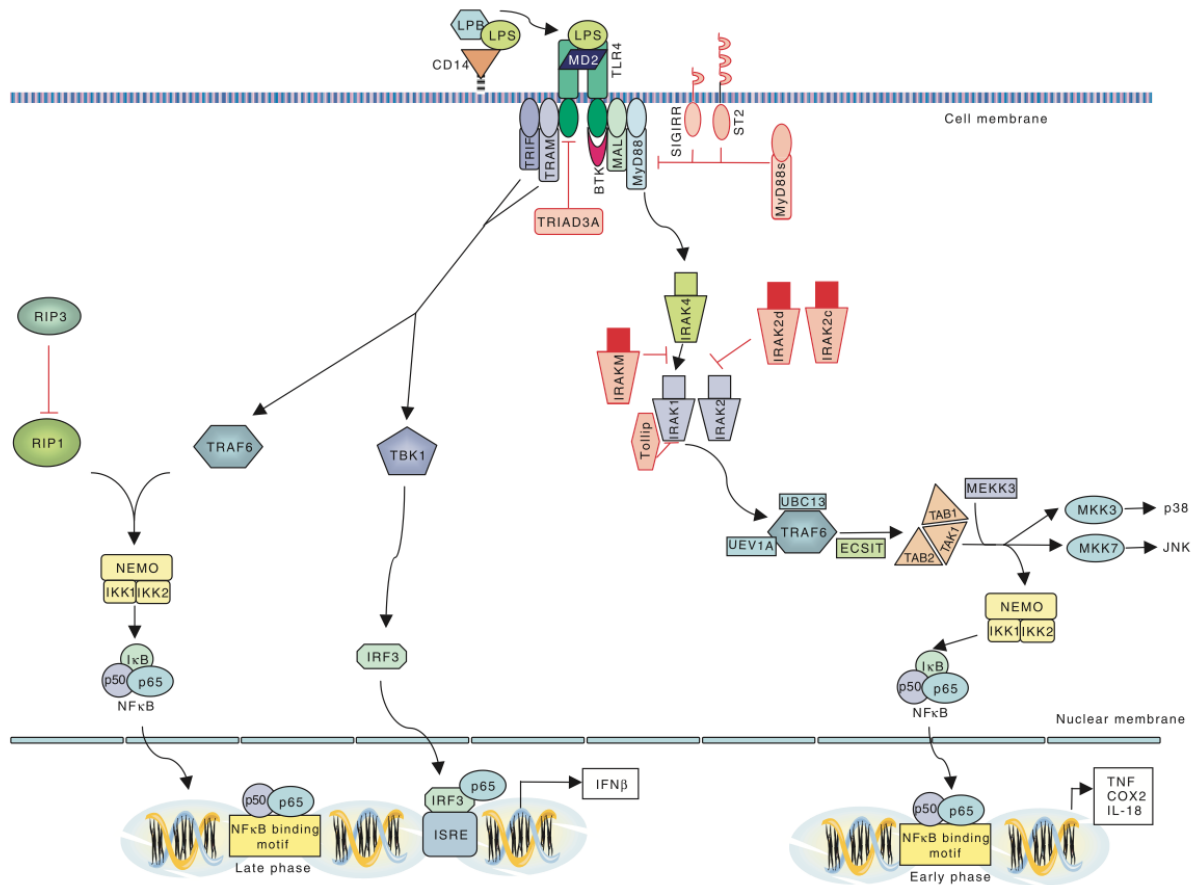


Figure I.1.27. Voie de signalisation du LPS.

La LBP (« LPS-binding protein ») circulant dans le plasma, reconnaît et se lie au LPS afin de l'acheminer au CD14. Cette liaison permet la reconnaissance et le transfert du LPS au complexe composé du récepteur TLR4 homodimérisé ainsi que de deux molécules adaptatrices extracellulaires, appelées MD-2.

La liaison du LPS au complexe TLR4 induit l'activation d'une voie dépendante de la protéine MyD88 ainsi que l'activation d'une voie indépendante de MyD88. Dans le cas de la voie dépendante, la liaison du LPS au complexe TLR4 induit le recrutement de MyD88 et MAL. MyD88 interagit ensuite avec la protéine IRAK4 (« IL-1R-associated kinase »), ce qui provoque sa phosphorylation et activation subséquente. Une fois activée, IRAK4 induit l'activation d'IRAK1 et IRAK2, qui interagissent ensuite avec TRAF6 (« TNF-receptor associated factor 6 ») et l'activent. Cette dernière s'associe avec TAB-2 (« TAK-1 binding protein-2 »), activant à son tour la MAPK kinase TAK-1 (« transforming growth factor-B-activated kinase »), qui est constitutivement associée à TAB-1, protéine adaptatrice. TAB-1 active à son tour le complexe IKK, formé de IKK α (« inhibitory-binding protein kB kinase »), de IKK β et de NEMO (ou IKK γ). Ce complexe active NF κ B via la phosphorylation de I κ B (« inhibitory-binding proteins kB »), entraînant l'ubiquitinylation et la dégradation de I κ B et donc la libération de NF κ B, sa translocation vers le noyau et l'induction de la transcription de gènes pro-inflammatoires. TAB-1 active également les voies des MAPK p38 et JNK (« cJun N-terminal kinase »).

La voie indépendante de MyD88 est médiée via TRIF (TICAM-1) (« TIR-containing adapter molecule ») associée à la protéine adaptatrice TRAM (TICAM-2) (« TRIM-related adapter molecule »), ressemblant structurellement à MAL. Ceci induit l'activation de TBK-1 (« TANK-binding protein »), une kinase d'IRF3 qui la phosphoryle et l'active donc, permettant sa translocation dans le noyau. IRF3 se lie ensuite à ISRE (« interferon-sensitive response element »), induisant la transcription de gènes pro-inflammatoires dont l'IFN β . p65, une sous-unité de NF κ B, est nécessaire pour l'activation de ISRE. L'association de TRIF et TRAM au complexe TLR4 induit également l'activation de TRAF6 et donc de NF κ B (voir voie dépendante). TRIF joue donc un rôle important dans l'activation d'IRF3 et l'induction de l'IFN β . Cependant, il a un impact moins puissant sur l'activation de NF κ B par rapport à la voie de MyD88.

(En rouge : TRIAD3A, SIGIRR et ST2, MyD88s, IRAKM, Tollip, IRAK2d et IRAK2c, régulateurs négatifs. Ucv1a et Ubc13 : ubiquitin ligases de TRAF6.)

(Palsson-McDermott and O'Neill, 2004)

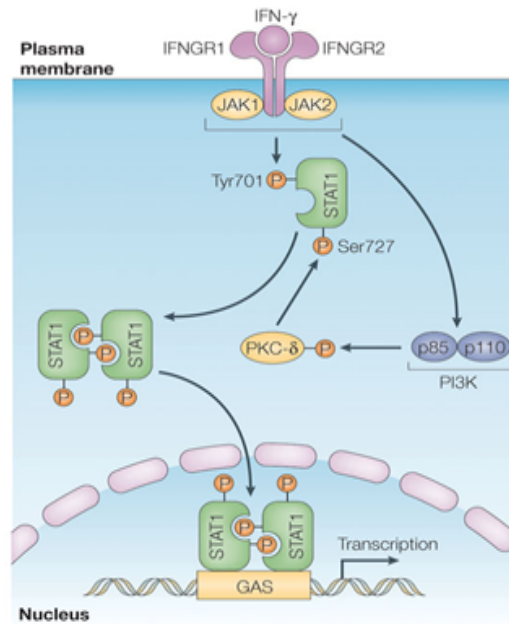


Figure I.1.28. Voie de signalisation de l'IFN γ .

La liaison de l'IFN γ avec les récepteurs IFNGR1 et IFNGR2 hétérodimérisés induit l'autophosphorylation et l'activation de JAK2, permettant la transphosphorylation de JAK1 par JAK2. JAK1, ainsi activé, phosphoryle les résidus tyrosine au niveau du récepteur IFNGR1 afin de permettre le recrutement de STAT1 via les domaines SH2. STAT1 est ensuite phosphorylé, probablement par JAK2, ce qui permet la dissociation de l'homodimère STAT1 du récepteur et sa translocation dans le noyau. L'homodimère STAT1 s'associe enfin à GAS (« γ -activated-IFN sequence »), permettant la transcription de gènes pro-inflammatoires sous le contrôle de l'IFN γ . L'IFN γ est également capable d'induire l'activation de la voie PI3K. (<http://www.biologicscorp.com>, 2016)

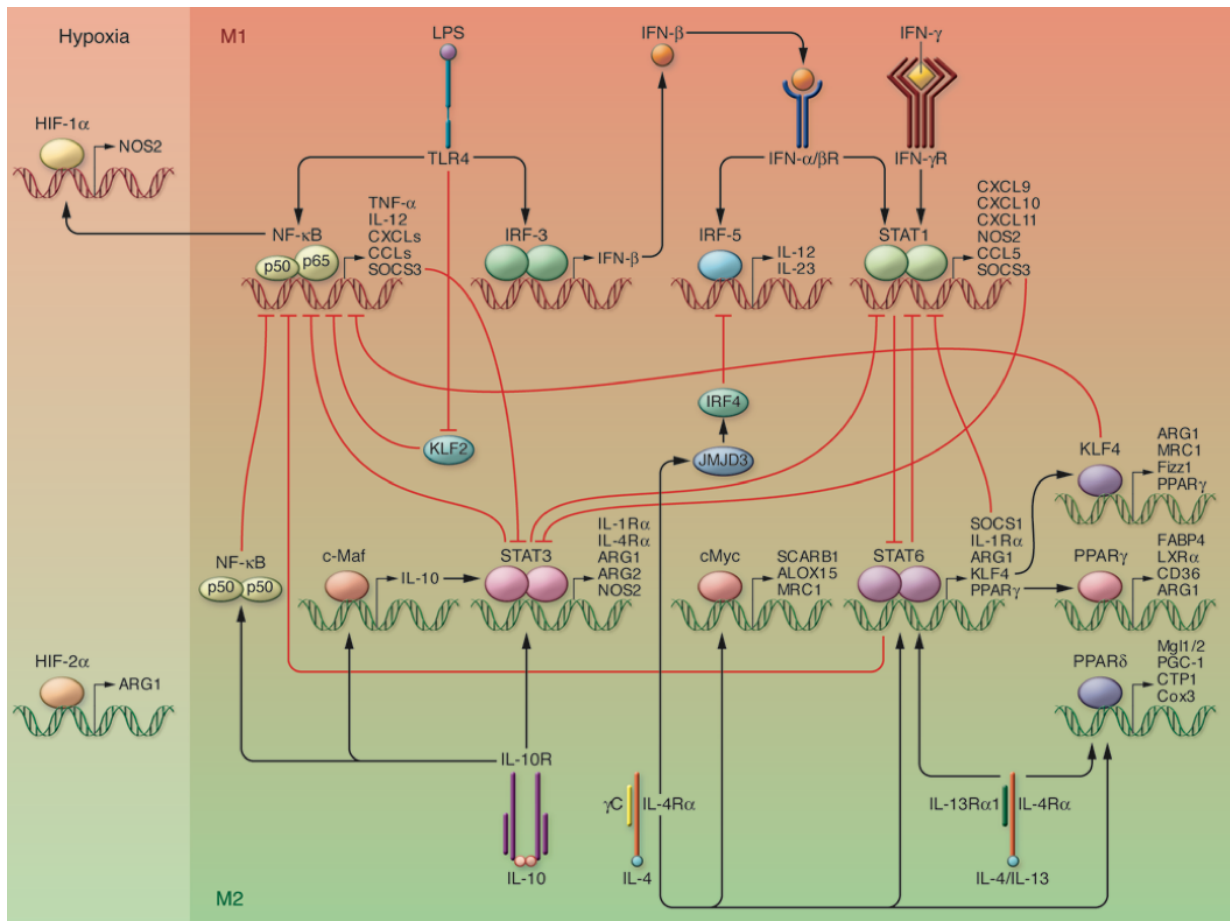


Figure I.1.29. Mécanismes moléculaires de la polarisation des macrophages.

L'activation des facteurs de transcription NFκB (p50-p65) et IRF3, mais aussi IRF5 et STAT1 induit la polarisation des macrophages en cellules M1, via l'induction de la transcription de gènes pro-inflammatoires. Cette activation se produit respectivement, via la liaison du LPS au récepteur TLR4, via la liaison de l'IFNβ au récepteur IFN de type I (IFN-α/βR) ou de l'IFNγ au récepteur IFN de type II (IFN-γR).

A l'inverse, les macrophages sont polarisés en M2 via la liaison de l'IL-10 à son récepteur (IL-10R) ou de l'IL-4 et/ou IL-13 à leur récepteur (IL-4Rα et IL-13Rα1/IL-4Rα). Ceci permet l'activation de STAT3, c-MAF et NFκB (p50-p50) par l'IL-10, cMyc et PPARδ par l'IL-4 seule et STAT6 et PPARδ par l'IL-4/IL-13. STAT6, via la transcription de gènes anti-inflammatoires, induit également l'activation des facteurs de transcription PPARγ et KLF4, contribuant de même à la polarisation M2. Afin de permettre un équilibre dans l'induction de ces deux types de polarisation, il existe de plus des voies inhibitrices. En effet, l'IL-4 induit également l'activation de JMJD3 et donc d'IRF4, inhibant ainsi la polarisation M1 médiée par IRF5. STAT6 inhibe, de même, l'action de STAT1 (directement ou via SOCS1) et de NFκB (p50-p65). L'activation de NFκB (p50-p65) est elle-même inhibée par NFκB (p50-p50), STAT3, KLF2 et KLF4. STAT3 induit aussi l'inhibition de l'activation de STAT1, tandis que ce dernier inhibe celle de STAT6 et STAT3 via SOCS3.

Enfin, il semblerait que NFκB (p50-p65) intervienne dans l'activation de la transcription de l'*iNOS* (marqueur M1), médiée par HIF-1α. HIF2α, lui, serait exprimé dans les macrophages M2 et permettrait la transcription de l'*Arg1* (marqueur M2).

(Sica and Mantovani, 2012)

Dans le cadre de la **polarisation M1**, trois facteurs de transcription clés ont déjà été identifiés (Fig. I.1.29):

- NFκB, sous sa forme hétérodimérisée p50-p65, qui est activé suite à la liaison de cytokines inflammatoires ou de PAMPs à un récepteur de surface dont les TLRs, induisant la transcription de gènes pro-inflammatoires, dont l'*IL-12* et le *TNFα* ;
- STAT1, activé par les voies dépendantes de l'IFNγ et de l'IFNα, régulant l'expression de plusieurs chémokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL5) et de l'iNOS, considérées comme marqueurs des macrophages M1 ;
- IRF5, activé en réponse à l'IFNγ, important dans l'induction de la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que l'*IL-12*, l'*IL-23*, le *TNFα* et l'*iNOS*, des récepteurs (ex. : IL-18R) ou des protéines d'adhérence telles que ICAM1 (Fig. I.1.29) (Krausgruber et al., 2011; Sica and Mantovani, 2012).

Pour la **polarisation M2**, nous avons sélectionné le cocktail d'IL-4 et d'IL-13, dont les voies de transduction de signal sont illustrées à la figure I.1.30. D'autres auteurs utilisent également l'IL-10 (Fig. I.1.31) (Fioranelli and Grazia, 2014).

On voit donc que comme pour la polarisation M1, des facteurs de transcription clés ont été identifiés (Fig I.1.29).

Citons tout d'abord STAT6. Parmi les gènes cibles de STAT6, se trouvent les facteurs de transcription KLF4 (« Krüppel-like factor 4 ») et PPARγ (« peroxisome proliferator-activated receptor-γ»). KLF4 coopère avec STAT6 dans l'induction des gènes anti-inflammatoires tels que *MRC1*, *Arg1*, *Fizz1*, mais aussi *PPARγ* et inhibe la transcription de gènes pro-inflammatoires induite par NFκB en séquestrant les co-activateurs p300/CBP essentiels à l'activation de NFκB (Fig. I.1.29) (Liao et al., 2011). PPARγ, quant à lui, inhibe également la transcription des gènes pro-inflammatoires dépendante de NFκB et AP-1 en s'associant aux complexes répresseurs NCoR (« nuclear receptor corepressor ») et SMRT (« silencing mediator of retinoic-acid and thyroid-hormone receptors ») et induit la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, tel que *LXR* (Fig. I.1.29) (Pascual et al., 2005; Ricote and Glass, 2007; Ricote et al., 1998). Enfin, c-Myc, dont l'expression et la translocation dans le noyau est induite par l'IL-4, induit la transcription du gène marqueur M2, *MRC1*, de l'enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acide arachidonique *ALOX-15* (« arachidonate 15-lipoxygenase ») et du récepteur de HDLs, *SCARB1* (« scavenger receptor class B-1 ») (Fig. I.1.29) (Pello et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012).

Il faut aussi souligner que certaines voies activées par un environnement M2 contrecarrent les voies de signalisation de type M1. Ainsi SOCS1 (« Suppressor of cytokine signaling protein-1 »), régulé positivement par STAT6, inhibe la voie STAT1. Inversement, SOCS3, régulé positivement par p50-p65 et par STAT1, inhibe la voie STAT3 (Fig. I.1.29).

La polarisation des macrophages est également régulée par des mécanismes épigénétiques (pour une revue, voir (Ivashkiv, 2013; Takeuchi and Akira, 2011)). Une stimulation « TLR » induit une acétylation des histones et celle-ci est impliquée dans l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires et donc dans la **polarisation M1** des macrophages (Fig. I.1.32). Les histones acétylées sont reconnues par les protéines BET (Bromodomaine et domaine Extra-Terminal) dont certaines (telle BRD4) interagissent avec des Cdk-cyclines (tel l'hétérodimère Cdk9-cycline T alias P-TEFb) afin de stimuler l'élongation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II, ce qui est illustré à

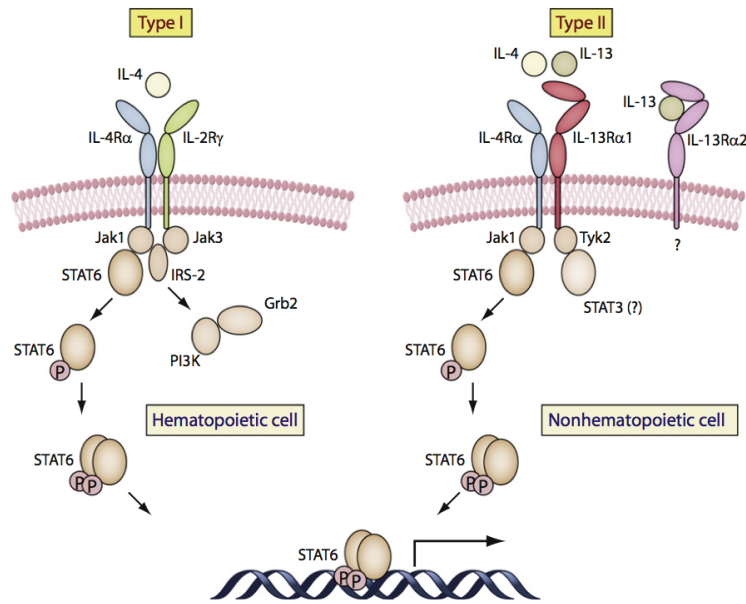


Figure I.1.30. Voie de l'IL-4 et de l'IL-13.

L'interleukine-4 (IL-4) se lie au récepteur IL-4R α , permettant le recrutement soit de l'IL-2R γ (récepteur de type I), soit de l'IL-13R α 1 (récepteur de type II), exprimés en surface de cellules hématopoïétiques ou non-hématopoïétiques respectivement. Les macrophages expriment, quant à eux, les deux types de récepteurs. Cette liaison induit la phosphorylation et donc l'activation de STAT6 via la kinase JAK3 pour le récepteur de type II et la kinase JAK1 pour les deux types de récepteurs. Une fois activé, STAT6 s'homodimérise et est transloqué vers le noyau, permettant la transcription de gènes anti-inflammatoires.

L'IL-13 n'est capable de se lier qu'à la chaîne l'IL-13R α 1 du récepteur de type II, induisant une activation similaire de STAT6. Il est également capable de se lier à l'IL-13R α 2, servant probablement de récepteur « leurre » (« decoy »).
(Gordon and Martinez, 2010)

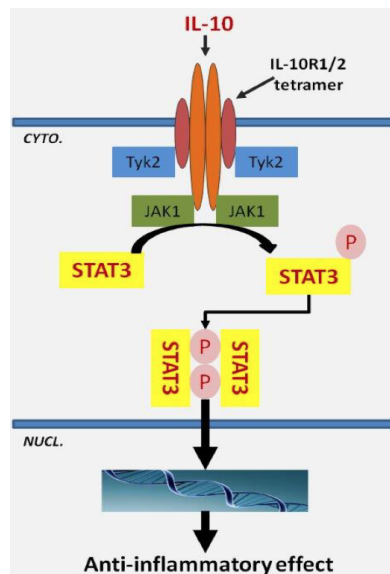


Figure I.1.31. Voie de l'IL-10.

La liaison de la cytokine IL-10 à son récepteur IL-10R induit la phosphorylation de STAT3 via la kinase JAK1, après phosphorylation des résidus tyrosine (TYK2) au niveau du récepteur afin de permettre l'attachement des domaines SH2 de STAT3. STAT3, activé, s'homodimérise et est transloqué vers le noyau, permettant la transcription de gènes anti-inflammatoires.
(Fioranelli and Grazia, 2014)

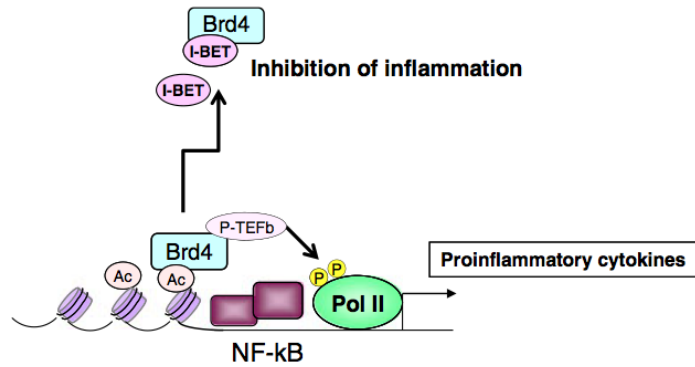


Figure I.1.32. Régulation de l'activation des gènes marqueurs M1 et M2.

Les histones acétylées sont reconnues par les protéines BET (bromodomaine et domaine extra-terminal). Une de ces protéines, BRD4, est capable d'interagir avec P-TEFb (l'hétérodimère CDK9-cycline T), ce qui a pour conséquence d'induire l'élongation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II et donc l'expression de gènes pro-inflammatoires. Cependant, afin de limiter les dégâts cellulaires, l'I-BET (« inhibitor of BET protein ») peut interagir avec le bromodomaine : il s'ensuit une répression de l'expression de ces gènes via la déstabilisation des complexes de chromatine.

(Takeuchi and Akira, 2011)

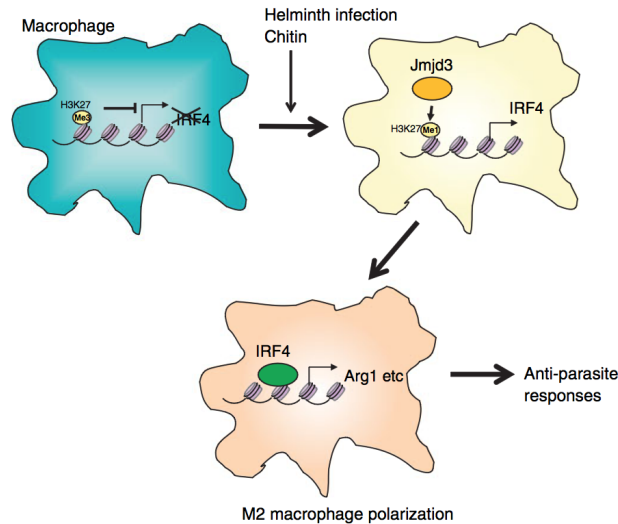


Figure I.1.33. Régulation de la polarisation M2.

JMJD3 (« Jumonji-C (JMJC) domain-3 ») a comme action de déméthyler les histones H3K27 triméthylées en histones monométhylées. L'ADN est alors accessible aux facteurs de transcription STAT6, IRF4 et PPAR γ , ce qui permet l'expression des gènes marqueurs M2 tels que l'*Arginase-1* chez la souris. (Takeuch and Akira, 2011)

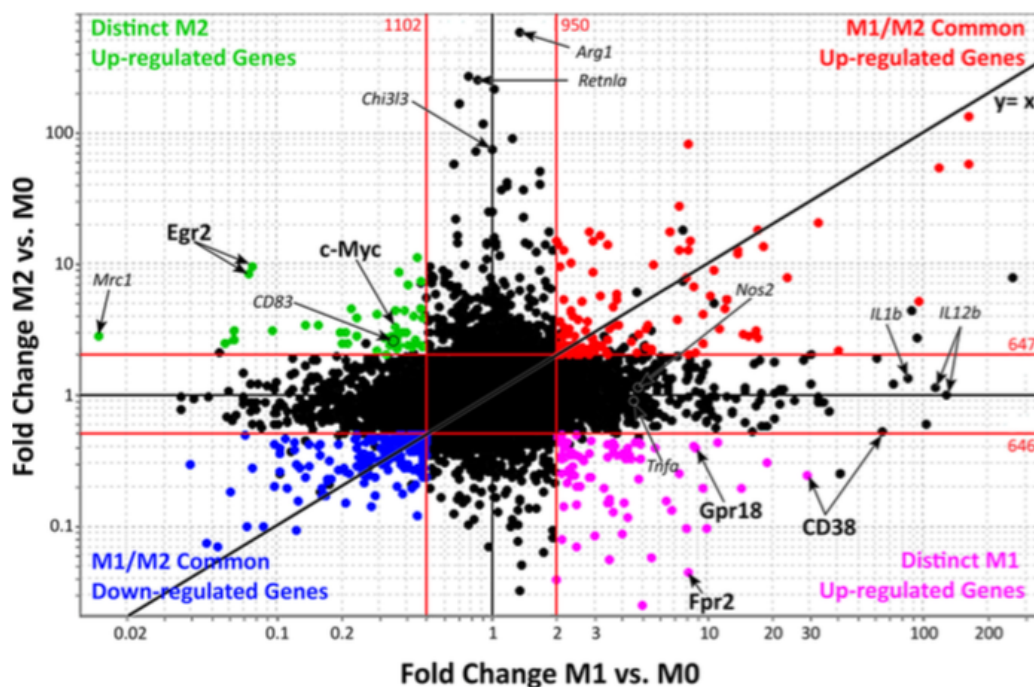


Figure I.1.34. Comparaison de gènes exprimés par les macrophages M1 et/ou M2.

Des micro-damiers Affymetrix M430 2.0 ont été hybridés avec de l'ADNc provenant de macrophages polarisés M0, M1 et M2 *in vitro*, afin d'identifier de nouveaux gènes marqueurs M1 et M2.

En gras, sont inscrits les gènes M1 (*Gpr18*, *Cd38*, *Fpr2*) et M2 (*Egr2*, *c-Myc*) considérés comme marqueurs strictement M1 ou M2, respectivement.

Rouge : surexpression de gènes communs pour les macrophages M1 et M2; bleu : expression diminuée des gènes communs pour les macrophages M1 et M2; vert : gènes M2 surexprimés ; violet : gènes M1 surexprimés.

Les flèches indiquent des gènes strictement M1 ou M2. Les lignes rouges représentent un cut-off de ± 2 fold change. (Jablonski et al., 2015)

la figure I.1.32 pour des gènes NFκB dépendants. De plus, il a été découvert que l'I-BET (« Inhibitor of BET proteins ») est capable d'interagir avec le bromodomaine et de supprimer l'expression des gènes pro-inflammatoires en déstabilisant ces complexes de chromatine, régulant ainsi la réponse dans le but d'éviter trop de dommages aux cellules et à l'ADN (Fig. I.1.32) (Ivashkiv, 2013; Nicodeme et al., 2010; Takeuch and Akira, 2011).

Par contre, dans le cas d'une **polarisation M2**, JMJD3 (alias KDM6B) est indispensable (sauf pour les macrophages M2 générés à partir d'un stimulus IL-4) puisqu'il agit en tant que déméthylase des histones H3K27. Les histones H3K27 triméthylées deviennent monométhylées et l'ADN devient accessible aux facteurs de transcription STAT6, PPARγ et IRF4 (Fig. I.1.33) (Ivashkiv, 2013; Lawrence and Natoli, 2011; Takeuch and Akira, 2011).

La spécificité de l'état de polarisation, et plus précisément l'activation des gènes en réponse aux stimuli, est aussi liée à plusieurs caractéristiques génomiques. En effet, elle dépendra notamment de la combinaison des « sites de liaison des facteurs de transcription et/ou du contenu en îlots CpG » au niveau du promoteur. Par exemple, une stimulation avec le LPS induira l'activation des facteurs de transcription, qui se lieront au niveau de ces îlots CpG, pauvres en nucléosomes, préalablement déméthylés au niveau de la cytosine. C'est le cas pour les promoteurs des gènes encodant le TNFα, la SOD-2 (superoxyde dismutase-2) et la COX-2 (cyclooxygénase-2 inducible) (Lawrence and Natoli, 2011; Takeuch and Akira, 2011).

Enfin signalons les travaux récents de Lu et al. (2016) comparant les transcriptomes d'ARNm et miRNA de macrophages murins M1 et M2, à différents temps de polarisation. Ces auteurs ont identifié un nombre limité de miRNA spécifiques aux macrophages M1 et M2, qui pourraient jouer un rôle dans les étapes précoces de la polarisation (Lu et al., 2016). De même, les travaux de Jablonski et al. ont permis d'identifier des gènes marqueurs canoniques M1, tels que l'*iNOS*, *Il-1β*, *Il-7*, *Il-12β*, *Tnfα*, *Cd38* ou *Ccr7*, et M2, tels que l'*Arg1*, *Ym1*, *Egr2* (« *early growth response protein 2* ») ou *Mrc1*. Mais ils ont surtout permis de mettre en évidence des gènes marqueurs considérés comme strictement M1 (*Cd38*, *Gpr18* « *G-protein coupled receptor 18* ») ou strictement M2 (*Egr2*, *c-Myc*) (Fig. I.1.34) (voir (Jablonski et al., 2015)).

En résumé, la polarisation des macrophages est contrôlée via des mécanismes transcriptionnels et par des mécanismes épigénétiques, qu'il s'agisse de modifications d'histones ou de séquences génomiques particulières tels les îlots CpG modulant la stabilité des nucléosomes.

1.1.2.4 Sources des macrophages afin d'étudier la polarisation *in vitro*

Les études sur les macrophages et les processus de polarisation sont en pleine expansion (ex. : (Benoit et al., 2008; Gordon, 2003; Gordon and Martinez, 2010; Hirose et al., 2011; Lopez-Castejon et al., 2010; Mantovani et al., 2009; Mantovani et al., 2004; Mege et al., 2011; Porcheray et al., 2005). Actuellement, les stimuli de polarisation utilisés sont relativement similaires (à l'exception de modes de polarisation alternatifs tels que le GM-CSF pour la polarisation M1 et le M-CSF pour la polarisation M2) (Fleetwood et al., 2007; Martinez et al., 2006; Takeuch and Akira, 2011).

MACROPHAGE POLARIZATION IN WOUND HEALING

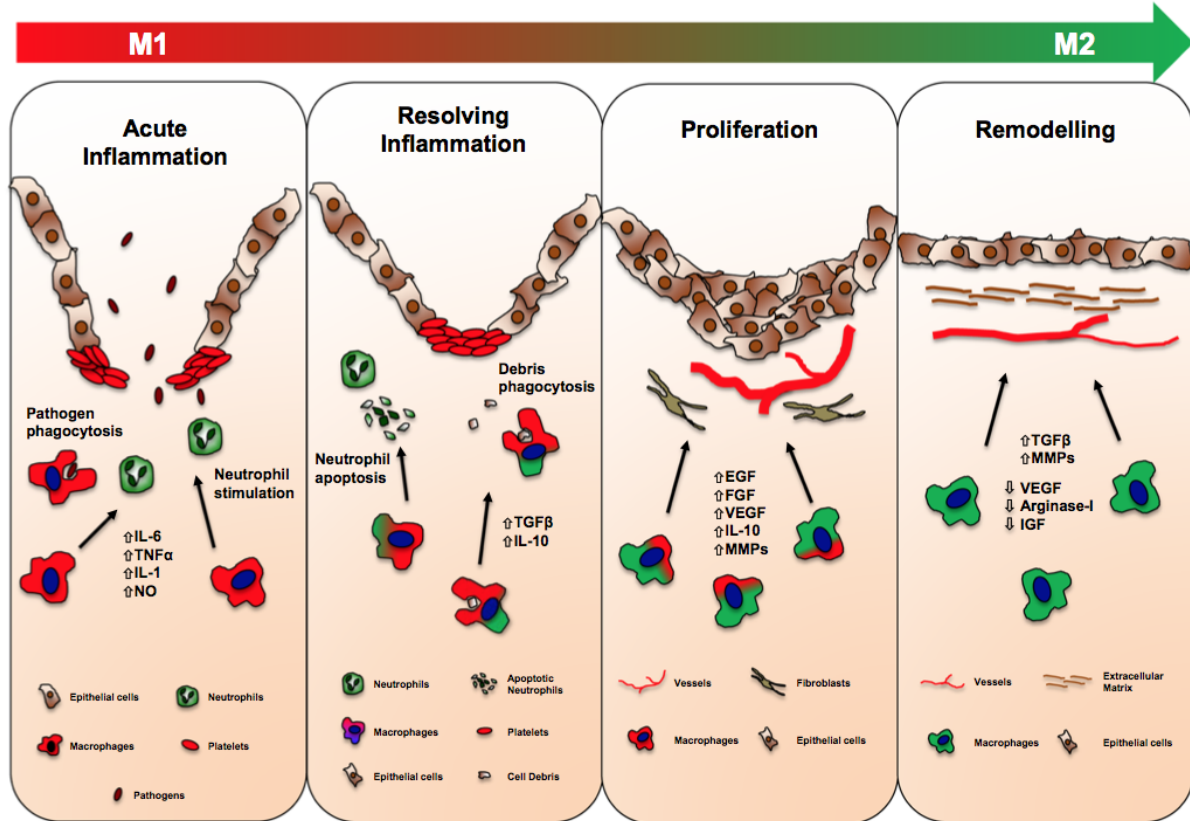


Figure I.1.35. Polarisation des macrophages dans le cas de la réparation tissulaire.

Les macrophages changent de phénotype, passant de M1 à M2, au cours des étapes de la réparation tissulaire. En effet, au moment de la phase aiguë de l'inflammation, les macrophages M1 sécrètent des cytokines et médiateurs pro-inflammatoires (IL-6, TNF α , IL-1, NO), permettant de stimuler les cellules immunitaires et de défendre l'hôte contre les microorganismes.

Pendant la phase de résolution de l'inflammation, les macrophages M1 initieraient un « switch » du phénotype M1 en M2, ce qui s'accompagne d'une diminution de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires, une augmentation de l'expression des marqueurs anti-inflammatoires telles que les cytokines IL-10 et TGF β et de la phagocytose des neutrophiles et débris cellulaires. Les macrophages évoluent ensuite vers un phénotype encore plus anti-inflammatoire, permettant la production de plusieurs facteurs de croissance (EGF, VEGF) induisant la prolifération de plusieurs types cellulaires participant à la réparation du tissu. Enfin, au cours de la phase de remodelage, les macrophages M2, devenus prédominants, participent à la maturation du tissu, via la réorganisation de la matrice extracellulaire et du système vasculaire et en participant à la cicatrisation du tissu.

(Sica et al., 2015)

Cependant, la source des macrophages utilisés n'est pas toujours identique et il faut, de plus, distinguer ce qui est décrit chez la souris ou chez l'homme (Tableau I.1.5).

Chez la souris, il existe à la fois plusieurs sources possibles de macrophages et plusieurs « backgrounds » génétiques (généralement, les souris C57BL/6 ou les souris Balb/c).

Par exemple, l'équipe de Caligiuri a choisi de travailler sur des précurseurs myéloïdes qu'ils isolent à partir de la moelle osseuse de fémurs de souris C57BL/6 ou de souris *ApoE*^{-/-}, âgées de 6 à 10 semaines. Ces précurseurs sont mis en culture, se différencient en monocytes et ces derniers, via l'ajout de M-CSF (ou de milieu conditionné issu de fibroblastes L-929 (Pireaux et al., 2016)), se différencient en macrophages (Khallou-Laschet et al., 2010).

Des macrophages tissulaires sont également utilisés dans ce type de recherche. Il s'agit le plus souvent de macrophages prélevés à partir de la cavité péritonéale des souris (C57BL/6 dans le cas de recherches menées par Lopez-Castejón) après injection de thioglycollate stérile, un agent inflammatoire (Lopez-Castejon et al., 2010; Pelegrin et al., 2008).

Chez l'homme, pour des raisons éthiques, ce sont les monocytes circulants périphériques qui sont généralement utilisés. Ils sont isolés directement à partir de donneurs sains humains via centrifugation par gradient de densité, et sont ensuite différenciés en macrophages après adhérence au plastique en présence de sérum, puis via l'addition de M-CSF dans le milieu de culture (Hirose et al., 2011).

Dans certaines études, les précurseurs peuvent également être isolés à partir du sang de cordon ombilical (Marchetti et al., 2011) ou bien à partir de fibroblastes de prépuce donnant lieu à des cellules souches pluripotentes induites (iPSC « induced pluripotent stem cells ») (Spiller et al., 2015). Enfin, les cellules monocytaires de la lignée THP-1 sont également utilisées, mais requièrent d'abord une étape de différenciation préliminaire en macrophages, avant d'initier le processus de polarisation (Genin et al., 2015).

Il est important de noter qu'en fonction des protocoles de différenciation, les macrophages n'auront pas d'emblée un phénotype identique, caractérisé par l'expression de gènes marqueurs spécifiques ou les mêmes fonctionnalités. Par exemple, on constate que des macrophages recrutés avec le thioglycollate, ont une activité phagocytaire élevée et produisent beaucoup de ROS par rapport aux macrophages péritonéaux résidents (Kondo et al., 1997; Zhang et al., 2008). Le modèle cellulaire et le cocktail de polarisation utilisés sont donc des paramètres importants à prendre en considération lors des analyses de résultats.

1.1.2.5 Polarisation des macrophages *in vivo*

Sur base des profils d'expression génique typiques des macrophages M1 et M2, des propriétés pour ces deux phénotypes principaux ont été proposées dans le contexte de la réponse inflammatoire, de son initiation à la résolution et à la réparation tissulaire (Fig. I.1.35) (Sica et al., 2015). *In vivo*, l'identification du phénotype des macrophages a été tentée, sur base de l'expression de quelques uns des gènes marqueurs (voir 1.1.2.2 Marqueurs géniques de la polarisation), mais le rôle et la régulation de la polarisation des macrophages *in vivo* ne sont pas encore totalement compris.

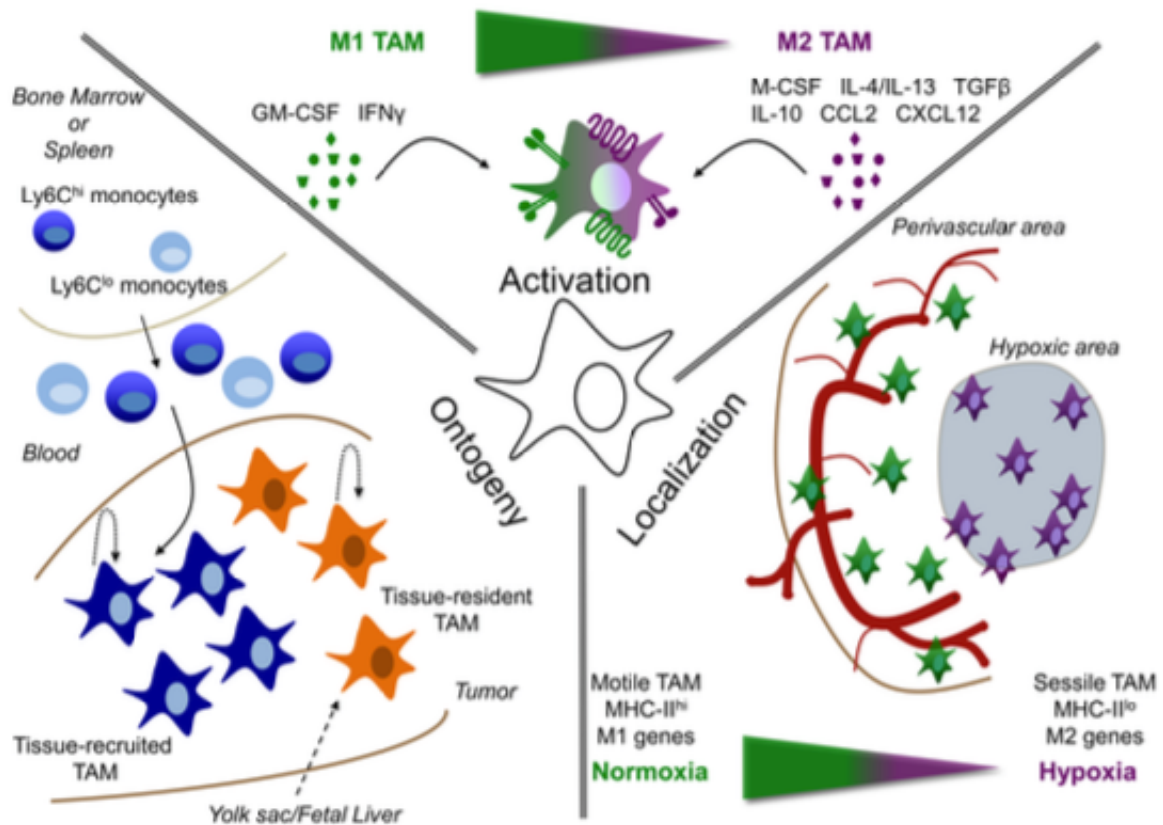


Figure I.1.36. Hétérogénéité des TAMs (« tumor-associated macrophages »).

Les TAMs sont hétérogènes en fonction de leur ontogénie, de leur activation et de leur localisation. En effet, les TAMs dérivent soit des macrophages tissulaires résidents, qui eux-mêmes proviennent de précurseurs issus de la vésicule vitelline ou du foie fœtal, soit dérivent des monocytes circulants. De plus, en fonction des stimuli du microenvironnement, les TAMs acquièrent un phénotype M1, M2 ou intermédiaire. Enfin, leur localisation dans la tumeur est également importante puisque les TAMs présents dans les zones hypoxiques (M2) auront un phénotype différent des TAMs présents dans les zones normoxiques (M1).

(Van Overmeire et al., 2014)

Les fonctions principales des macrophages M1 et M2 semblent relativement comparables et conservées entre le modèle humain et le modèle murin (voir aussi (Murray, 2016)). Néanmoins, les marqueurs géniques choisis pour les discriminer diffèrent entre ces deux espèces.

Comme mentionné plus haut, déjà au niveau des monocytes humains, l'expression de CD16 et de CD14 permet d'identifier plusieurs sous-populations. Tandis que chez la souris, cette distinction se fait principalement sur base de l'expression de l'antigène Ly6C (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011; Wong et al., 2012; Yona and Jung, 2010).

Dans le cas des macrophages, la polarisation M2 est associée à l'expression d'*Ym1* (« *chitinase 3-like 3 lectin* » ou *Ch3l3*), de *Fizz-1* (« *transcription factor found in inflammatory zone 1* ») et d'*Arg1* (« *arginase-1* ») chez la souris, alors que la polarisation M1 est associée à une surexpression de l'*iNOS* et de l'*Il-6*. Chez l'homme, la polarisation M2 semble être plus associée à une augmentation de l'expression de l'*IL-10* et de l'*IL-1Ra* (« *IL-1R antagonist* ») ainsi que de l'*IDO* (« *indoléamine 2,3-dioxygénase* »). La polarisation M1 est, quant à elle, liée à l'augmentation de l'expression de l'*IL-12* et l'*IL-23* (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011).

Murray (2016) a émis l'hypothèse que ces différences pourraient s'expliquer par le fait que chez l'homme, ce sont des monocytes qui sont généralement utilisés comme source de macrophages, alors que chez la souris, on utilise généralement les macrophages dérivés de précurseurs de la moelle osseuse ou des macrophages péritonéaux (Murray, 2016).

Les fonctions exactes des macrophages polarisés restent donc loin d'être complètement comprises. Par contre, la polarisation des macrophages est souvent évoquée en relation avec certaines pathologies chroniques et en particulier les cancers, l'obésité et l'athérosclérose.

Les macrophages joueraient des rôles différents dans les cancers en fonction du microenvironnement rencontré et donc en fonction de leur état de polarisation. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs ou « tumor-associated macrophages ») peuvent à la fois empêcher la croissance des tumeurs, ce qui est associé au phénotype M1 ou promouvoir leur croissance et dissémination, ce qui est associé au phénotype M2 (Sica et al., 2008). Cependant, il a été montré que l'infiltration de TAMs M2 est souvent associée avec un mauvais pronostic pour différents types de cancer (maladie de Hodgkin, gliome, cholangiocarcinome, carcinome du sein, ...) (Van Overmeire et al., 2014); (Chen et al., 2011a; Steidl et al., 2010). La raison principale pour expliquer ces observations est que la progression tumorale s'accompagne d'un « switch » phénotypique de TAMs M1 en TAMs M2, d'autant plus que l'hypoxie favorise également le phénotype M2 (Fig. I.1.36) (Van Overmeire et al., 2014).

Des macrophages M1 et M2 ont également été identifiés dans le tissu adipeux et certaines données suggèrent un « switch » phénotypique, de M2 à M1 induit par l'obésité (Fig. I.1.37) (pour une revue, voir (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011)). Les adipocytes de patients obèses produisent en effet des médiateurs (ex. : CCL2, TNF α , acides gras libres) induisant le recrutement des ATMs (« adipose tissue macrophages ») et leur activation. Ces derniers, activés, produisent des cytokines inflammatoires (ex. : TNF, IL-1 β , IL-6), contrecarrant l'action de l'adiponectine et de la leptine dans la

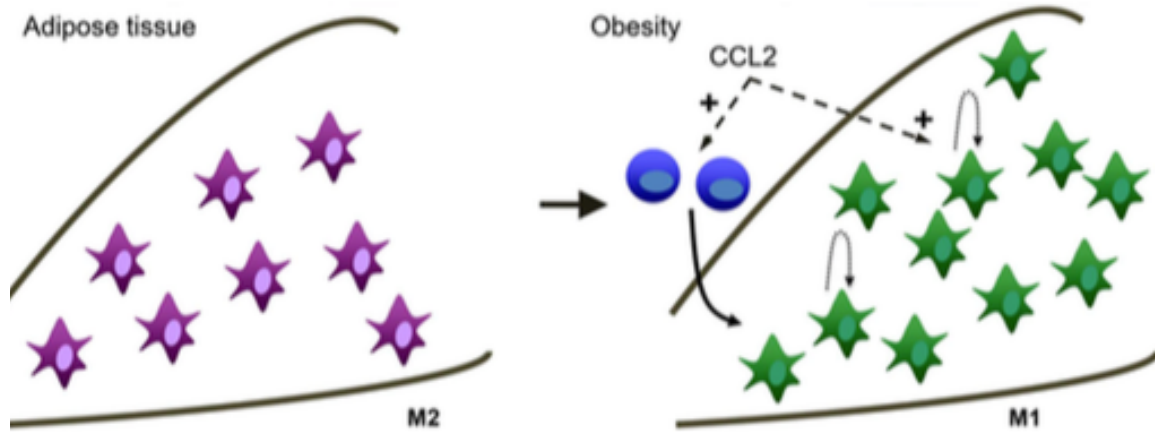


Figure I.1.37. ATMs (« adipose-tissue macrophages ») ou macrophages du tissu adipeux.
 En cas d'obésité, les macrophages du tissu adipeux changent de phénotype de M2 à M1. CCL2, un médiateur pro-inflammatoire, induit non seulement le recrutement de monocytes, mais aussi la prolifération des macrophages au niveau du tissu adipeux.
 Adapté de (Van Overmeire et al., 2014)

sensibilité à l'insuline et instaurant ainsi une résistance à l'hormone (Olefsky and Glass, 2010; Van Overmeire et al., 2014; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

La polarisation des macrophages a également été étudiée par des approches immunohistochimiques au niveau des lésions athéroscléreuses, chez l'homme et chez la souris. Elle sera abordée dans le Chapitre 2 « Macrophages et athérosclérose » (voir 2.2 Polarisation des macrophages dans les lésions athéroscléreuses).

En conclusion, bien que la polarisation des macrophages soit un phénomène relativement bien décrit *in vitro* et *in vivo*, sa signification patho-physiologique suscite encore de nombreuses questions (Murray, 2016).

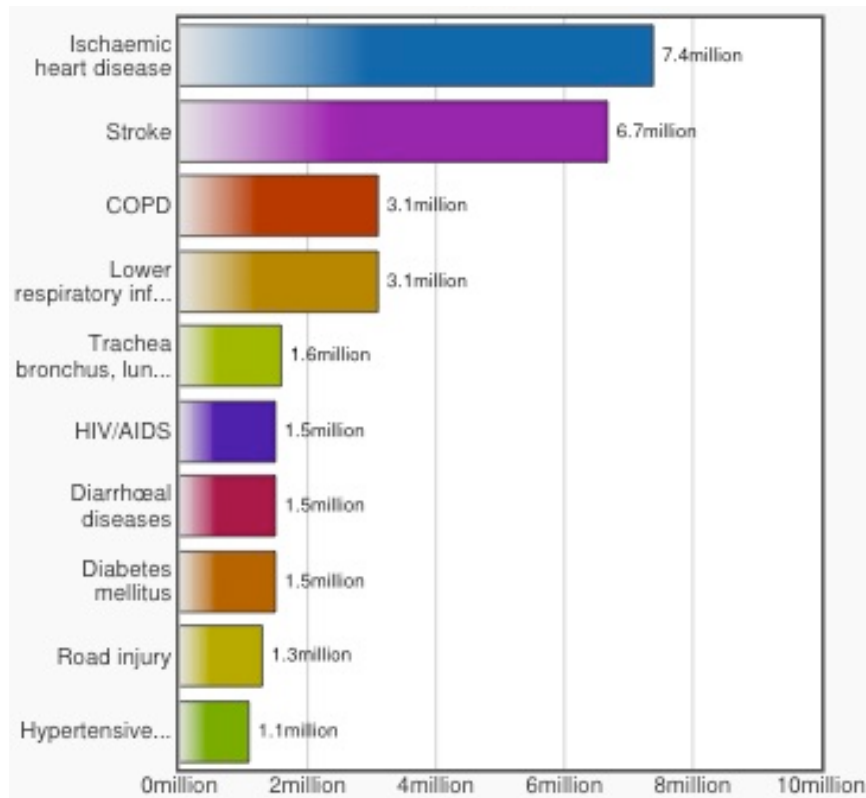


Figure I.2.1. Les 10 causes principales de mort dans le monde (dernier recensement de l'OMS en mai 2014).

(www.who.int/nmh/publications)

2. MACROPHAGES ET ATHEROSCLEROSE

Les macrophages sont connus depuis longtemps comme acteurs clés dans l'athérogenèse (voir 2.1.2 Formation d'une plaque athéroscléreuse). En effet, après activation de l'endothélium, les monocytes sont recrutés dans la paroi vasculaire, ils s'y différencient en macrophages, permettant ainsi la phagocytose du cholestérol et plus précisément des LDLs modifiées. Ils deviennent alors des cellules spumeuses dysfonctionnelles à la base de la lésion athéromateuse (pour une revue, voir (Randolph, 2014)).

Comme décrit précédemment dans le point « 1.1.1.2 Macrophages : origine, hétérogénéité et fonctions », les monocytes, en présence de M-CSF, détecté dans les plaques athéroscléreuses, se différencient en macrophages. Le M-CSF induit également leur prolifération (voir également 2.1.2 Formation d'une plaque athéroscléreuse/Athérogenèse) (Lusis, 2000; Watson et al., 1997).

De plus, il a été montré sur des souris présentant une mutation spontanée « null » pour le M-CSF, une forte diminution de la taille des lésions, suggérant un rôle majeur des macrophages dans l'athérogenèse (Smith et al., 1995). Robbins et al., en 2013, ont également montré que les macrophages prolifèrent dans les plaques (Robbins et al., 2013).

En outre, les macrophages participent au développement des lésions athéroscléreuses de par leurs fonctions, parmi lesquelles sont comprises la sécrétion de cytokines inflammatoires, la phagocytose des cellules entrant en apoptose et la production de métalloprotéinases impliquées non seulement dans le remodelage des vaisseaux sanguins, mais aussi dans la rupture des plaques (Hansson, 2005; Stoger et al., 2010).

Dans ce chapitre, nous allons aborder la pathologie de l'athérosclérose en décrivant ses facteurs de risques, les étapes de son développement, l'implication du cholestérol, des lipoprotéines et de leur oxydation et leur reconnaissance par des récepteurs cellulaires. Nous parlerons également des liens entre polarisation des macrophages et athérosclérose.

2.1 Maladies cardiovasculaires et athérosclérose

2.1.1 Contexte général, définition et facteurs de risques

Cause principale de mortalité dans le monde selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2016, les maladies cardiovasculaires sont responsables de plus de 17.5 millions de décès par an dans le monde, soit 29,6 %. De ces 17.5 millions, 7.4 millions sont attribuables aux cardiopathies coronariennes et 6.7 millions aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) (dernières statistiques de l'OMS – mai 2014) (OMS ; www.who.int/nmh/publications/) (Fig. 1.2.1). En Europe, elles sont responsables de plus de 50 % de l'ensemble des décès (www.euro.who.int/en/health-topics/).

L'athérosclérose est à l'origine des maladies cardiovasculaires englobant les cardiopathies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux, mais aussi les malformations cardiaques congénitales, les artériopathies périphériques, les thromboses veineuses profondes et les embolies cardiaques ou pulmonaires (Mackman, 2008).

Il s'agit d'une maladie vasculaire inflammatoire chronique caractérisée notamment par un dysfonctionnement endothélial et l'accumulation de lipoprotéines de faible densité

Table 1. Risk Factors for Development of Atherosclerosis

Factors with a Significant Genetic Component	
Elevated levels of LDL and VLDL	
Low levels of HDL	
Elevated lipoprotein (a)	
Hypertension	
Diabetes Mellitus	
Male gender	
Elevated levels of homocysteine	
Elevated levels of hemostatic factors, e.g., fibrinogen	
Metabolic syndrome	
Insulin resistance	
Obesity	
Family history	
Environmental Factors	
Smoking	
Lack of exercise	
High fat diet	
Infectious agents	

Tableau I.2.1. Athérosclérose : facteurs de risque.

Adapté de (Glass and Witzum, 2001)

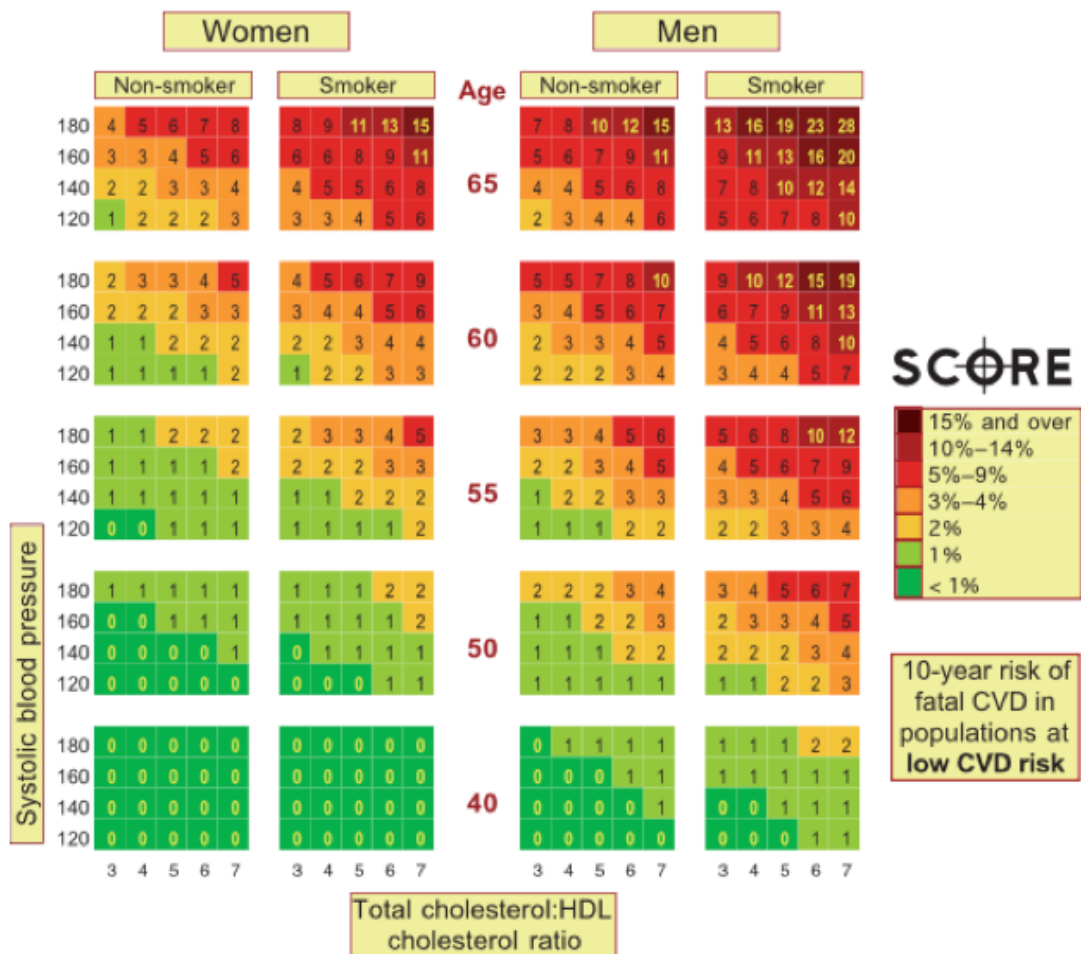


Figure I.2.2. Risque de maladies cardiovasculaires fatales sur 10 ans, évalué dans une population à faible risque de maladies cardiovasculaires (cohortes de Belgique, Italie et Espagne).

(Conroy et al., 2003)

(LDLs) dans l'intima d'artères de gros ou moyen calibres (Tabas et al., 2015), provoquant une diminution de l'élasticité et un épaississement des artères touchées (Lusis, 2000).

De nombreux facteurs de risque, tant constitutifs qu'environnementaux, jouent un rôle dans l'initiation et l'aggravation de cette maladie. Les facteurs de risque constitutifs comprennent l'hypertension, l'obésité, le diabète, le syndrome métabolique ou le genre masculin. Tandis que le manque d'exercice, le tabagisme ou une alimentation déséquilibrée et riche en lipides peuvent être notamment cités comme facteurs environnementaux (Tableau I.2.1) (Glass and Witztum, 2001; Schuett et al., 2009; Stocker and Keaney, 2004).

La probabilité de maladie cardiovasculaire sera d'autant plus élevée, qu'il y a cumul de plusieurs facteurs de risque (Fig. I.2.2) (Conroy et al., 2003). Par exemple, dans le cas de maladie cardiaque coronarienne, les effets de l'hypertension sont amplifiés par des taux de cholestérol plasmatique élevés, augmentant ainsi le risque de mortalité (Lusis et al., 1998).

En plus de ces risques communs, il en existe d'autres, induits par des situations pathologiques. En effet, c'est notamment le cas pour des personnes souffrant de maladies rénales, des patients dialysés et des femmes ayant subi une pré-éclampsie pendant leur grossesse. Pour ces dernières, il a été montré que la pré-éclampsie est associée à un risque 3 fois plus élevé de développer de l'hypertension chronique et un risque doublé de subir une attaque fatale ou non. De plus, après comparaison avec des femmes présentant une tension normale, les femmes pré-éclamptiques présenteraient un risque doublé, voire plus élevé encore, de développer des maladies cardiovasculaires ou un risque doublé de mortalité liée à une maladie cardiovasculaire (Leslie and Briggs, 2016).

Dans le cas de patients souffrant de maladies rénales, la probabilité est plus grande que ces individus meurent de maladies cardiovasculaires que de développer une insuffisance rénale (Shulman et al., 1989). Ces patients montrent une prévalence élevée pour développer de l'athérosclérose : leurs lésions athérosclérotiques sont souvent calcifiées et l'épaisseur de la média est plus importante par rapport à celle de la population générale. Ils présentent également une haute prévalence pour de l'artériosclérose, ainsi qu'un remodelage des artères de gros calibres. Le tableau I.2.2 dénombre les facteurs de risques traditionnels et non-traditionnels (hyperhomocystéinémie, stress oxydatif, dyslipidémie, marqueurs inflammatoires élevés, ...), chez les patients atteints de maladie rénale : (Tableau I.2.2) (Cheung et al., 2000; Sarnak and Levey, 2000; Sarnak et al., 2003).

La mortalité associée à des maladies cardiovasculaires est 10 à 30 fois plus élevée chez des patients traités par dialyse par rapport à des patients sains (Sarnak et al., 2003). Les maladies cardiovasculaires seraient en effet la cause principale de décès chez les patients dialysés (Harmankaya et al., 2015; Vazquez et al., 2014). De plus, l'étude de Harmankaya et al. (2015) a démontré que les patients en dialyse péritonéale ont des facteurs de risque cardiovasculaire (ex. : LDL-cholestérol) plus élevés que chez des patients en hémodialyse (Harmankaya et al., 2015).

En outre, le taux de décès chez les patients dialysés, après un infarctus du myocarde ou une insuffisance cardiaque, serait très élevé par rapport à la population générale, comprenant même des individus, par exemple, diabétiques ; ces taux atteignant 59 à

Traditional Risk Factors	Nontraditional Factors
Older age	Albuminuria
Male sex	Homocysteine
Hypertension	Lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) isoforms
Higher LDL cholesterol	Lipoprotein remnants
Lower HDL cholesterol	Anemia
Diabetes	Abnormal calcium/phosphate metabolism
Smoking	Extracellular fluid volume overload
Physical inactivity	Electrolyte imbalance
Menopause	Oxidative stress
Family history of CVD	Inflammation (C-reactive protein)
LVH	Malnutrition
	Thrombogenic factors
	Sleep disturbances
	Altered nitric oxide/endothelin balance

LDL indicates low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein.

Tableau I.2.2. Facteurs de risque traditionnels et non-traditionnels de développement de maladies cardiovasculaires, dans le cas de maladies rénales chroniques.
(Sarnak and Levey, 2000, modifié dans (Sarnak et al., 2003))

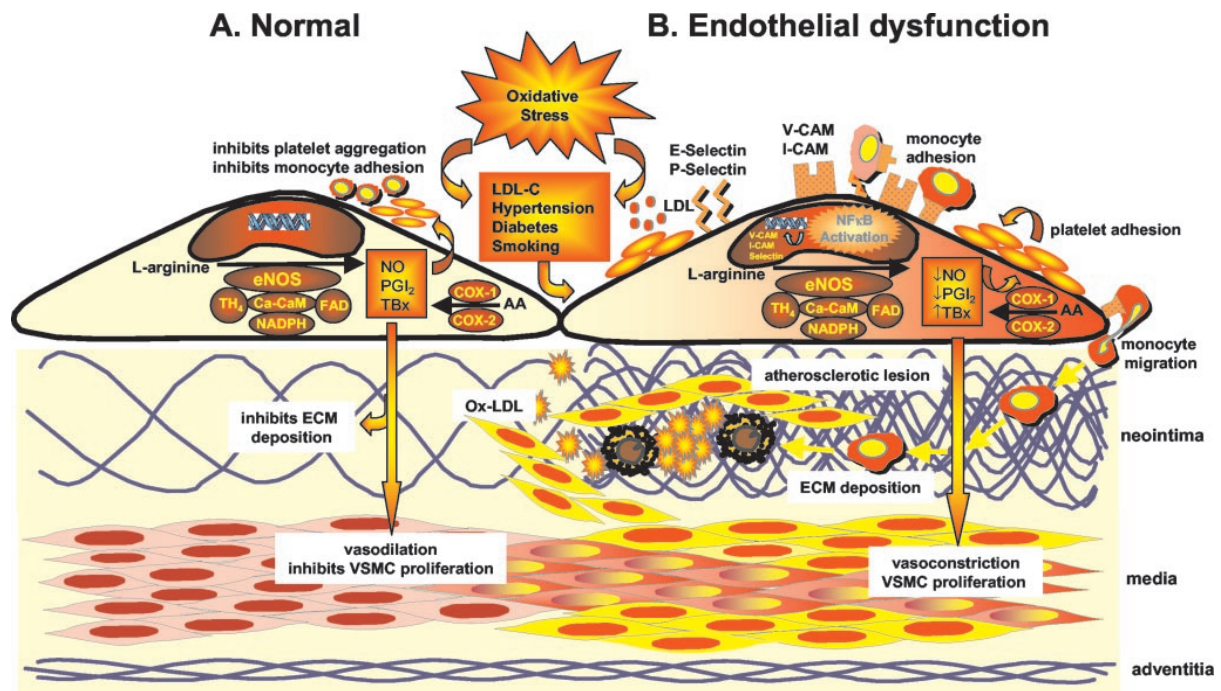


Figure I.2.3. Dysfonctionnement endothélial.

En conditions basales, l'oxyde nitrique (NO) est synthétisé à partir de L-arginine via l'action de l'eNOS et la prostacycline PGI₂ est synthétisée à partir de l'acide arachidonique (AA) via l'action de la cyclooxygénase COX et de la prostacycline synthase. Ces deux médiateurs jouent des rôles essentiels dans l'homéostasie de la cellule endothéliale, par exemple en inhibant l'agrégation des plaquettes et l'adhérence des monocytes au niveau de la paroi artérielle ou en inhibant la prolifération de cellules musculaires lisses (VSMC).

Différents stress tels que les stress oxydatifs, l'hyperlipidémie ou l'hypertension, perturbent l'homéostasie et donc contribuent au dysfonctionnement endothélial. Ce dernier est caractérisé par une diminution de la production de médiateurs impliqués dans la vasodilatation (NO) et dans l'empêchement de l'adhérence à la paroi artérielle (PGI₂) et à l'inverse, par une augmentation de facteurs impliqués dans la vasoconstriction et dans l'adhérence tels que l'endothéline-1, l'angiotensine-II et les thromboxanes (TBx). Les cellules endothéliales synthétisent également des molécules d'adhérence comme les sélectines et les intégrines, augmentant ainsi l'adhérence des monocytes et des plaquettes.

Ces changements sont également accompagnés d'une prolifération et d'une migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima.

L'infiltration subséquente des cellules inflammatoires et des LDLs oxydées (Ox-LDL) contribue à la formation de la lésions athéroscléreuse.

Ca-CaM : Ca²⁺-calmoduline ; ECM : extracellular matrix ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; I-CAM : intracellular cell adhesion molecule ; TH₄ : tétrahydrobioptérine ; V-CAM : vascular cell adhesion molecule.

(Melo et al., 2004)

73 %, 1 et 2 ans respectivement, après un infarctus du myocarde (Herzog et al., 1998; Sarnak et al., 2003).

Enfin, Heine et al. (2012) ont observé que le nombre de monocytes intermédiaires CD14⁺⁺CD16⁺ augmentait en cas d'aggravation des problèmes au niveau des fonctions rénales. Ces monocytes sont associés au développement de l'athérosclérose non seulement chez les patients souffrant de maladies rénales, mais aussi chez les individus sains, en exprimant des récepteurs aux chémokines impliqués dans l'athérogenèse et en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires. Chez les patients dialysés ou en stades précoces de maladies rénales, un nombre élevé de ces monocytes serait associé à un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires (Heine et al., 2012). Il serait possible que ces monocytes soient déjà polarisés dans le sang, c'est la raison pour laquelle nous aborderons cette question à la fin de notre travail expérimental.

Il est intéressant de noter que la progression d'une lésion athéroscléreuse varie d'un individu à l'autre. Le processus prend plusieurs dizaines d'années (Yla-Herttuala et al., 2011). De plus, à cause de différences dans la dynamique du flux sanguin, des lésions vont généralement d'abord se développer au niveau de l'aorte (première dizaine d'années), puis au niveau des artères coronaires (deuxième dizaine d'années) et enfin au niveau des artères cérébrales (troisième et quatrième dizaines d'années) (Lusis, 2000).

2.1.2 Formation d'une plaque athéroscléreuse / Athérogenèse

L'athérogenèse est favorisée d'une part par le dysfonctionnement endothélial qui peut avoir plusieurs origines (hypertension, flux perturbés, excès de médiateurs pro-inflammatoires, stress oxydatif, tabagisme,...) (Fig. I.2.3) et d'autre part par une dyslipidémie. Ces deux éléments favorisent l'initiation d'un processus inflammatoire, avec à la fois l'activation des cellules endothéliales ainsi qu'une augmentation de la perméabilité sélective de l'endothélium (Libby et al., 2011; Melo et al., 2004). Ce changement de perméabilité est également favorisé par des perturbations dans le flux sanguin ou suite à une blessure endothéliale locale. C'est la raison pour laquelle les lésions athéroscléreuses ont tendance à se former au niveau de bifurcations artérielles ou de zones vasculaires endommagées (Aukrust et al., 2008; Lusis, 2000; Moore et al., 2013; Sanz and Fayad, 2008; Tabas et al., 2015). Ces deux conditions correspondent à un stress athérogène pour l'endothélium, l'activant. L'augmentation de la perméabilité favorise aussi l'accumulation et la rétention de lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine-B (APOB) et riches en cholestérol dans l'espace subendothélial, au niveau de l'intima. Ces lipoprotéines sont sujettes à des modifications telles qu'une oxydation, un clivage enzymatique ou non, et une agrégation, leur conférant des propriétés pro-inflammatoires et athérogènes. Ces modifications, et plus particulièrement l'oxydation des LDLs, a lieu soit dans la circulation, soit au niveau de l'intima (Fig. I.2.4) (voir 2.1.4 Mécanismes d'oxydation des LDLs - 2.1.4.3 Modifications des LDLs *in vivo*) (Aukrust et al., 2008; Lusis, 2000; Moore et al., 2013; Sanz and Fayad, 2008; Tabas et al., 2015).

La perméabilité croissante de la barrière endothéliale entraîne une infiltration plus importante, entre-autres, de lipoprotéines oxydées par diffusion. Cette diffusion est d'autant plus importante que la concentration plasmatique de lipoprotéines, et plus particulièrement de LDLs, est élevée (Boren et al., 1998; Lusis, 2000).

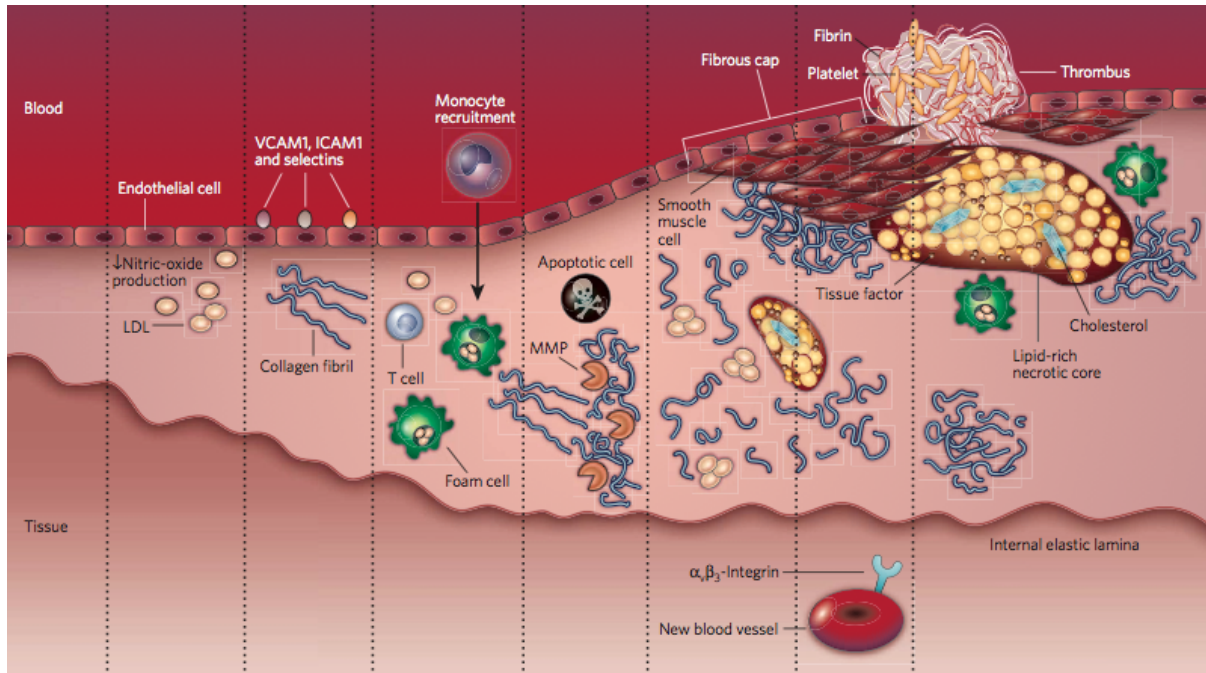


Figure I.2.4. Développement d'une lésion athéroscléreuse.

La formation d'une plaque athéroscléreuse commence par une augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale, provoquée entre autres par les perturbations du flux sanguin. Cette perméabilité permet ainsi l'infiltration, dans l'intima de l'artère, des LDLs. Ces LDLs subissent des modifications, qui vont renforcer l'activation des cellules endothéliales, qui sécrètent alors des chémokines, qui induisent le recrutement des monocytes. Ces derniers, une fois arrivés dans la sub-endothéliale, se différencient en macrophages et via l'expression de récepteurs « scavenger », se chargent en LDLs oxydées. Ils deviennent ainsi des macrophages spumeux.

De plus, les cellules musculaires migrent de la média vers l'intima, en présence de chémokines et de facteurs de croissance (ex. : PDGF). Elles participent à la formation de la cape fibreuse en synthétisant du collagène ou peuvent également devenir spumeuses. Le cœur nécrotique est lui formé par l'accumulation de cellules spumeuses et de dépôts de cholestérol extracellulaire.

Il semble, de plus, que les macrophages du cœur nécrotique puissent entrer en apoptose. Ce phénomène, ainsi que la néovascularisation, perturbe la plaque et peut mener à sa rupture. Cette rupture mène à la formation d'un thrombus qui obstrue la lumière artérielle.

(Sanz and Fayad, 2008)

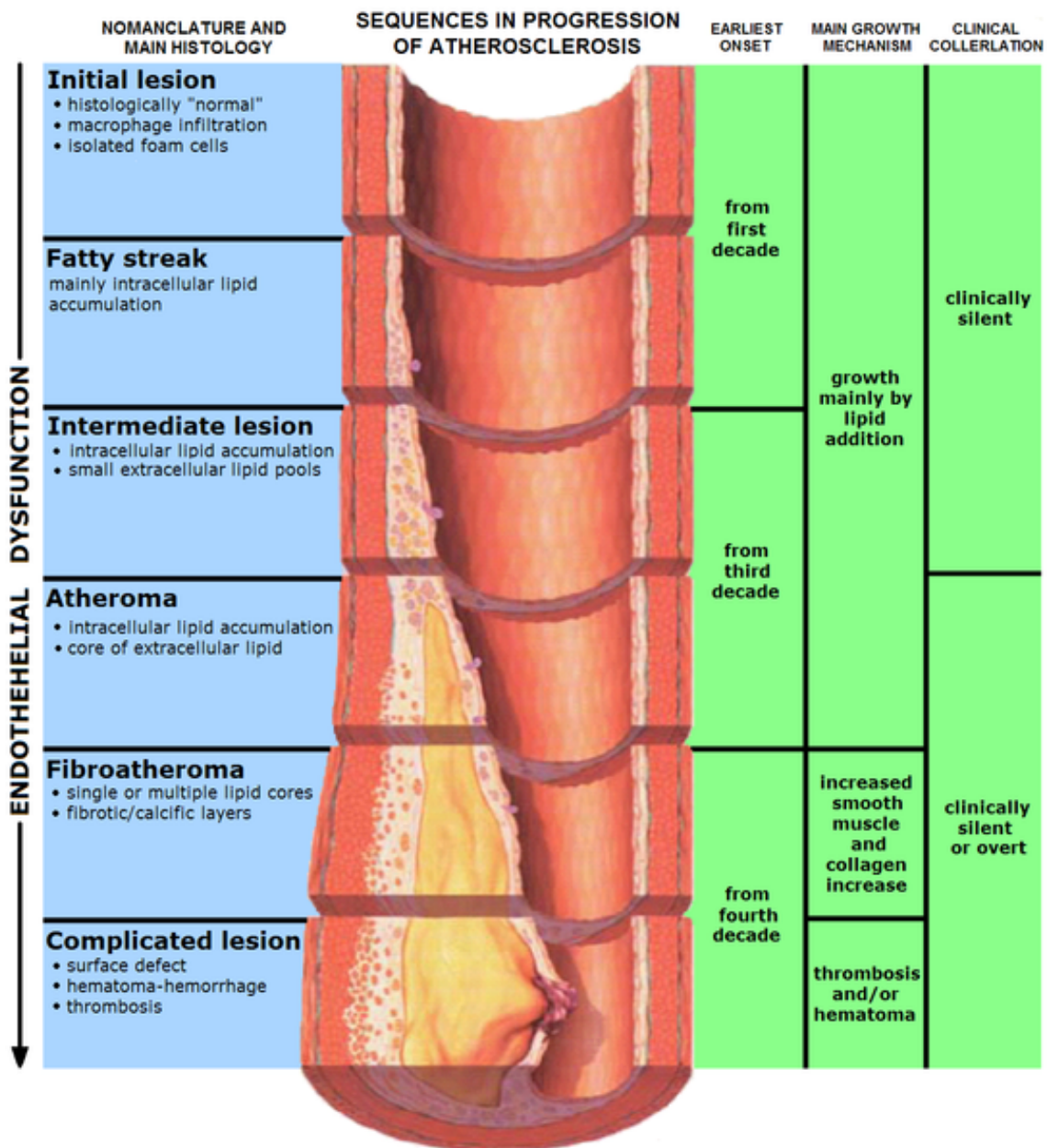


Figure I.2.5. Evolution d'une lésion athéroscléreuse, au cours du temps.

La lésion athéroscléreuse commence à se former déjà pendant la première décennie de la vie d'un individu : elle passe d'un stade initial à un stade de strie lipidique, caractérisés par une infiltration de macrophages et des cellules spumeuses. A partir de 30 ans, la lésion évolue vers un stade intermédiaire puis un athérome, principalement caractérisé par la formation d'un cœur nécrotique. Enfin vers 40 ans, l'athérome devient un fibroathérome, caractérisé par une migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima et par la formation d'une cape fibreuse. Il contient, de plus, des cristaux de cholestérol mais aussi des micro-vaisseaux sanguins. Des zones de calcification peuvent également apparaître dans certaines plaques. La lésion progresse, d'abord vers l'adventice, puis finit par envahir la lumière artérielle. Elle peut se rompre (plaque vulnérable) suite à une ulcération de la paroi vasculaire et ainsi permettre la libération d'éléments pro-coagulants qui interagissent avec des facteurs de la coagulation plasmatiques, déclenchant la formation d'un thrombus.

(<http://www.healio.com/cardiology/learn-the-heart/cardiology-review/topic-reviews/atherosclerosis>)

Les LDLs sont retenues dans l'espace sous-endothélial grâce à des interactions apolipoprotéine-B/protéoglycans de matrice (voir 2.1.4 Mécanismes d'oxydation des LDLs – 2.1.4.3 Modifications des LDLs *in vivo*).

Les cellules endothéliales, activées, sécrètent des chémokines (MCP-1, « monocyte chemotactic protein-1 », IL-8) et des cytokines (IL-1 β , TNF α) et surexpriment en membrane des sélectines (P- et E-sélectines) permettant le recrutement et l'entrée des leucocytes dans l'espace subendothélial. En effet, le roulement (« rolling ») des leucocytes à la surface des cellules endothéliales est assuré via l'interaction des sélectines endothéliales avec les ligands glycosylés présents à la surface des leucocytes (ex. : PSGL-1 « P-selectin glycoprotein ligand-1 » et ESL-1 « E-selectin ligand-1 ») (Lusis, 2000; Mestas and Ley, 2008; Tabas et al., 2015). Ces interactions faibles sont suivies notamment par une interaction entre des protéines d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales, telles que VCAM-1 (« vascular cell adhesion molecule ») et ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 ») avec l'intégrine VLA-4 (« very late antigen-4 » ou intégrine $\alpha_4\beta_1$), exprimée au niveau des monocytes et cellules T ou LFA-1 (« lymphocyte function-associated antigen-1 » ou intégrine $\alpha_L\beta_2$) et MAC-1 (« macrophage-1 antigen » ou intégrine $\alpha_M\beta_2$) respectivement, permettant de ralentir le roulement et d'assurer une adhérence plus forte (Galkina et al., 2006; Galkina and Ley, 2009; Huo et al., 2000; Ley et al., 2011). Il s'ensuit une diapédèse des leucocytes (interaction entre PECAM-1 (« platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 ») et CD99 principalement) vers la subendothéliale (Libby et al., 2011; Muller, 2003).

Le recrutement des monocytes au sein des lésions est également assuré via les actions concertées de CCL2, CCR2, CX3CR1, la fractalkine et CCR5, comme l'ont montré plusieurs études *in vivo* sur des modèles murins (Boring et al., 1998; Combadiere et al., 2008; Lesnik et al., 2003).

Une fois dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages via des facteurs de différenciation (ex. : le M-CSF, produit par les cellules endothéliales activées par les LDLs modifiées) (Moore et al., 2013; Tabas et al., 2015). Ceux-ci, via l'expression de récepteurs « scavenger » (ex. : SR-A, CD36, LOX-1), reconnaissent les LDLs modifiées et les internalisent par endocytose, accumulant ainsi le cholestérol intracellulaire. Puisque l'internalisation des LDLs oxydées par les récepteurs « scavenger » n'est pas régulée, il s'ensuit la formation de cellules spumeuses (voir 2.1.5.2 Récepteurs « scavenger »). La lésion athéroscléreuse précoce est nommée « **strie lipidique** » ou « fatty streak » (Figs. I.2.4 et I.2.5) (Galkina and Ley, 2009).

Pour rappel, les LDLs oxydées, caractérisées par l'apparition de nouveaux épitopes (ex. : phospholipides oxydés ou esters de cholestérol oxydés), sont reconnues comme des DAMPs par des PRRs cellulaires et solubles tels que CD36 ou TLR4, mais aussi par des anticorps naturels (NAb). Cette reconnaissance induit l'activation de plusieurs réponses immunes telles que l'expression de gènes pro- ou anti-inflammatoires ou une réponse immunitaire humorale athéroprotectrice (pour une revue, voir (Miller et al., 2011)).

D'autres types de leucocytes s'accumulent au niveau des plaques : les lymphocytes, cellules T lésionnelles, éosinophiles et neutrophiles, bien qu'en proportion inférieure par comparaison avec les monocytes/macrophages (Galkina and Ley, 2009; Libby et al., 2011).

En plus du recrutement des monocytes, les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima (Fig. I.2.4).

Les cellules musculaires lisses y prolifèrent en présence de PDGF (« platelet-derived growth factor ») produit par les cellules endothéliales activées. Elles secrètent des molécules de matrice extracellulaire, tels que le collagène interstitiel, l'élastine et les protéoglycans, formant la cape fibreuse de la lésion (Libby et al., 2011; Lusis, 2000).

La plaque est alimentée par l'accumulation, sous la cape fibreuse, de débris cellulaires associée à une efférocytose¹ inefficace, et à la nécrose entre autres de macrophages, de cellules musculaires lisses et de cellules spumeuses. En outre, s'y rajoutent des lipides relâchés après nécrose des cellules spumeuses, le tout formant un cœur nécrotique au sein de la plaque. A ce stade, la lésion est dite **avancée** (Figs. I.2.4 et I.2.5) (Galkina and Ley, 2009; Libby et al., 2011; Lusis, 2000). Elle contient de plus des cristaux de cholestérol mais aussi des micro-vaisseaux, dû à une néo-vascularisation locale (Galkina and Ley, 2009). Des zones de calcification peuvent également apparaître dans certaines plaques (Fig. I.2.4) (Watson et al., 1994).

La lésion athéroscléreuse évolue et progresse tout d'abord vers l'adventice, jusqu'à atteindre un point critique au delà duquel elle envahit la lumière artérielle (Figs. I.2.4 et I.2.5) (Lusis, 2000). Cette progression est associée à la migration de nouvelles cellules inflammatoires provenant de la circulation sanguine, à la prolifération cellulaire, à l'accumulation des lipides et à la production de matrice extracellulaire (Lusis, 2000).

Selon les cas, la plaque peut obstruer la lumière artérielle soit en raison de son développement étendu, soit en raison de sa rupture (plaque **vulnérable**) (Libby et al., 2011; Yla-Herttuala et al., 2011). Cette rupture peut être provoquée par une ulcération de la paroi vasculaire, menant à la libération d'éléments pro-coagulants qui interagissent avec des facteurs de la coagulation plasmatiques, déclenchant la formation d'un thrombus interrompant le flux sanguin (Libby et al., 2011). Les plaques qui se rompent ont généralement une cape fibreuse fine (< 65 microns d'épaisseur et en moyenne 49 microns d'épaisseur) et pauvre en collagène avec peu de cellules musculaires lisses, mais beaucoup de macrophages (14 à 26 %) (Kolodgie et al., 2001; Kubo et al., 2007; Libby et al., 2011). La rupture de la plaque peut être précipitée par la production, via les cellules inflammatoires (dont les macrophages), d'enzymes collagénolytiques et de médiateurs causant la mort de cellules musculaires lisses.

Environ 75 % (60 % chez les femmes, 80 % chez les hommes) des événements thrombotiques sont dus à une rupture physique des plaques athéroscléreuses. L'association d'une rupture de plaque avec une **hémorragie** est également une cause commune de sténose sévère. Le reste des événements thrombotiques est lié à des mécanismes moins bien définis à l'heure actuelle, incluant le phénomène d'érosion de plaque.

Une hémorragie peut se déclencher suite à l'absence de cellules de support au niveau des nouveaux vaisseaux sanguins, fragiles, qui permettent de plus une extravasation locale des protéines plasmatiques et des érythrocytes (Yla-Herttuala et al., 2011).

Deux variables importantes influencent l'athérogenèse : l'hémodynamique artérielle et l'hypercholestérolémie. En effet, en ce qui concerne ce premier facteur, les sites susceptibles de développer des plaques athéroscléreuses sont les régions exposées à un flux perturbé, lent ou à des forces de cisaillement (« shear stress ») faibles. Au contraire, les sites résistants à l'athérosclérose sont les régions subissant l'effet d'un flux laminaire

¹ Efférocytose : processus d'élimination des corps apoptotiques

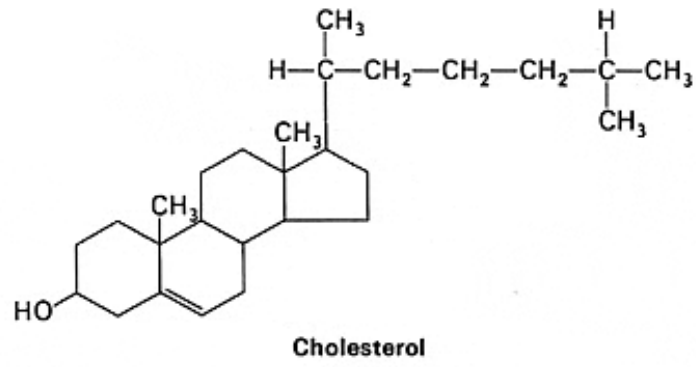


Figure I.2.6. Structure moléculaire du cholestérol.
(www.facbio.com)

et de forces de cisaillement fortes (Getz and Reardon, 2012). Bien que le développement de lésions athéroscléreuses fassent intervenir un grand nombre de facteurs, l'hypercholestérolémie peut, à elle seule, induire la formation de plaques et influencer leur progression. Le rôle des lipoprotéines dans le transport et le catabolisme du cholestérol est donc primordial dans le phénomène d'athérogenèse.

2.1.3 Cholestérol et lipoprotéines

2.1.3.1 Cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols, porteur d'un seul groupe hydroxyl sur le carbone 3 (partie polaire), avec 4 cycles carbonés (noyau cyclo-pentano-phénanthrénique et 8 carbones asymétriques) et une courte chaîne alkyl (Fig. 1.2.6) (Mesmin and Maxfield, 2009). La fonction hydroxyle peut être estérifiée par un acide gras, ce qui accentue le caractère hydrophobe de la molécule de cholestérol (Ikonen, 2006; Maxfield and van Meer, 2010).

En s'intercalant entre les phospholipides, il module la stabilité, la fluidité et la dynamique des membranes cellulaires, et en particulier l'organisation structurale de la membrane plasmique. Il régule la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles et il joue également un rôle déterminant dans différentes pathologies dont l'athérosclérose (Charlton-Menys and Durrington, 2007; Maxfield and van Meer, 2010; Wustner and Solanko, 2015). Le cholestérol est aussi le précurseur des hormones stéroïdes et de plusieurs vitamines.

Le cholestérol provient principalement de la synthèse endogène dans le foie et du recyclage des sels biliaires (80 % des besoins). Le reste provient d'un apport exogène par l'alimentation.

Le cholestérol cellulaire est retrouvé à raison de 5 % dans le réticulum endoplasmique (RE), tandis que 60 à 70 % se retrouvent dans la membrane plasmique (Wustner and Solanko, 2015).

2.1.3.1.1 Synthèse du cholestérol

Au sein du cytosol et du RE lisse des cellules hépatiques, le cholestérol est synthétisé à partir du mévalonate. La production de mévalonate requiert 3 molécules d'acétyl-CoA pour former finalement du HMG CoA (« 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme-A ») via la HMG CoA synthase cytoplasmique (Fig. 1.2.7) (Charlton-Menys and Durrington, 2007; Russell, 1992). Une fois produit, le HMG CoA est réduit en mévalonate par la HMG CoA réductase, exprimée dans le RE. Cette étape, et plus précisément cette réductase, est finement régulée, empêchant ainsi l'accumulation excessive de cholestérol. Elle est, de plus, la cible des statines, classe majeure de médicaments afin de traiter l'hypercholestérolémie (Goldstein et al., 2006; Russell, 1992).

Ensuite, une série de phosphorylations et carboxylations mène à la formation d'isopentényl pyrophosphate (IPP). A partir de celui-ci est synthétisé soit de l'isopentényl adénine, impliqué dans la régulation de la réplication de l'ADN, soit du géranyl pyrophosphate (GPP) via la polymérisation de l'IPP, menant à la synthèse de FPP (farnésyl pyrophosphate). Ce dernier est le substrat commun permettant à la fois la formation de stérols (dont le cholestérol) ou d'autres molécules telles que l'ubiquinone. Le cholestérol est lui produit grâce à la condensation de deux molécules de FPP, résultant en une molécule de squalène. Ensuite, une réaction de cyclisation, différents

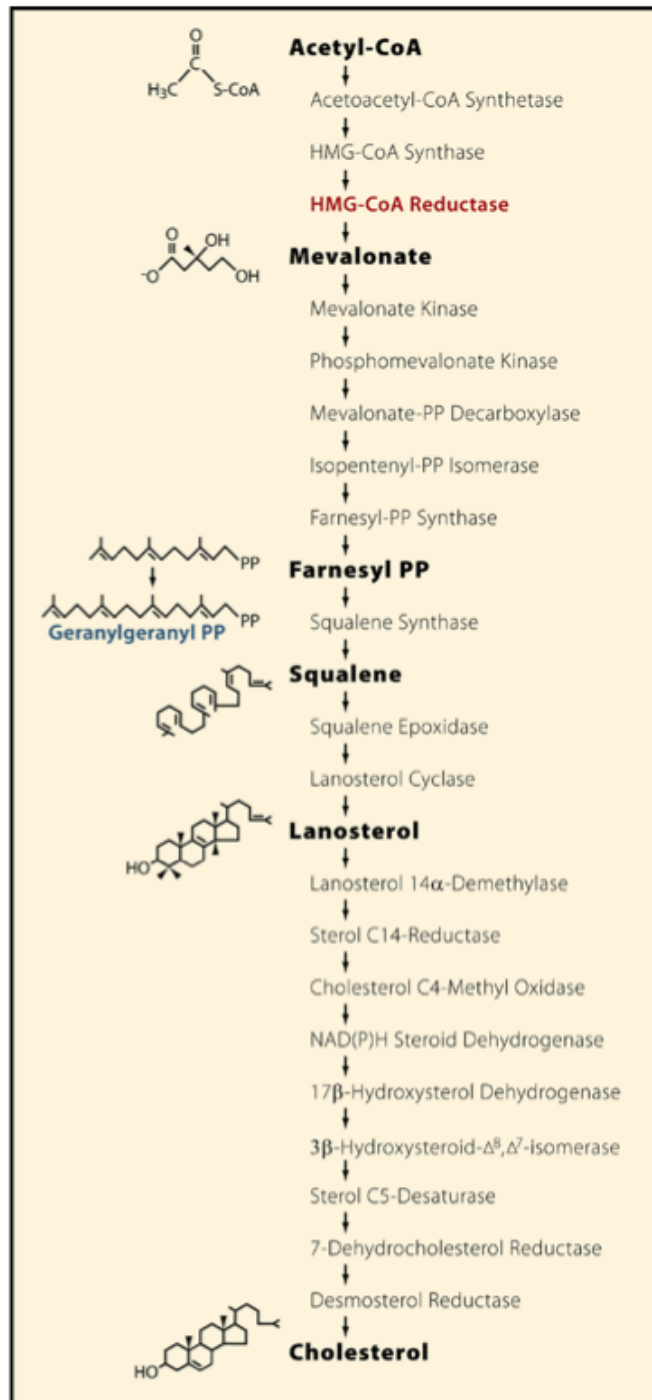


Figure I.2.7. Voie de synthèse du cholestérol (ou voie du mévalonate).
 (Goldstein and Brown, 2006)

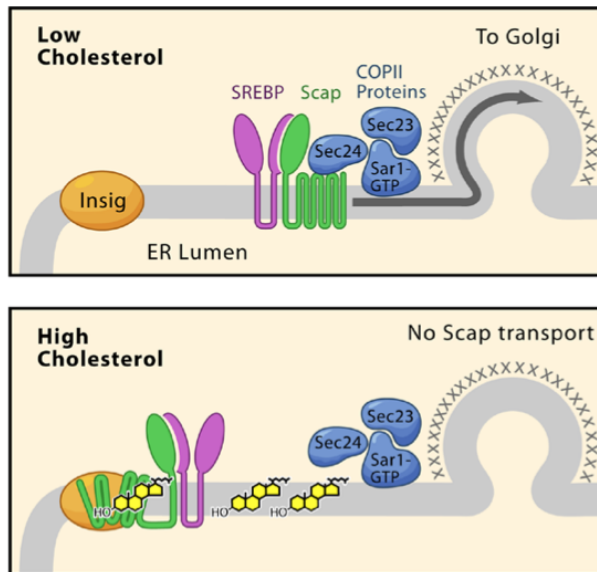


Figure. I.2.8. Régulation du transport du complexe SCAP/SREBP, par INSIG.
(Goldstein and Brown, 2006)

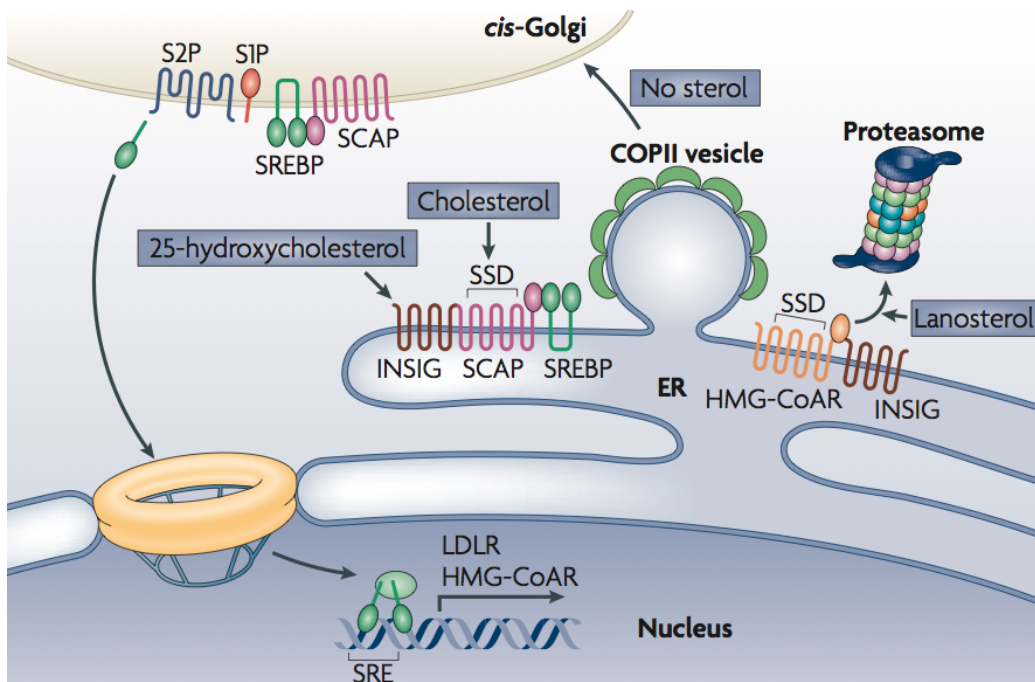


Figure I.2.9. Mécanismes de régulation du métabolisme du cholestérol par SREBP.

Lorsque la concentration en cholestérol est suffisante, SREBP (« sterol regulatory element binding protein ») est retenu en membrane du réticulum endoplasmique (RE) par deux protéines chaperones : SCAP (« SREBP cleavage activating protein »), qui permet l'export de SREBP du RE vers le Golgi, et INSIG, qui ancre le complexe en membrane du RE. Lorsque SCAP lie le cholestérol via son SSD (« sterol binding domain ») et INSIG lie le 25-hydroxycholestérol, ces deux protéines forment un complexe, empêchant SCAP d'exporter SREBP.

Par contre, lorsque le cholestérol vient à manquer, SREBP est transporté dans le Golgi, via SCAP, où il sera clivé. Le fragment résultant de la protéolyse est ensuite importé dans le noyau et se lie à la région SRE (« sterol regulatory element »), permettant ainsi l'induction de la transcription des gènes codant pour le LDL-R et la HMG-CoA réductase (enzyme essentielle impliquée dans la synthèse du cholestérol).

En présence de lanostérol, la HMG-CoA réductase est dégradée par le protéasome.
(Ikonen, 2008)

réarrangements intramoléculaires et une réaction de déméthylation mènent respectivement à la formation de lanostérol, desmostérol et enfin de cholestérol (Fig. I.2.7) (Goldstein et al., 2006; Russell, 1992).

2.1.3.1.2 Régulation de sa synthèse et internalisation

La synthèse du cholestérol a lieu dans le cytosol, puis dans le RE, organite dans lequel est également exprimé la HMG CoA réductase (Goldstein et al., 2006). Une fois synthétisé dans le RE, le cholestérol est rapidement transporté vers la membrane plasmique (MP) (temps de demi-vie : 10 à 20 minutes).

La régulation de la synthèse du cholestérol est majoritairement influencée par la HMG CoA réductase, catalysant la synthèse du mévalonate dans le cytoplasme. Cette enzyme est, elle-même, régulée par un complexe protéique incluant SREBP2 (« Sterol Response Element Binding Protein-2 »), SCAP (« SREBP Cleavage-Activating Protein ») et INSIG-1 (protéine résidente du RE, « Insulin-induced gene-1 »), exprimées dans le RE (Wustner and Solanko, 2015). Lorsque le cholestérol est présent dans la cellule en quantités suffisantes, il se lie au domaine SSD (« sterol binding domain ») de SCAP, favorisant l'interaction SCAP-INSIG. SCAP ne peut plus interagir avec les protéines SAR1/SEC23/SEC24, impliquées dans la formation des vésicules à tapis COP-II. SREBP2 lié à SCAP reste donc séquestré dans le RE via INSIG (Goldstein et al., 2006; Sun et al., 2005).

Lorsque la concentration en cholestérol diminue dans la cellule, SCAP subit une modification conformationnelle qui diminue son affinité pour INSIG-1. Le complexe SCAP/SREBP2 n'est plus retenu dans le RE. En effet, SCAP peut dans ces conditions interagir avec SEC23/SEC24, un hétérodimère cytosolique. SEC24 se lie à la protéine cargo SCAP et SEC23 recrute d'autres protéines, permettant la formation du tapis de la vésicule (Fig. I.2.8) (Goldstein et al., 2006; Sun et al., 2005) et le complexe SCAP/SREBP2 migre vers l'appareil de Golgi via des vésicules tapissées de type COP-II (Brown and Goldstein, 1999). Une fois dans le Golgi, deux sérine protéases appelées S1P et S2P (« site 1/2 proteases ») clivent SREBP2 pour libérer la forme mature de SREBP2, contenant le domaine N-terminal actif (Espenshade et al., 1999; Zelenski et al., 1999). Cette forme tronquée active est transloquée dans le noyau et agit comme facteur de transcription induisant l'expression de différents gènes impliqués dans la synthèse (*HMG-CoA réductase*), l'internalisation (*LDL-R*) et le transport du cholestérol (*ABCA1*) (Goldstein et al., 2006).

En cas d'accumulation du lanostérol, il semblerait que ce stérol se lie au niveau du domaine senseur de stérol de la HMG CoA réductase, permettant sa liaison à INSIG-1. Cette liaison permet l'ubiquitinylation de la HMG-CoA réductase, via la E3 ubiquitine ligase, sur les lysines 89 et 248 de la réductase (Goldstein et al., 2006). Cette ubiquitinylation est suivie par une dégradation de l'enzyme et donc une diminution de la synthèse du cholestérol (Fig. I.2.9) (Goldstein et al., 2006).

2.1.3.1.3 Apport exogène du cholestérol

En plus d'être synthétisé, le cholestérol peut aussi provenir de l'alimentation. Une fois dans l'intestin, les esters de cholestérol doivent d'abord être hydrolysés par une lipase

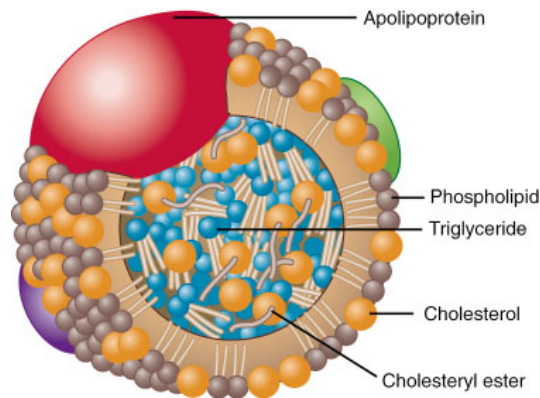


Figure I.2.10. Représentation schématique générale d'une lipoprotéine.
(www.medicine.academic.ru)

NOM	TISSU	DISTRIBUTION	FONCTION
apo AI	foie, intestin	chylo, HDL	Structurelle ; activateur physiologique de la LCAT ; efflux de cholestérol
apo AII	foie (intestin)	HDL	Structurelle ; activateur/inhibiteur de la HL ; efflux de cholestérol
apo AIV	foie, intestin	chylo, HDL	Transport reverse du cholestérol ; activateur de la LCAT ; métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo AV	foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo B100	foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle : synthèse et sécrétion des VLDL ; ligand du récepteur LDLR
apo B48	intestin	chylomicrons	Structurelle ; synthèse et sécrétion des chylomicrons ; ligand du récepteur B48R
apo CI	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP ; activateur de la LCAT ; inhibiteur de la liaison aux LDLR, LRP et VLDLR
apo CII	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
apo CIII	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL ; inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
apo D (apo AIII)	foie, intestin, rate pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
apo E	foie, macrophage, cerveau	chylo, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
apo F	foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP

Tableau I.2.3. Classes d'apolipoprotéines.
(Lagrost et al., 2005)

pancréatique CEL (« carboxyl ester lipase ») pour libérer du cholestérol libre dans la lumière. Celui-ci est alors absorbé par les entérocytes, via la protéine NPC1-L1 (« Niemann-Pick C1-like 1 ») ou via diffusion (Hussain, 2014).

Dans les entérocytes, une partie du cholestérol est estérifié par l'ACAT2 (« acyl CoA-cholesterol acyltransferase 2 ») afin de pouvoir être stocké. Sous l'action de la « microsomal transfer protein » MTTP, une partie des esters de cholestérol est assemblée avec des triglycérides, des phospholipides et de l'APOB48 dans les chylomicrons sécrétés au pôle basolatéral. Cet assemblage est indispensable pour permettre le transport des lipides d'origine alimentaire vers les tissus périphériques (foie et muscles), via la lymphe puis le sang. Ces complexes lipides-protéines sont appelés « lipoprotéines » (Charlton-Menys and Durrington, 2007; Daniels et al., 2009).

Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires composés d'une ou plusieurs apolipoprotéines et de lipides, associés via des liens non-covalents. La partie lipidique est constituée d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol libre, dont la partie hydrophile est située du côté du milieu aqueux tandis que la partie hydrophobe (noyau hydrophobe du cholestérol et acides gras des phospholipides) compose le cœur hydrophobe de la lipoprotéine, avec les triglycérides et les esters de cholestérol (Fig. I.2.10).

Les apolipoprotéines (APO), quant à elles, s'intercalent en périphérie du complexe, avec leurs parties hydrophiles faisant face au milieu aqueux et leurs domaines hydrophobes tournés vers le centre de la lipoprotéine (Charlton-Menys and Durrington, 2007; Daniels et al., 2009; Mesmin and Maxfield, 2009). Ces protéines, classées de A à F, assurent non seulement le maintien de la structure de la lipoprotéine, mais jouent aussi un rôle dans la reconnaissance de la lipoprotéine avec son récepteur (ou ses récepteurs) et dans l'activation ou l'inhibition d'enzymes importantes dans le métabolisme de la lipoprotéine (ex. : LPL « lipoprotein lipase » activée par l'APOCII et inhibée par l'APOCIII, LCAT « lecithin cholesterol acyl transferase », activée par l'APOAI) (Tableau I.2.3) (Lagrost et al., 2005).

Il existe quatre types de lipoprotéines, classées en fonction de différents critères : leur densité, leur taille, leurs fonctions, la ou les apolipoprotéine(s) associée(s) et leur contenu en lipides. Il s'agit des chylomicrons, des VLDLs, des LDLs et des HDLs (Fig. I.2.11) (Berneis and Krauss, 2002; Kwan et al., 2007; Mesmin and Maxfield, 2009).

2.1.3.2 Lipoprotéines

2.1.3.2.1 Chylomicrons

Les chylomicrons sont des lipoprotéines de grande taille, sphériques, importantes dans le transport des lipides provenant de l'alimentation, de l'intestin vers le foie. Elles sont composées majoritairement de triglycérides (80 à 90 %) (Figs. I.2.11 et I.2.12). Leur diamètre est compris entre 80 et 1000 nm et leur densité est inférieure à 0,95 g/ml (Hussain, 2014).

La surface des chylomicrons est constituée d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol libre et d'APOB48 (Hussain, 2014).

Chez l'homme, l'APOB48 est spécifique des chylomicrons et des chylomicrons résiduels (« remnants ») après décharge lipidique (démonstré par (Kane et al., 1980)). Cet

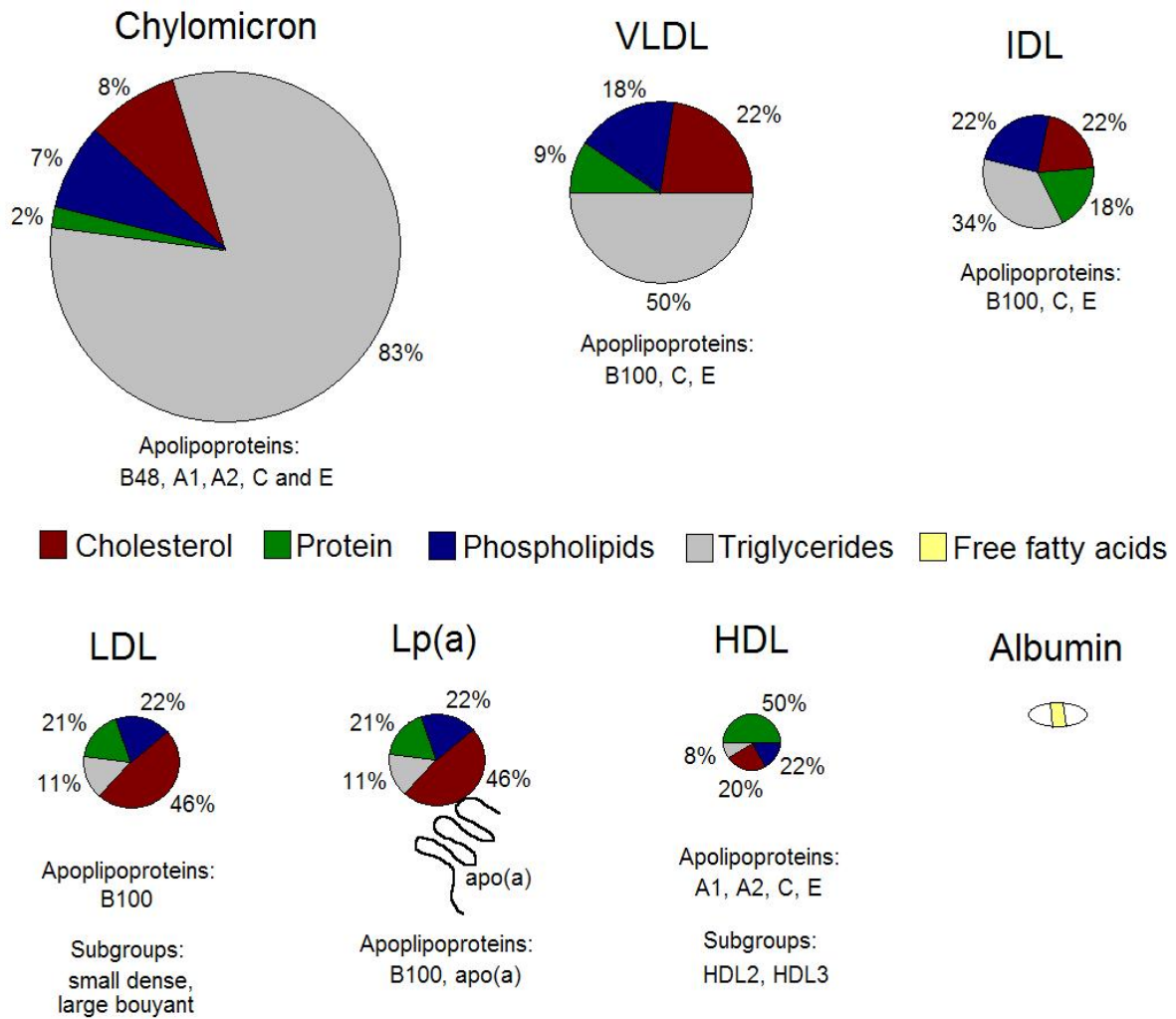


Figure I.2.11. Représentation schématique de la composition des lipoprotéines.
 (<http://www.robertbarrington.net/wp-content/uploads/2013/03/Lipoprotein-Classes.jpg>)

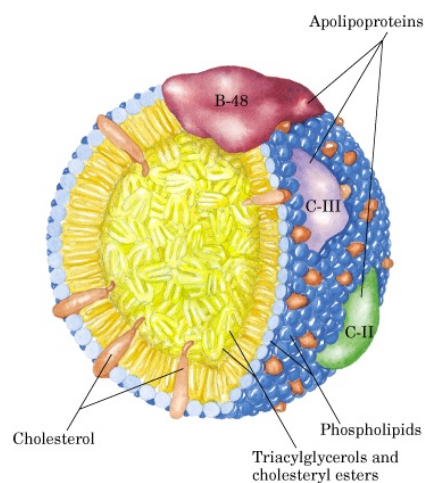


Figure I.2.12. Structure d'un chylomicron.
 (http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html)

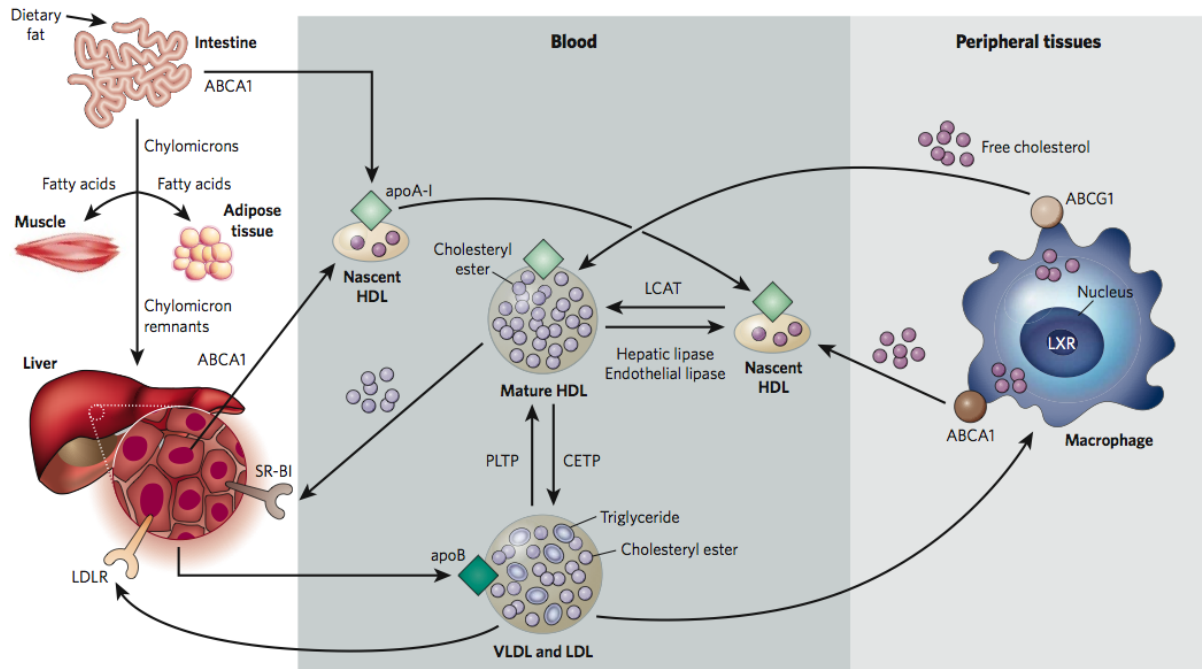


Figure I.2.13. Origine et métabolisme des lipoprotéines.

Le cholestérol, ainsi que les triglycérides, proviennent de l'alimentation et doivent donc être digérés. Ils sont ensuite absorbés au niveau intestinal et transportés sous forme de chylomicrons dans la circulation sanguine. Une partie de ces chylomicrons est hydrolysée en acides gras, nécessaires aux muscles et aux tissus adipeux, via la lipoprotéine lipase. Les chylomicrons se transforment progressivement en chylomicrons résiduels capturés par le foie. C'est à cet endroit que sont formés les VLDLs (lipoprotéines de très faible densité), dont une partie se transforme en LDLs dans la circulation sanguine. Les LDLs apportent le cholestérol aux tissus périphériques ou sont capturés par le foie via les LDL-Rs (récepteurs aux LDLs).

L'excès de cholestérol présent dans les tissus périphériques est prélevé par les HDLs (lipoprotéines de haute densité), formées dans l'intestin et le foie, via un processus nommé « transport réverse du cholestérol ». La capture du cholestérol par les HDLs est permise via le transporteur membranaire ABCA1 (« ATP-binding cassette type A1 »). Le cholestérol capturé est estérifié via la LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase) : les HDLs matures sont formées et peuvent également fixer le cholestérol via un autre transporteur, ABCG1 (« ATP-binding cassette type G1 »).

Enfin, les HDLs apportent ce cholestérol au foie via le récepteur SR-BI. Le cholestérol des HDLs peut également être transféré aux LDLs ou VLDLs via la CETP (« cholesteryl ester transfer protein »).

(Rader and Daugherty, 2008)

apolipoprotéine représente une forme tronquée de la molécule d'APOB100 correspondant à 48 % de sa masse moléculaire. En effet, il a été montré par Powell et al. en 1987 que l'ARNm codant pour l'APOB peut subir un épissage alternatif, ce qui produit de l'APOB48. L'APOB48 résulte de la déamination d'une base, avec la conversion de C en U de la séquence l'ARNm codant pour l'APOB, par l'enzyme APOBEC-1, résultant en un codon stop UAA prématuré. Ceci termine la traduction dans les entérocytes et permet donc la production de l'APOB48 (Nakajima et al., 2014; Powell et al., 1987). L'APOBEC-1 est peu exprimée dans le foie chez l'homme, mais est bien exprimée dans le foie des rongeurs.

D'autres apolipoprotéines sont également nécessaires pour le transport des lipides par les chylomicrons : APOAI, APOAII, APOAIV, APOAV, APOCII, APOCIII et APOE. Leur cœur hydrophobe est lui composé de triglycérides et d'esters de cholestérol (Feingold and Grunfeld, 2015; Hussain, 2014).

Une fois les lipides alimentaires absorbés par les entérocytes, ils sont sécrétés sous forme de chylomicrons (Fig. I.2.13). En effet, l'APOB48, synthétisée de manière constitutive dans les entérocytes chez l'homme, interagit avec la protéine MTTP « microsomal triglyceride transfer protein », permettant ainsi à cette dernière de transférer des lipides (esters de cholestérol, phospholipides et triglycérides) à l'APOB48. Cette étape de chargement en lipides commence par le repliement de l'APOB48, ce qui empêche sa dégradation par le protéasome. L'APOB48, dans sa bonne conformation, peut ensuite se charger de lipides (triglycérides) : la lipoprotéine augmente en taille et à sa surface, s'ajoute l'APOAIV qui semble jouer un rôle dans l'assemblage de la particule (Hussain, 2014; Nakajima et al., 2014).

Les chylomicrons sont ensuite transférés vers le cis-Golgi via les PCTVs (« pre-chylomicron transport vehicles »). Au sein du Golgi, les chylomicrons subissent différentes modifications dont l'ajout d'APOAI et la glycosylation de l'APOB48.

Ils sont ensuite sécrétés au pôle basolatéral des entérocytes et via les capillaires lymphatiques, arrivant dans le canal thoracique d'où ils regagnent la circulation sanguine (Hussain, 2014).

Une fois dans le sang, les chylomicrons au contact des HDLs vont échanger des apoprotéines. L'APOAI se dissocie du chylomicron, qui acquiert l'APOCII, permettant l'hydrolyse des triglycérides via l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL) présente à la surface de l'endothélium vasculaire, en particulier au niveau des muscles squelettiques et du tissu adipeux, et qui interagit avec les chylomicrons (Nakajima et al., 2014). Les acides gras, alors libérés, servent soit de source d'énergie au niveau des muscles, soit sont stockés sous forme de triglycérides au niveau du tissu adipeux (Weber et al., 2010). Cette hydrolyse des triglycérides au sein des chylomicrons a comme conséquence une réduction de leur taille ainsi qu'une augmentation de leur instabilité suite à un déséquilibre structural entre le cœur hydrophobe et l'enveloppe (Weber et al., 2010).

Les apolipoprotéines AI, AII, CII ainsi que le cholestérol non estérifié et les phospholipides se dissocient à leur tour de la lipoprotéine et contribuent à la formation des HDLs naissantes.

Enfin, les chylomicrons résiduels, appelés « remnants », sont principalement constitués d'esters de cholestérol et d'APOE, permettant leurs capture, internalisation et catabolisme par les hépatocytes via la reconnaissance de l'APOE par la LRP (« LDL-R-related protein ») et le LDL-R (Mesmin and Maxfield, 2009; Weber et al., 2010).

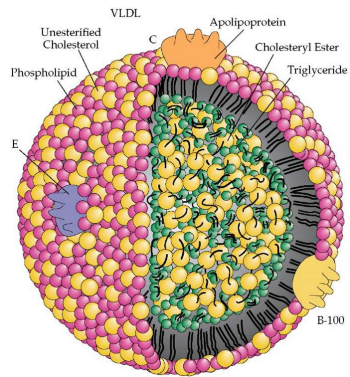


Figure I.2.14. Structure d'une particule de VLDL.
(what-when-how.com)

2.1.3.2.2 VLDLs

Les VLDLs sont des lipoprotéines sécrétées de manière continue par le foie et impliquées dans le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques (Nakajima et al., 2014; Tiwari and Siddiqi, 2012).

Leur densité est comprise entre 0,95 et 1,006 g/ml et leur diamètre est de 70 à 80 nm (40 nm pour les IDLs « intermediate-density lipoproteins ») (Fig. I.2.14).

La synthèse des VLDLs a lieu, comme pour les chylomicrons, en 2 étapes. Elle débute tout d'abord par la synthèse d'APOB100, protéine de structure essentielle pour les VLDLs, IDLs et LDLs, à la surface du RE des cellules hépatiques. L'APOB100 nouvellement synthétisée est transloquée à travers la membrane du RE rugueux vers la lumière du RE. L'étape suivante débute alors par un chargement partiel de l'APOB100 en lipides, aboutissant à la formation d'une particule de VLDL primaire. Comme pour les chylomicrons, cette étape est facilitée par la MTTP (Tiwari and Siddiqi, 2012). Si le transfert lipidique ne se fait pas sur l'APOB100, cette dernière est dégradée, soit par le protéasome via les chaperones cytosoliques HSP70 et HSP90 (Gusarova et al., 2001; Zhou et al., 1998), soit via une voie indépendante du protéasome (Fisher et al., 2001).

La deuxième étape consiste en une fusion de la particule de VLDL « primaire » avec une particule riche en triglycérides (Tiwari and Siddiqi, 2012).

La VLDL ainsi formée est transportée via une « VTV » (« VLDL transport vesicle ») vers le cis-Golgi, différente des vésicules de la voie sécrétoire classique transportant par exemple l'albumine, appelées PTVs (« protein transport vesicles ») (Fig. I.2.15) (Siddiqi et al., 2003).

La formation des VTVs est un mécanisme GTP et COP-II-dépendant, au contraire des PCTVs (pour les chylomicrons). En effet, les protéines de type COP-II contenues dans les PCTVs ne sont nécessaires que pour la fusion au Golgi (Tiwari and Siddiqi, 2012). Leur entrée dans le Golgi est médiée via un mécanisme de reconnaissance de type v-SNARE/t-SNARE (« vesicle-/target membranes-soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment protein receptor ») (Fig. I.2.15).

Les PCTVs utilisent VAMP7 (« vesicle-associated membrane protein 7 ») en tant que protéine v-SNARE alors que les VTVs utilisent SEC22b (Siddiqi et al., 2010; Siddiqi et al., 2006). SEC22b forme un complexe SNARE avec 3 t-SNARE apparentées : GS28, la synthaxine 5 ou la rBET1 (Siddiqi et al., 2010).

Lorsque la VLDL est entrée au sein du Golgi, l'APOB100 associée subit des modifications dont notamment plusieurs O-glycosylations (notamment démontrées par l'équipe de Yao en 2002) (Tran et al., 2002) et des phosphorylations (Swift, 1996). La VLDL a déjà été modifiée dans le RE par plusieurs N-glycosylations qui s'achèvent dans le Golgi. Il est également possible que l'APOAI s'associe à la particule dans la lumière du Golgi. Le groupe de Siddiqi a émis l'hypothèse qu'elle serait transportée par des PTVs (« protein transport vesicles ») dans le Golgi (Fig. I.2.15) (Rahim et al., 2012). Le transport post-golgien reste mal connu. Il n'est pas exclu que chaque vésicule post-golgienne puisse transporter plusieurs VLDLs vers la membrane plasmique, permettant leur sécrétion au pôle vasculaire des cellules hépatiques dans la circulation sanguine.

Dans le sang, la lipoprotéine lipase (LPL), associée à la surface luminale des cellules endothéliales de capillaires, agit sur ces VLDLs, celles-ci permettant la récupération des acides gras au niveau des tissus périphériques (tissus adipeux et muscles) (Fig. I.2.13) (Barter, 2014). Les VLDLs sont donc progressivement appauvries en triglycérides et deviennent des IDLs (« intermediate-density lipoproteins ») ou VLDLs résiduelles, enrichies en esters de cholestérol et possédant un ratio plus faible d'APOC, APOE et

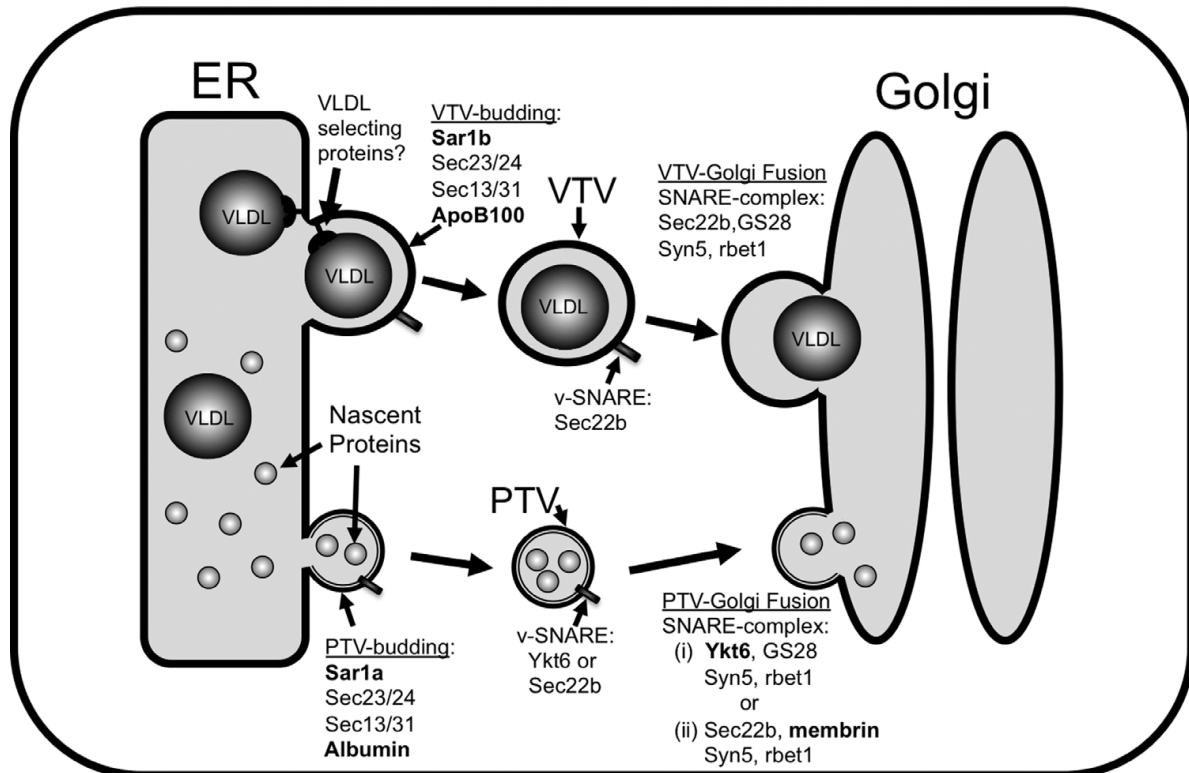


Figure I.2.15. Transport des VLDLs du RE vers le Golgi dans les hépatocytes.

Les étapes finales de la formation des VLDLs ont lieu dans la lumière du RE. Une fois formées, les VLDLs sont transportées vers le cis-Golgi, grâce à des VTVs (« VLDL transport vesicles »). Les protéines impliquées dans l'internalisation des VLDLs dans les VTVs et dans l'ancrage des VTVs au Golgi ne sont pas encore connues.

Les protéines naissantes sont transportées du RE vers le Golgi, au moyen des PTVs (« protein transport vesicles »).

La formation des VTVs et des PTVs, à partir de la membrane du RE, est un mécanisme COP-II-dépendant. Cependant, des homologues différents de SAR1 sont nécessaires pour le processus de bourgeonnement (SAR1a pour les PTVs et SAR1b pour les VTVs). Les protéines SNARE, nécessaires pour la fusion des VTVs ou des PTVs avec la membrane du Golgi, sont également différentes en fonction du type de vésicule.

(Tiwari and Siddiqi, 2012)

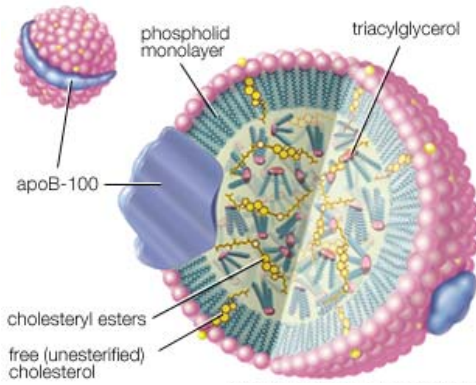


Figure I.2.16. Structure d'une particule de LDL.
(<https://www.britannica.com/science/low-density-lipoprotein>)

APOB (Berneis and Krauss, 2002). De plus, les IDLs acquièrent l'APOE des HDLs, ce qui permet leur capture par le foie via la liaison de l'APOE au LDL-R ou au LRP (Feingold and Grunfeld, 2015).

Les IDLs subissent ensuite l'action de la lipase hépatique (HL), synthétisée par les hépatocytes et présente à la surface des capillaires sinusoides, ce qui entraîne une diminution du contenu en triglycérides résiduels, et ce qui a pour effet de diminuer la taille des IDLs et de transférer les apolipoprotéines aux autres lipoprotéines (en particulier les HDLs naissantes), permettant la formation de LDLs. Seule l'APOB100 est conservée (Feingold and Grunfeld, 2015; Ramasamy, 2014). La CETP est également nécessaire à leur formation via l'échange d'esters de cholestérol provenant des HDLs avec les triglycérides des VLDLs/IDLs (Fig. I.2.13).

2.1.3.2.3 LDLs

Les LDLs sont des lipoprotéines composées majoritairement de cholestérol, estérifié (42 %) et libre (8 %), et munies seulement de l'apolipoprotéine B100 assurant le maintien de son intégrité structurelle (Fig. I.2.16) (Berneis and Krauss, 2002). De manière comparable aux autres lipoprotéines, elles sont composées d'un cœur hydrophobe constitué d'esters de cholestérol et de triglycérides en quantité variable, et d'une enveloppe de phospholipides et de cholestérol non estérifié, structurée par l'APOB100 (Barter, 2014). Les LDLs acquièrent également des esters de cholestérol des HDLs via l'action de la CETP (Barter, 2014).

Leur densité est comprise entre 1,006 et 1,062 g/ml, tandis que leur diamètre est en moyenne de 20 nm. Chaque particule de LDL contient donc environ 1600 molécules d'esters de cholestérol et 600 molécules de cholestérol libre et possède un temps de demi-vie dans la circulation sanguine d'environ 2 jours, ce qui en fait le transporteur majeur de cholestérol chez l'homme (Goldstein and Brown, 2009; Miller et al., 2010). Elles jouent donc un rôle de transporteur des lipides, et plus principalement du cholestérol, vers les tissus périphériques.

La particule de LDL possède un domaine de reconnaissance au LDL-R (« low-density lipoprotein receptor »), récepteur de très haute affinité et important pour le transport des LDLs vers les tissus extra-hépatiques et vers le foie. Ce récepteur, découvert en 1974 par Goldstein et Brown, est exprimé par la plupart des types cellulaires dont les hépatocytes (voir 2.1.5.1 Récepteurs aux LDLs natives) (Barter, 2014; Goldstein and Brown, 1974; Nakajima et al., 2014).

Environ 70 % des LDLs circulantes sont éliminées par le foie grâce à l'endocytose dans les cellules hépatiques induite par la reconnaissance de la particule de LDL par le LDL-R. L'expression du LDL-R dans les hépatocytes est régulée par le contenu intracellulaire en cholestérol comme déjà vu au Point 2.1.3.1.2 Cholestérol – Régulation de sa synthèse et internalisation (Fig. I.2.9) (Feingold and Grunfeld, 2015).

Une fois formé, le complexe LDL/LDL-R est endocyté dans des vésicules tapissées de clathrine, qui mûrent en endosomes avant de fusionner avec les lysosomes. Les endosomes permettent le recyclage des LDL-R en membranes (voir 2.1.5.1 Récepteurs aux LDLs natives). Les hydrolases acides lysosomales (phospholipases, protéases, triglycéride lipases, cholestérol estérase acide, ...) agissent alors afin de dégrader les LDLs. *In fine*, le cholestérol libre sera métabolisé en sels biliaires par le foie, tandis que dans les tissus extra-hépatiques, le cholestérol sera utilisé dans la production

d'hormones stéroïdiennes, telles que l'aldostérone et le cortisol par les cellules surrénaliennes ou les oestrogènes et testostérone dans les gonades. Le cholestérol est aussi utilisé pour la génération de nouvelles membranes lors de la division cellulaire ou est emmagasiné au sein des cellules, après estérification par l'ACAT-1 exprimée en membrane du RE (Barter, 2014; Chistiakov et al., 2016; Mesmin and Maxfield, 2009).

Il est possible que des LDLs persistent un certain temps dans la circulation sanguine. Dans ce cas, elles peuvent subir des modifications telles qu'oxydation, acétylation ou glycation. Le domaine de reconnaissance par le LDL-R peut alors être altéré, empêchant sa reconnaissance. Une fois modifiées au niveau de l'APOB100, elles sont donc reconnues par les récepteurs dits « scavenger », exprimés notamment par les macrophages et cellules musculaires lisses, permettant la formation de cellules spumeuses, importantes dans la formation et l'évolution des plaques athéroscléreuses (voir 2.1.5.2 Récepteurs « scavenger » et 2.1.2 Formation d'une plaque athéroscléreuse) (Goldstein et al., 2006; Mesmin and Maxfield, 2009; Russell, 1992; Steinberg, 2009).

Les LDLs sont des lipoprotéines hétérogènes. Elles sont classées en plusieurs sous-catégories, en fonction de leur densité et leur taille. Les plus petites et les plus denses sont en fait les plus athérogènes (Feingold and Grunfeld, 2015). Elles diffèrent des LDLs de taille normale par une concentration en phospholipides et en esters de cholestérol plus basse. Comme déjà mentionné, la CETP est nécessaire à leur formation (Fig. I.2.13) (Rader and Daugherty, 2008). Les LDLs sont enrichies en triglycérides et subissent ensuite l'action de la lipase hépatique, réduisant leur taille et augmentant ainsi leur densité (Feingold and Grunfeld, 2015). De plus, il a été montré que la phospholipase A₂ sécrétée (sPLA₂) est également capable de modifier les LDLs pour former des LDLs petites et denses. Un taux élevé de LDLs petites et denses, associé avec un taux élevé de sPLA₂ plasmatique, est corrélé avec un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires (Sartipy et al., 1999).

Notons également l'importance de la lipoprotéine(a) (Lp(a)) dans les maladies cardiovasculaires. Cette lipoprotéine, toujours un peu énigmatique, est très similaire à une LDL, avec une APOB100 et les lipides associés aux LDLs (Fig. I.2.11), mais elle est beaucoup plus dense. Elle contient en outre une molécule spécifique d'APO(a), produite également par le foie. L'APO(a) est très glycosylée et hydrophile, biochimiquement hétérogène et la détection d'isoformes de petite taille a été associée avec un risque élevé de maladies cardiovasculaires. De plus, une augmentation de la concentration en Lp(a) a été associée avec une augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires. Ce risque sera d'autant plus important si une concentration élevée en Lp(a) est associée avec une concentration élevée en LDLs (pour une revue, voir (Jacobson, 2013)).

2.1.3.2.4 HDLs

Il est indispensable pour les cellules d'éliminer le cholestérol lorsque son accumulation devient excessive. En effet, en excès, il est toxique pour la plupart des cellules incapables de le métaboliser, sauf pour les cellules hépatiques qui le métabolisent en sels biliaires, les cellules stéroïdogéniques qui l'utilisent pour la production d'hormones, ou encore les cellules intestinales, les sébocytes et les kératinocytes, capables d'éliminer le cholestérol par sécrétion dans la lumière intestinale ou en surface de la peau.

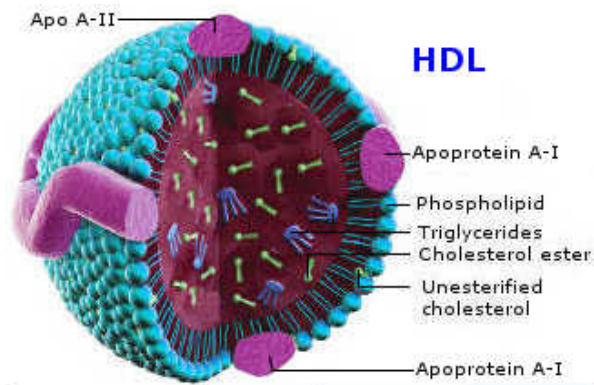


Figure I.2.17. Structure d'une particule de HDL.
(diabetesandglucoseworld.com)

Les HDLs (Fig. I.2.17) sont les lipoprotéines chargées de transporter le cholestérol des tissus périphériques vers le foie, via un processus appelé « **transport inverse du cholestérol** », permettant ainsi de diminuer la concentration en cholestérol intracellulaire et contribuant à l'homéostasie du cholestérol (Ramasamy, 2014).

On leur attribue un rôle anti-athérogène et il a été montré qu'un taux élevé de HDLs plasmatiques est associé à un risque diminué de développer des maladies cardiovasculaires (Castelli, 1984).

Les HDLs ont une densité comprise entre 1,062 et 1,20 g/ml et présentent un diamètre d'environ 10 nm. Elles sont constituées en majorité de l'APOAI (70 % de la particule). Elles sont considérées comme hétérogènes et classées en différentes sous-classes en fonction de leur taille, leur densité, leur composition lipidique et leur contenu en apolipoprotéines (Davidsson et al., 2010; Rothblat and Phillips, 2010; Vaisar et al., 2007b). Dans ces sous-classes se retrouvent les HDLs naissantes (« nascent HDLs »), progénitrices des sous-classes de HDL₂ et HDL₃, représentant les deux sous-populations majeures de HDLs circulantes chez l'homme. Les HDL₂ sont de grande taille, avec une densité de 1,062 à 1,125 g/ml, et riches en esters de cholestérol tandis que les HDL₃ sont petites, plus denses (1,125 à 1,20 g/ml), pauvres en esters de cholestérol et riches en protéines (Tall, 1990). Les HDLs naissantes ont une structure discoïdale, elles sont riches en cholestérol peu estérifié et sont stabilisées par les apolipoprotéines AI, CII, CIII et E. Lors de leur maturation, elles acquièrent des triglycérides, de l'APOAII et AIV leur permettant de devenir sphérique, en échange de l'APOCII, CIII et E avec les chylomicrons et VLDLs (Figs. I.2.17 et I.2.18) (Kratzer et al., 2014; Rothblat and Phillips, 2010).

La première étape de la synthèse des HDLs débute par la synthèse de l'apolipoprotéine AI dans le foie et les intestins. Elles sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine avec peu ou pas de lipides associés. Une fois dans la circulation, elles acquièrent du cholestérol et des phospholipides via leur efflux au départ des hépatocytes et entérocytes. Cet efflux de cholestérol et phospholipides est médié par le transporteur membranaire ABCA1, reconnaissant l'APOAI de la HDL (Fig. I.2.13) (Brunham et al., 2006; Oram and Vaughan, 2006). Cette deuxième étape mène à la formation d'HDLs naissantes.

Les HDLs acquièrent également des lipides provenant d'autres tissus (cellules musculaires, adipocytes, ...) exprimant ABCA1 et de lipoprotéines (chylomicrons et VLDLs) via la lipolyse de leurs triglycérides par la LPL et leur transfert subséquent aux HDLs.

Le cœur hydrophobe des HDLs est constitué d'esters de cholestérol. Cependant, le cholestérol provenant de l'efflux des cellules et transféré en surface des HDLs s'avère être du cholestérol libre. Afin de produire des HDLs de grande taille et matures, celui-ci doit être estérifié par la LCAT (« lecithin-cholesterol acyltransferase »). Cette enzyme synthétisée par le foie s'associe aux HDLs circulantes et est activée via son interaction avec l'APOAI, catalysant le transfert d'un acide gras de la phosphatidylcholine au cholestérol libre. Cette réaction permet la production d'esters de cholestérol, qui ainsi formés, se déplacent de la surface vers le cœur de la lipoprotéine (Fig. I.2.19) (Feingold and Grunfeld, 2015). Un autre transporteur ABC, ABCG1, joue un rôle important dans l'efflux du cholestérol des cellules spumeuses aux HDLs matures (Fig. I.2.19) (Kennedy et al., 2005; Remaley et al., 2014).

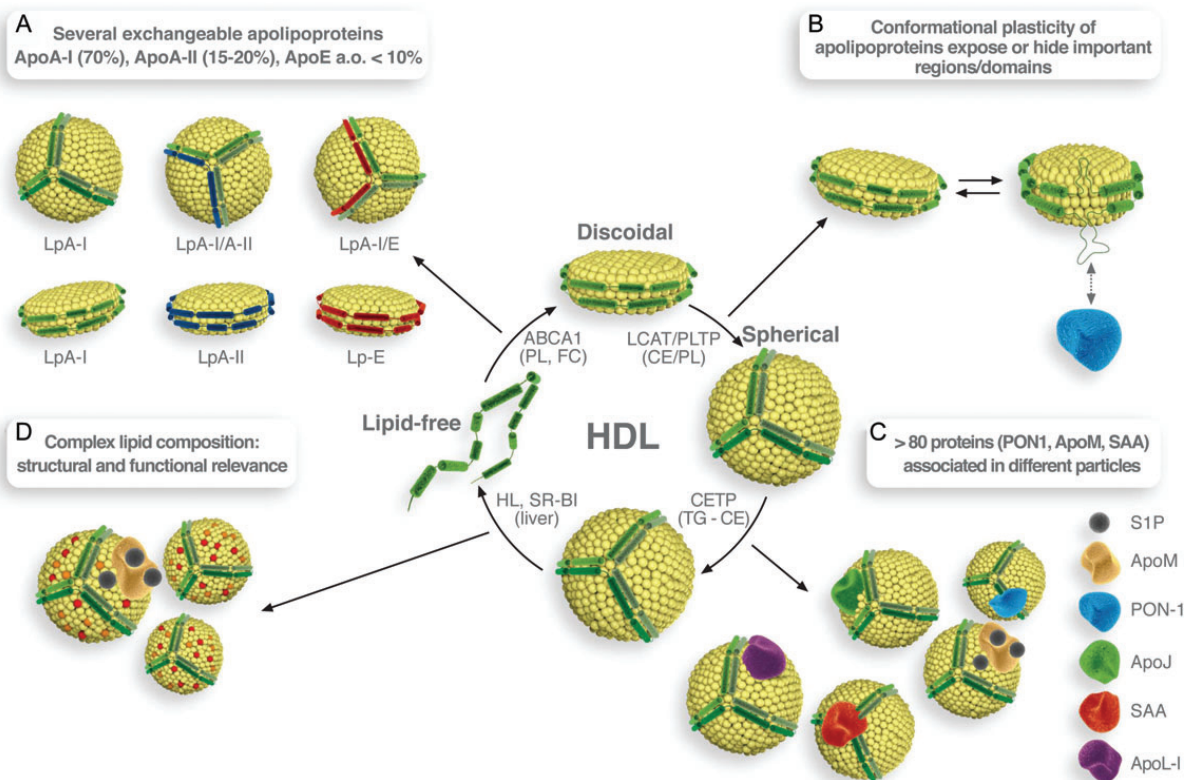


Figure I.2.18. Hétérogénéité des HDLs.

Le métabolisme normal des HDLs implique des modifications au niveau de leur composition mais aussi de leur structure. En effet, les HDLs se forment d'abord grâce à l'association de l'apolipoprotéine AI avec des phospholipides et du cholestérol libre. Ces HDLs naissantes ont une forme discoïdale. L'ajout d'esters de cholestérol et de phospholipides, via l'action de la LCAT (« lecithin cholesterol acetyltransferase ») et de la PLTP (« phospholipid transfer protein », induit la formation de HDLs sphériques, de petite taille. Ensuite, l'échange d'esters de cholestérol et de triglycérides avec les VLDLs ou les LDLs, via la CETP (« cholesteryl ester transfer protein », induit une augmentation de la taille des HDLs. Enfin, via l'action notamment de l'hormone sensitive lipase et de SR-BI, le cholestérol contenu dans les HDLs est transféré aux hépatocytes, qui vont le métaboliser. Les HDLs sont ensuite libérées dans la circulation et disponibles pour recevoir à nouveau des esters de cholestérol.

Plusieurs autres propriétés peuvent augmenter la complexité des HDLs :

A. Plusieurs combinaisons d'apolipoprotéines échangeables lui confèrent des propriétés différentes.

B. Chacune de ces apolipoprotéines échangeables présente une plasticité conformationnelle, leur permettant donc d'exposer ou de cacher des domaines potentiellement importants pour des interactions avec d'autres protéines.

C. Plus de 80 protéines (apolipoprotéines comprises) ont été identifiées comme étant associées aux HDLs, telles que PON-1 (paraonase-1) ou la clusterine (APOJ). Chacune de ces protéines assure des fonctions en lien avec celles de HDLs, comme par exemple PON-1 qui possède des propriétés antioxydantes.

D. La composition lipidique peut également différer entre HDLs, influençant ainsi leur structure et leurs fonctions.

(Kratzner et al., 2014)

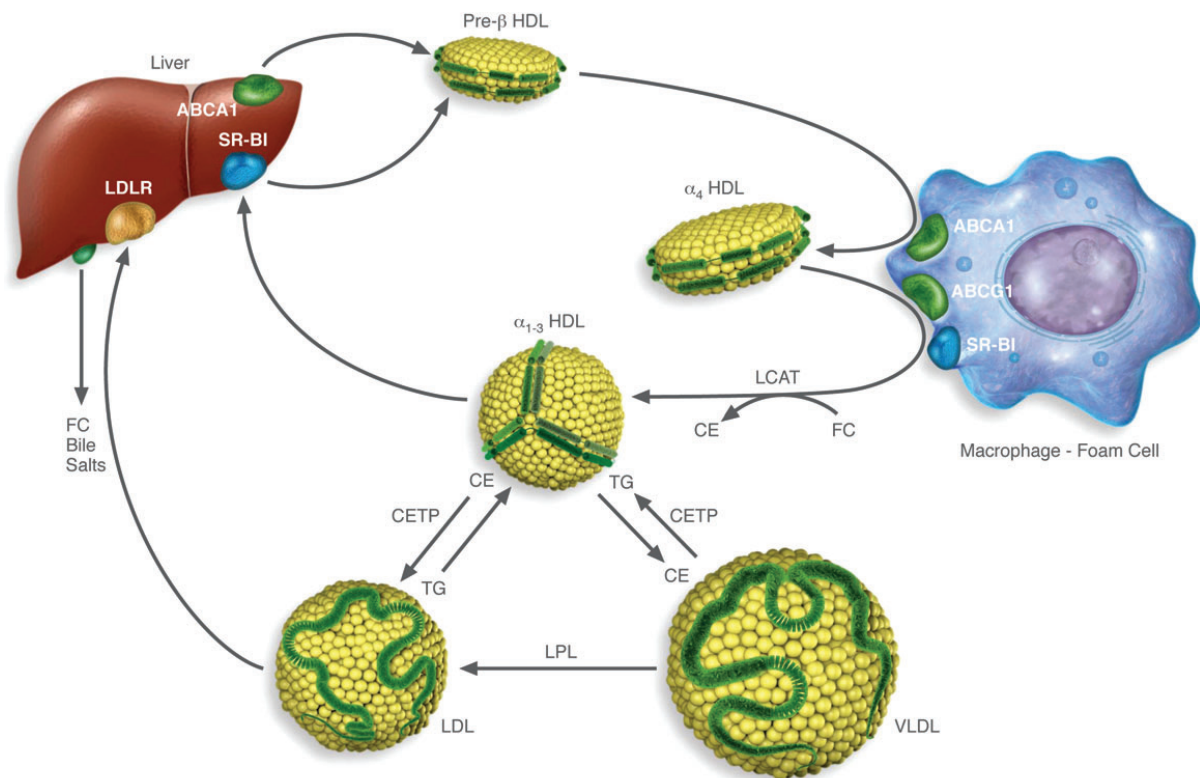


Figure I.2.19. Transport inverse du cholestérol.

Le transport inverse du cholestérol commence par la formation de HDLs naissantes (pré- β HDLs), principalement dans le foie, mais aussi dans l'intestin dans une moindre mesure. Ces HDLs sont formées par l'association de l'APOAI avec des phospholipides et du cholestérol libre, via le transporteur ABCA1. Elles augmentent de taille et deviennent des HDLs de type α_4 après acquisition de lipides provenant des cellules des tissus périphériques telles que les macrophages. Ensuite, les HDLs deviennent sphériques (HDLs α_{1-3}) après acquisition de cholestérol grâce à ABCG1 ou SR-BI et estérification du cholestérol par la LCAT. La taille des HDLs augmente de plus via l'échange d'esters de cholestérol et de triglycérides avec les VLDLs ou LDLs. Cet échange est médié par la CETP.

Le cholestérol, contenu dans les HDLs, est ensuite transporté vers le foie (ou les cellules stéroïdogéniques). Il est transféré dans les hépatocytes via la liaison des HDLs à SR-BI et est ensuite métabolisé en sels biliaires ou directement sécrété dans la bile. Les HDLs, revenues à leur conformation pré- β HDL, sont ensuite libérées dans la circulation.

(Remaley et al., 2014)

Le cholestérol est alors transporté par les HDLs vers le foie ou les cellules stéroïdogéniques. Là, elles se lient au récepteur SR-BI (voir Paragraphe 2.1.5.2.2 Récepteurs « scavenger » de classe B), ce qui permet le transfert du cholestérol dans la cellule sans internalisation des particules de HDLs, qui sont libérées dans la circulation et disponibles à nouveau pour recevoir des esters de cholestérol (Figs. I.2.18 et I.2.19) (Ikonen, 2006; Remaley et al., 2014).

Dans le foie, le cholestérol est transformé en sels biliaires ou directement sécrété dans la bile puis est éliminé dans les voies biliaires vers l'intestin. Les sels biliaires sont importants puisqu'ils permettent l'émulsification des graisses provenant de l'alimentation dans l'intestin, cette étape étant critique pour leur digestion par les lipases pancréatiques.

La production d'acides biliaires a lieu par oxydation du cholestérol en acide cholique, suivie de sa conjugaison avec de la glycine ou de la taurine. Les sels biliaires sont ensuite envoyés dans les voies biliaires et sont stockés dans la vésicule biliaire qui concentre la bile (Ikonen, 2006). Plus de 95 % des sels biliaires, libérés dans le duodénum, sont recyclés via la circulation entéro-hépatique.

Le transport du cholestérol dans la bile est promu par l'expression des transporteurs ABCG5 et ABCG8.

Les esters de cholestérol présents dans le cœur de la HDL peuvent également être transférés, grâce à l'action de la CETP, aux lipoprotéines contenant de l'APOB (VLDLs, IDLs et LDLs), en échange de triglycérides. Les HDLs s'enrichissent donc en triglycérides, qui seront finalement métabolisés par les lipases hépatiques. Ceci permet finalement la formation de petites HDLs, avec la libération et la dégradation de l'APOAI, catabolisée principalement par les reins et en moindre mesure par le foie (Feingold and Grunfeld, 2015; Rothblat and Phillips, 2010).

Le transport inverse du cholestérol est principalement régulé au niveau des transporteurs ABCA1 et ABCG1. Leur expression est elle-même régulée par les facteurs de transcription LXR (« liver X receptor ») et PPAR γ (« peroxysome-proliférateur activé récepteur- γ »), qui, en cas d'activation, augmentent l'expression de ces transporteurs ABC (Chinetti et al., 2001; Ramasamy, 2014). Par exemple, lorsque le niveau de cholestérol intracellulaire augmente, la production d'oxystérols augmente également, ce qui a pour conséquence l'activation du LXR, augmentant ainsi l'expression d'ABCA1 et ABCG1 et donc l'efflux de cholestérol des cellules aux HDLs (Feingold and Grunfeld, 2015; Zhao and Dahlman-Wright, 2010).

De plus, les ARNm codant pour ABCA1 et ABCG1 sont la cible de miR-33, lui-même étant codé par un intron situé dans le gène de SREBP2 et donc co-exprimé avec SREBP2 (Marquart et al., 2010). Lorsque la concentration en cholestérol intracellulaire diminue, SREBP2 est activé, favorisant l'expression de LDL-R et de la HMG-CoA réductase, tandis que l'augmentation de l'expression de miR-33 favorise la dégradation des ARNm codant pour l'ABCA1 et ABCG1, réduisant l'efflux de cholestérol (Marquart et al., 2010).

L'AMP cyclique est aussi capable d'induire la transcription d'ABCA1 dans certains types cellulaires et en particulier dans les macrophages (Oram et al., 2000).

Enfin, une des caractéristiques majeures des HDLs est leur richesse en protéines dont les apoprotéines. En effet, on en compterait en tout jusqu'à 80, telle la paraoxonase-1 (PON-1) (Fig. I.2.18). Ces protéines contribuent aux propriétés anti-athérogènes et anti-oxydantes des HDLs (Davidson et al., 2009; Kratzer et al., 2014; Vaisar et al., 2007a).

2.1.4 Mécanismes d'oxydation des LDLs

Il est aujourd'hui globalement accepté dans la communauté scientifique qu'une concentration élevée de LDLs plasmatiques (aspect quantitatif), mais aussi la production de LDLs oxydées (aspect qualitatif), représentent des facteurs clés dans l'initiation et l'évolution de lésions athéroscléreuses.

Un des arguments majeurs du lien entre LDLs plasmatiques et maladie cardiovasculaire vient des observations faites chez des enfants souffrant d'hypercholestérolémie familiale, l'une des causes majeures étant un LDL-R non fonctionnel ou non (ou peu) exprimé en membrane plasmique, ce qui explique des taux de LDLs plasmatiques anormalement élevés (au delà de 400-500 mg/dl chez les homozygotes) (Gidding, 2016; Goldstein et al., 1983). Or, malgré le déficit en LDL-R fonctionnel, une accumulation de cholestérol est observée dans les lésions artérielles, les tendons et les tissus sous-cutanés (xanthomes). De plus, *in vitro*, il a été montré que l'incubation de monocytes/macrophages avec des LDLs natives ne conduit pas à une accumulation significative de cholestérol intracellulaire (Goldstein et al., 1979). Il s'agit du « paradoxe des LDLs ».

Il est donc nécessaire que les LDLs soient oxydées ou modifiées (ex. : agrégation, acétylation). Dans ce cas, elles sont reconnues, non plus par les LDL-R, mais par les récepteurs dits « scavenger » (SR) (voir 2.1.5.2 Récepteurs « scavenger »). L'expression de ceux-ci, contrairement aux LDL-R, n'est pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol. Les LDLs oxydées se lient aux récepteurs « scavenger », exprimés notamment par les macrophages, et sont endocytées, ce qui entraîne la formation de gouttelettes lipidiques, avec la formation de cellules spumeuses favorisant l'athérogenèse.

Depuis, de nombreuses études ont établi un lien entre une concentration élevée de LDLs oxydées plasmatiques et le risque de développer des maladies cardiovasculaires. Holvoet et al., en 2001, ont notamment démontré qu'une concentration élevée en LDLs oxydées circulantes était associée avec un risque élevé de maladie coronarienne. Les auteurs suggèrent même d'utiliser le critère de concentration en LDLs oxydées comme marqueur d'identification des patients souffrant de maladie coronarienne (Holvoet et al., 2001). Ehara et al. vont même plus loin, en démontrant qu'une sévérité plus importante des maladies coronariennes est corrélée à une concentration élevée en LDLs oxydées plasmatiques (Ehara et al., 2001). En 2008, Holvoet et al. ont également démontré que la concentration élevée en LDLs oxydées circulantes est associée avec un risque élevé de syndrome métabolique et une hyperinsulinémie, deux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. Ils ont également démontré que cette concentration élevée de LDLs oxydées est associée avec un risque élevé d'infarctus du myocarde (Holvoet et al., 2008).

Les modifications au sein des LDLs, de même que la génération de produits secondaires liés aux modifications, dépendent à la fois du type d'oxydant, de l'étendue de l'oxydation et de la présence ou absence d'autres agents oxydants tels que des métaux impliqués dans les réactions redox (ex. : Fe, Cu) (Parthasarathy et al., 2010).

Afin de comprendre l'oxydation des LDLs, plusieurs protocoles d'oxydation ont été développés *in vitro*. Deux techniques d'oxydation ont été utilisées dans ce travail: via

l'utilisation de sulfate de cuivre (CuSO_4), méthode classique d'oxydation décrite depuis plusieurs décennies et via l'action d'une enzyme appelée myéloperoxydase. Néanmoins, il est à noter que les LDLs oxydées sont hétérogènes, c'est pourquoi il n'existe pas de protocole d'oxydation universel (Berneis and Krauss, 2002).

Ce sont les acides gras polyinsaturés (« polyunsaturated fatty acids » ou PUFA) des lipoprotéines qui sont une des cibles privilégiées de l'oxydation (Hevonoja et al., 2000), sans oublier le cholestérol qui peut aussi être oxydé en différentes formes (voir par exemple (Orso et al., 2015)). Dans le cas des LDLs, l'APOB100 est également une cible importante via une oxydation directe ou bien indirecte via des produits de l'oxydation lipidique (Miller et al., 2010).

Même si nous allons nous focaliser sur les mécanismes d'oxydation des LDLs dans ce chapitre, il est à noter que les VLDLs et HDLs sont également susceptibles d'être modifiées (Bradamante et al., 1992; Parthasarathy et al., 1989).

2.1.4.1 Modifications par des ions métalliques de transition

2.1.4.1.1 Le cation Fe^{2+} (groupement hème)

L'oxydation des LDLs *in vivo* serait notamment associée à une augmentation de la libération d'hémoglobine provenant des érythrocytes lysés au sein de zones vasculaires avec flux perturbé (Sevanian and Asatryan, 2002).

En effet, des mécanismes d'oxydation via des ions métalliques tels que le cation Fe^{2+} ont été décrits dans la littérature. Lorsque le Fe^{2+} est présent, ce qui est le cas dans le groupement hème, qui est constitué d'un complexe ferreux avec la protoporphyrine IX, il devient un agent oxydant important (Miller and Britigan, 1995).

L'oxydation des LDLs par le groupement hème entraîne des « cross-linkings » APOB-APOB et hémoglobine-APOB dans le sang, ainsi qu'une production de peroxydes lipidiques (Miller et al., 1996). Cette oxydation des LDLs médiée par le groupement hème serait accélérée en présence de peroxydes à faible concentration (Balla et al., 1991).

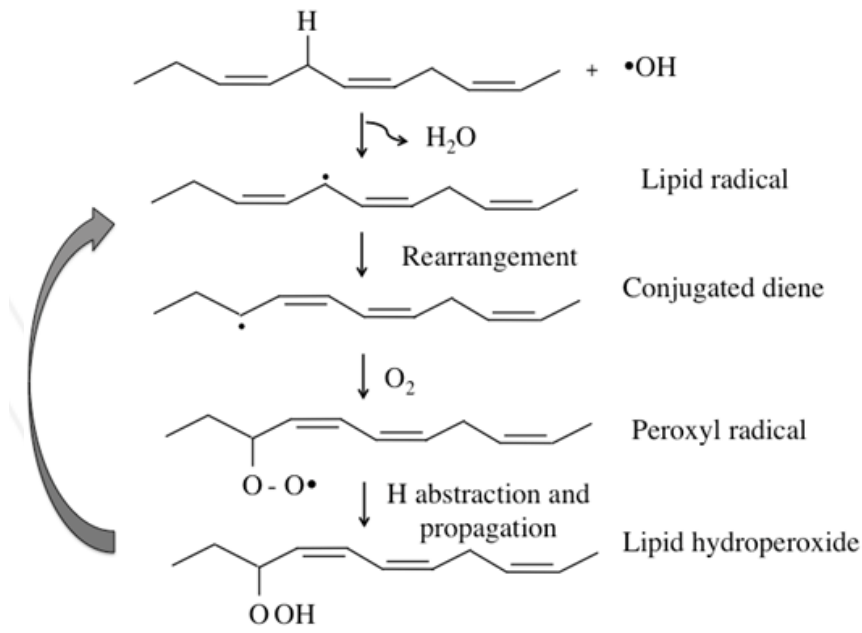
Cependant, les modifications résultant de l'oxydation sont moins importantes qu'avec du sulfate de cuivre.

2.1.4.1.2 Le sulfate de cuivre (CuSO_4)

L'incubation de LDLs avec des ions métalliques de transition, et plus particulièrement avec le CuSO_4 , est l'une des premières méthodes d'oxydation développée et utilisée *in vitro* (Heinecke et al., 1984). Elle a été particulièrement bien caractérisée par l'équipe d'Esterbauer qui a proposé deux sites de liaison au niveau des LDLs pour les ions Cu^{2+} (Esterbauer et al., 1992; Ziouzenkova et al., 1998).

L'oxydation des LDLs et en particulier des acides gras par le sulfate de cuivre se déroule en trois étapes (Fig. I.2.20). La première est la **phase de latence** ou « lag phase » pendant laquelle les antioxydants présents dans les LDLs (ex. : le β -carotène) sont consommés. Ensuite commence la **phase de propagation** au cours de laquelle s'accumulent des produits de la peroxydation lipidique (oxystérols, diènes conjugués et

A.



B.

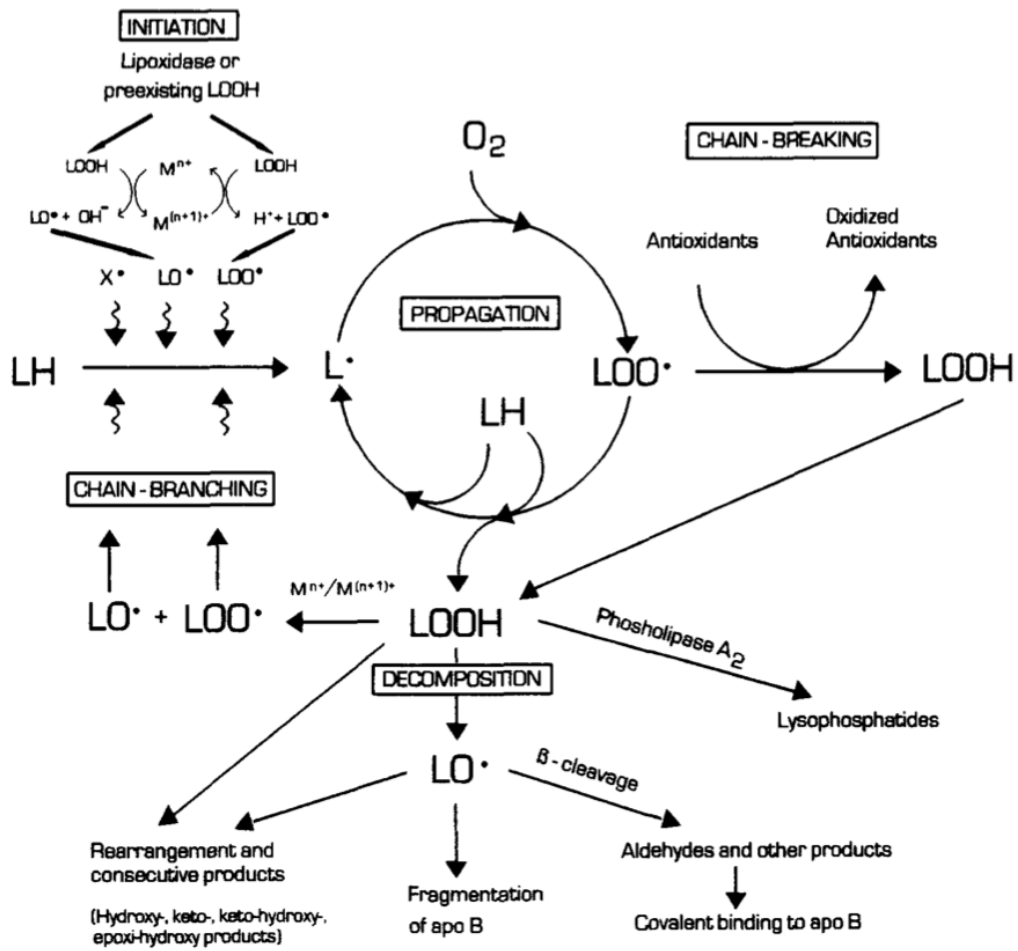


Figure I.2.20. Réaction d'oxydation des LDLs par le sulfate de cuivre.

A. Peroxydation lipidique d'un acide gras. La peroxydation lipidique est initiée par exemple par un radical hydroxyle en extrayant un hydrogène du groupe méthylène adjacent à une double liaison d'acides gras. L'incubation avec le CuSO_4 engendre notamment une production de radicaux lipidiques, premiers produits détectables de l'oxydation des lipides des LDLs, suivie d'un réarrangement des doubles liaisons en diènes conjugués qui s'oxydent en radicaux peroxy. Ces derniers peuvent à leur tour extraire un hydrogène d'un autre acide gras insaturé pour se transformer en hydroperoxyde lipidique. Seul le segment de l'acide gras contenant la double liaison est illustré dans la figure (Jairam et al., 2012).

B. Etapes principales de l'oxydation des LDLs. LH, représentant un lipide contenant un PUFA, est attaqué par X^* (radical réactif pouvant extraire un atome d'H du LH), LO^* (radical alkoxy lipidique) ou LOO^* (radical peroxy lipidique), transformant ainsi LH en L^* , un radical lipidique (dont le radical est centré sur le carbone) (ex. : $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-^*\text{CH}$). L^* s'associe alors avec de l' O_2 et forme un LOO^* (phase de propagation), qui en présence d'antioxydant est réduit et permet la formation d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH).

Ces derniers formés, se décomposent ensuite en LO^* , qui eux-mêmes, induisent la formation d'aldéhydes se liant de manière covalente aux lysines secondaires de l'APOB, la fragmentation de l'APOB, et leur réarrangement en produits lipidiques oxydés contenant des groupes de type hydroxyle, cétone, céto-hydroxyle, époxi-hydroxyle. (Esterbauer et al., 1992)

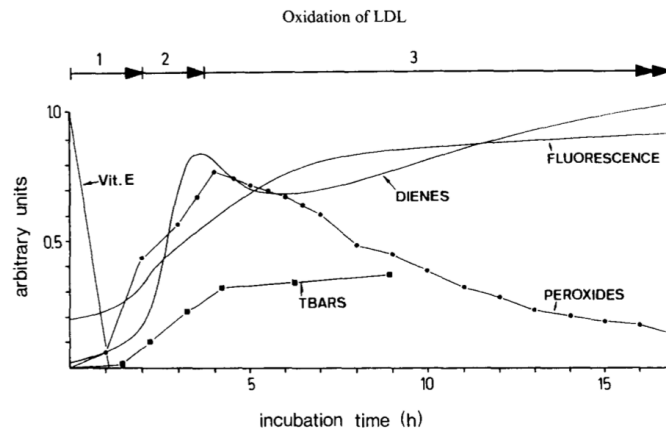


Figure I.2.21. Cinétique de la réaction d'oxydation des LDLs par le sulfate de cuivre.

La cinétique de la réaction d'oxydation des LDLs par le sulfate de cuivre est suivie en mesurant non seulement la consommation de vitamine E, mais aussi l'augmentation de la fluorescence émise à 430 nm et de la production de TBARS, de diènes conjugués et de (hydro-)peroxydes lipidiques.

(Esterbauer et al., 1992)

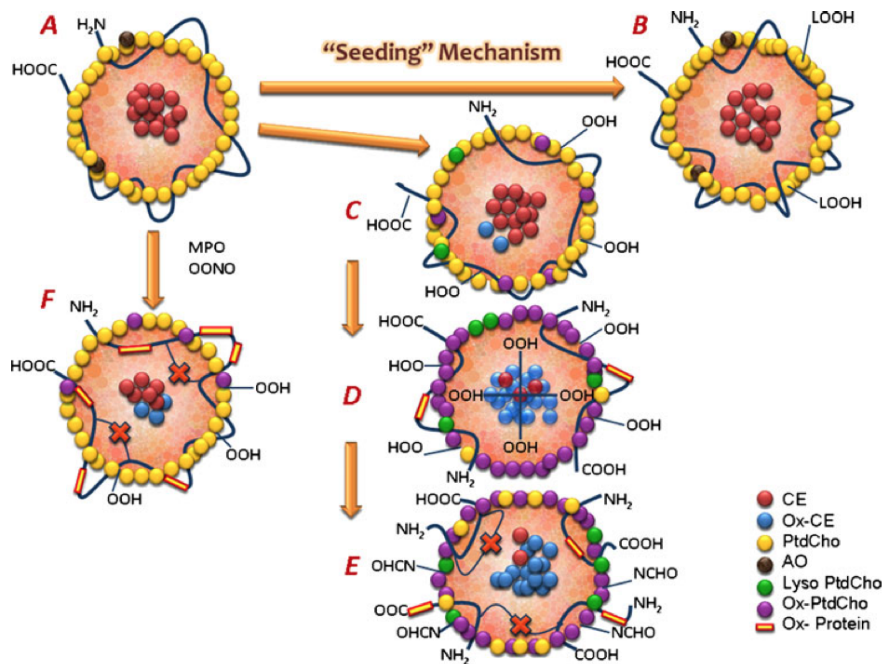


Figure I.2.22. Différentes formes de LDLs oxydées.

A. Forme non-oxydée de LDL (LDL native)

H₂N représente les groupements aminés des résidus lysine, non modifiés, de l'apolipoprotéine B et HOOC représente les lipides non modifiés.

B. Des peroxydes lipidiques interagissent avec la LDL native.

C. mmLDL (« minimally-modified LDLs ») : modification de la partie lipidique seulement, avec apparition de peroxydes de phospholipides et d'esters de cholestérol oxydés

D. LDL dite « oxydée totalement »: LDL riche en peroxydes lipidiques et ayant subi de fortes modifications au niveau de la partie protéique (APOB),.

E. Ox-LDL (CuSO₄): LDL ayant subi une décomposition de la partie lipidique avec production de peroxydes lipidiques et produits de décomposition, eux-mêmes ayant induit des modifications importantes au niveau de la partie protéique.

F. Mox-LDL : l'oxydation avec la myéloperoxydase induit d'abord de fortes modifications de la partie protéique APOB100, avec peu de peroxydation lipidique. (Jiang et al., 2011)

hydroperoxydes lipidiques). La troisième phase se caractérise par la stabilisation de la production de diènes conjugués, mais une diminution de la production des peroxydes (Figs. I.2.20 et I.2.21) (Esterbauer et al., 1992; Heinecke, 1997; Jairam et al., 2012; Zarev et al., 2003). Cependant si l'oxydation se poursuit, il s'ensuit un clivage des chaînes acyl en position sn-2 des phospholipides, accompagné d'une production de dérivés aldéhydes et carboxyliques (ex. : hydroxynonéal, HNE et malondialdéhyde, MDA). Ces dérivés peuvent alors réagir avec la partie protéique, c'est-à-dire l'APOB100, via leur liaison aux groupements thiols et amines libres de l'APOB100 (Esterbauer et al., 1992; Ziouzenkova et al., 1998). C'est la **phase de décomposition**.

En plus d'être évaluée via la production d'hydroperoxydes lipidiques, d'aldéhydes et de diènes conjugués, l'oxydation des LDLs est généralement caractérisée biochimiquement en déterminant au cours du temps la disparition des antioxydants ou des PUFA, la production des TBARS (« thiobarbituric acid reactive substances ») (ex. : MDA), mais aussi de la fluorescence émise à 430 nm. Cette fluorescence est liée à la formation de chromolipides fluorescents par réaction de divers phospholipides avec le 4-hydroxynonéal. L'oxydation des LDLs se traduit également par la fragmentation de l'APOB et par une augmentation de la mobilité électrophorétique de la lipoprotéine. La mesure de l'un de ces paramètres permet donc de vérifier l'état d'oxydation des LDLs (Fig. I.2.21) (Esterbauer et al., 1992; Parthasarathy et al., 1990).

Lorsque les LDLs sont uniquement altérées au niveau de la partie lipidique, il s'agit de mmLDLs (« minimally-modified LDLs »), toujours reconnues par le LDL-R et aux propriétés biochimiques différentes des Ox-LDLs (Berliner et al., 1990). Quand l'oxydation se poursuit, les produits de la peroxydation lipidique affectent alors la partie protéique en l'oxydant à son tour (Fig. I.2.22 A-C-D-E) (Boudjeltia et al., 2006). L'APOB100 une fois modifiée n'est plus reconnue par le LDL-R, mais bien par les récepteurs « scavenger », permettant la formation de cellules spumeuses (Esterbauer et al., 1992).

Ce processus d'oxydation a été justifié en raison de la détection d'ions Cu^{2+} , en faible concentration, au niveau de la paroi artérielle et au sein de lésions athéroscléreuseuses (Dubick et al., 1987; Smith and Reed, 1992). Toutefois, la concentration en sulfate de cuivre utilisée *in vitro* est comprise entre 10 à 100 μM , ce qui est de loin supérieur à celle observée *in vivo* (de l'ordre de 0,03 μM) (Ziouzenkova et al., 1998) et pose la question de la pertinence physiologique de ce mode d'oxydation.

Plusieurs systèmes oxydatifs, pouvant cibler les LDLs, existent néanmoins dans l'organisme : les NAD(P)H oxydases (source majeure de $\text{O}_2^{\cdot-}$), les xanthine oxydases (source d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2), les lipooxygénases, la eNOS découplée (avec diminution de la production de NO et augmentation de la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$), la respiration mitochondriale et la myéloperoxydase (MPO) (Lau and Baldus, 2006; Pepine, 2001; Yoshida and Kisugi, 2010).

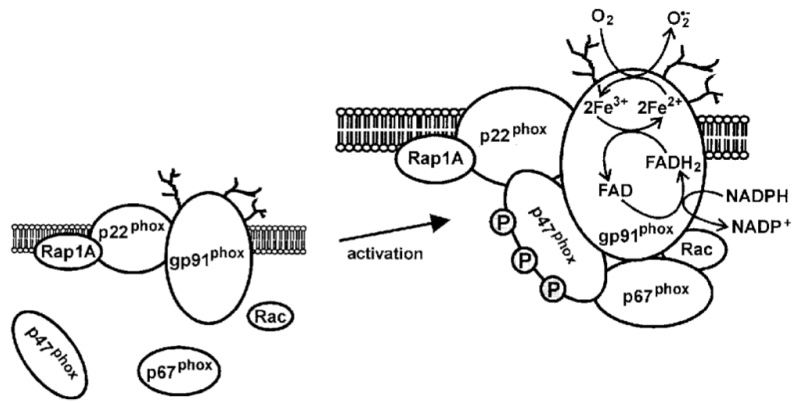


Figure I.2.23. NADPH oxydase.

p22^{phox} (phox : « phagocytic oxidase ») et gp91^{phox} sont deux protéines membranaires, formant le cytochrome b₅₅₈ en liant ensemble les composants de la chaîne de transport d'électrons (flavine et hème) (Dinauer et al., 1987; Rueckschloss et al., 2003). Les sous-unités p47^{phox} et p67^{phox} sont, quant à elles, localisées dans le cytosol. Après stimulation, la PKC (« protéine kinase C ») phosphoryle p47^{phox} et associée en complexe avec p67^{phox}, elle se lie au cytochrome b₅₅₈, permettant ainsi la formation d'O₂⁻ (Clark et al., 1989). De petites protéines G, RAC et RAP, sont également impliquées, ainsi que p40^{phox}, détectée dans le cytosol et impliquée dans la diminution de production d'O₂⁻ via sa liaison à la NADPH oxydase (Sathyamoorthy et al., 1997). (Rueckschloss et al., 2003)

2.1.4.2 Modifications par des systèmes enzymatiques

2.1.4.2.1 Les NAD(P)H oxydases

Il existe sept isoformes de NAD(P)H oxydase, appelées NOX. La plus étudiée est la NOX-2 (ou gp91^{phox}), exprimée en particulier dans les granulocytes et décrite surtout pour son action antimicrobienne via son activation dans les granulocytes. La NOX-2, latente dans un granulocyte au repos, est constituée de plusieurs sous-unités, lui permettant d'être intégrée dans la membrane plasmique où elle devient active (Fig. I.2.23) (Clark et al., 1989; Dinauer et al., 1987; Rueckschloss et al., 2003; Sathyamoorthy et al., 1997).

En cas de phagocytose de microorganismes pathogènes, la NOX-2 est associée à la membrane des phagolysosomes (Segal and Jones, 1980).

Dans les granulocytes, la NOX-2 est activée quand il y a phagocytose par exemple d'une bactérie ou en présence de certains agonistes solubles, tels que le PMA (« phorbol 12-myristate 13-acetate ») ou le fMLP (« formyl-met-leu-phe »), et permet une production importante d'O₂⁻, phénomène appelé « oxidative burst » ou explosion oxydative (Hohler et al., 2000).

Cependant, en plus de sa présence dans les granulocytes, macrophages et cellules musculaires lisses, la NOX-2 est également exprimée dans les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales expriment quatre isoformes de NOX et sont donc également capables de produire des ions O₂⁻ (Bedard and Krause, 2007; Mohazzab et al., 1994). Le taux d'O₂⁻ produit est néanmoins plus faible que celui produit dans les granulocytes en raison d'une activité plus basse de NOX-2 (Hohler et al., 2000).

Etant donné que l'O₂⁻ a un temps de demi-vie court, il est dismuté, soit spontanément, soit via les superoxyde dismutases, en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En s'associant avec du NO· (anion d'oxyde nitrique), l'O₂⁻ peut également être transformé en peroxynitrite (ONOO⁻), réduisant la biodisponibilité du NO, conduisant au dysfonctionnement endothélial (Fig. I.2.24) (Drummond and Sobey, 2014; Li and Shah, 2004; Muller and Morawietz, 2009; Rueckschloss et al., 2003).

L'O₂⁻, produit en excès à partir de la NADPH oxydase endothéliale, joue différents rôles majeurs dans le processus de développement de l'athérosclérose. En effet, il est impliqué à la fois dans l'attachement des monocytes aux cellules endothéliales, l'agrégation des plaquettes, la prolifération des cellules musculaires lisses, la localisation nucléaire de NFκB mais aussi dans l'oxydation des LDLs dans les macrophages (Fig. I.2.24) (Anderson et al., 1994; Aviram et al., 1996; Chatterjee, 1998; Drummond and Sobey, 2014; Salvemini et al., 1991; Weber et al., 1994).

Le rôle de NOX-2 dans l'athérogenèse a été confirmé par l'équipe de Runge, qui a travaillé avec des souris *ApoE*^{-/-} x *p47phox*^{-/-}, *p47phox* étant une sous-unité de NOX-2. En effet, ces souris DKO étaient protégées contre le développement de l'athérosclérose au niveau de la crosse aortique et le long de l'aorte descendante, en comparaison avec les souris *ApoE*^{-/-} (Barry-Lane et al., 2001).

L'équipe de Drummond a également montré que les souris *ApoE*^{-/-} x *Nox-2*^{-/-} sont protégées du dysfonctionnement endothélial et du développement de lésions au niveau de l'aorte, en comparaison avec les souris *ApoE*^{-/-} (Judkins et al., 2010).

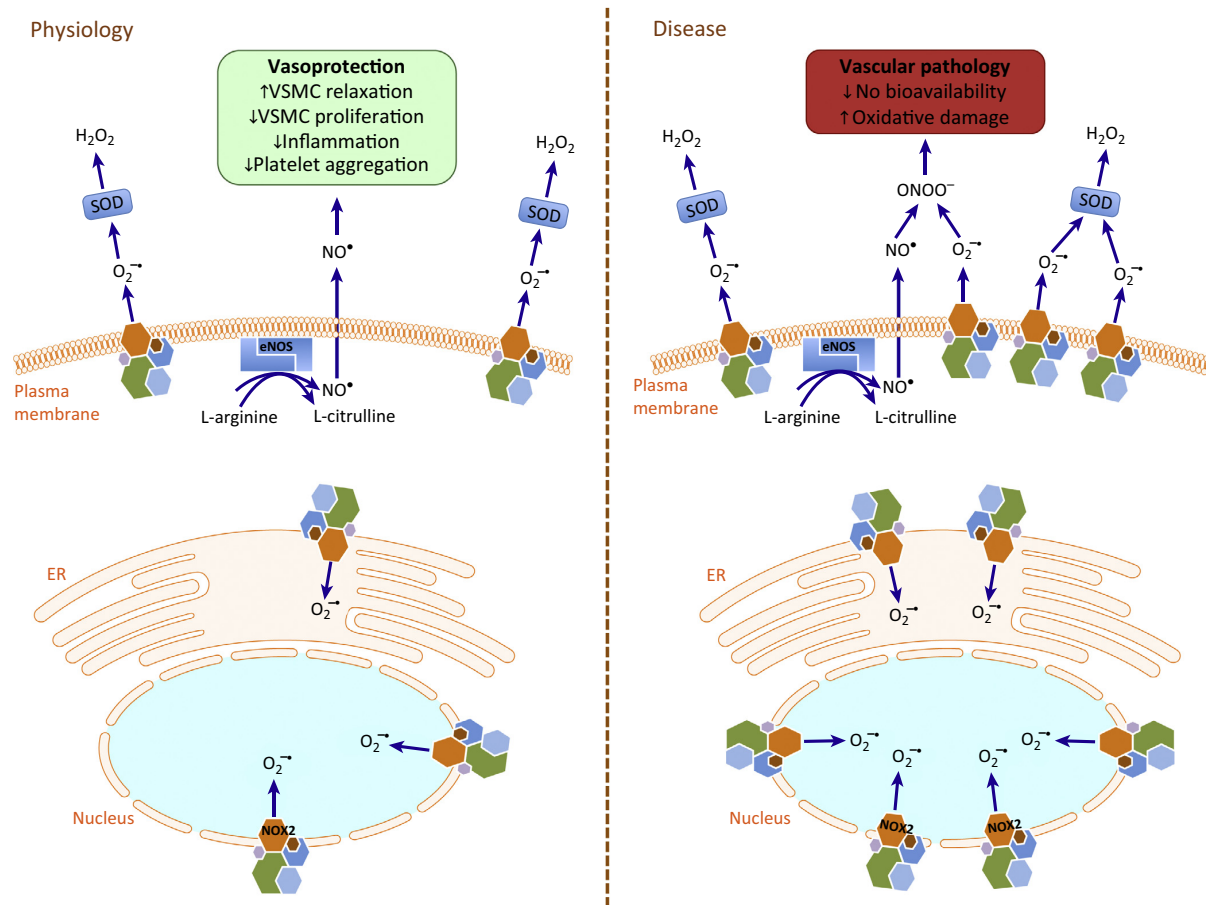


Figure I.2.24. Production d'anion superoxyde par NOX-2 dans la cellule endothéliale, en conditions normale et pathologique.

En conditions basales, la NADPH oxydase-2 est principalement exprimée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et du noyau. La majorité de la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) a lieu dans ces organites. NOX-2 est également exprimée au sein de « lipid rafts » ou radeaux lipidiques de la membrane plasmique, bien que plus faiblement. La production d' $O_2^{\cdot -}$ est donc plus faible et l' $O_2^{\cdot -}$ est rapidement métabolisé par la SOD en H_2O_2 , empêchant ainsi la réaction de l' $O_2^{\cdot -}$ avec le NO^* .

En conditions pathologiques, des stimuli athérogènes tels que le cholestérol ou le $TNF\alpha$ induisent une augmentation de l'expression de NOX-2 (et NOX-1) en membrane plasmique, augmentant ainsi la production d' $O_2^{\cdot -}$. L' $O_2^{\cdot -}$ réagit avec le NO^* et forme du peroxynitrite ($ONOO^-$), réduisant la disponibilité du NO et causant des dommages oxydatifs à diverses macromolécules telles que des protéines, des lipides et l'ADN. (Drummond et al., 2014)

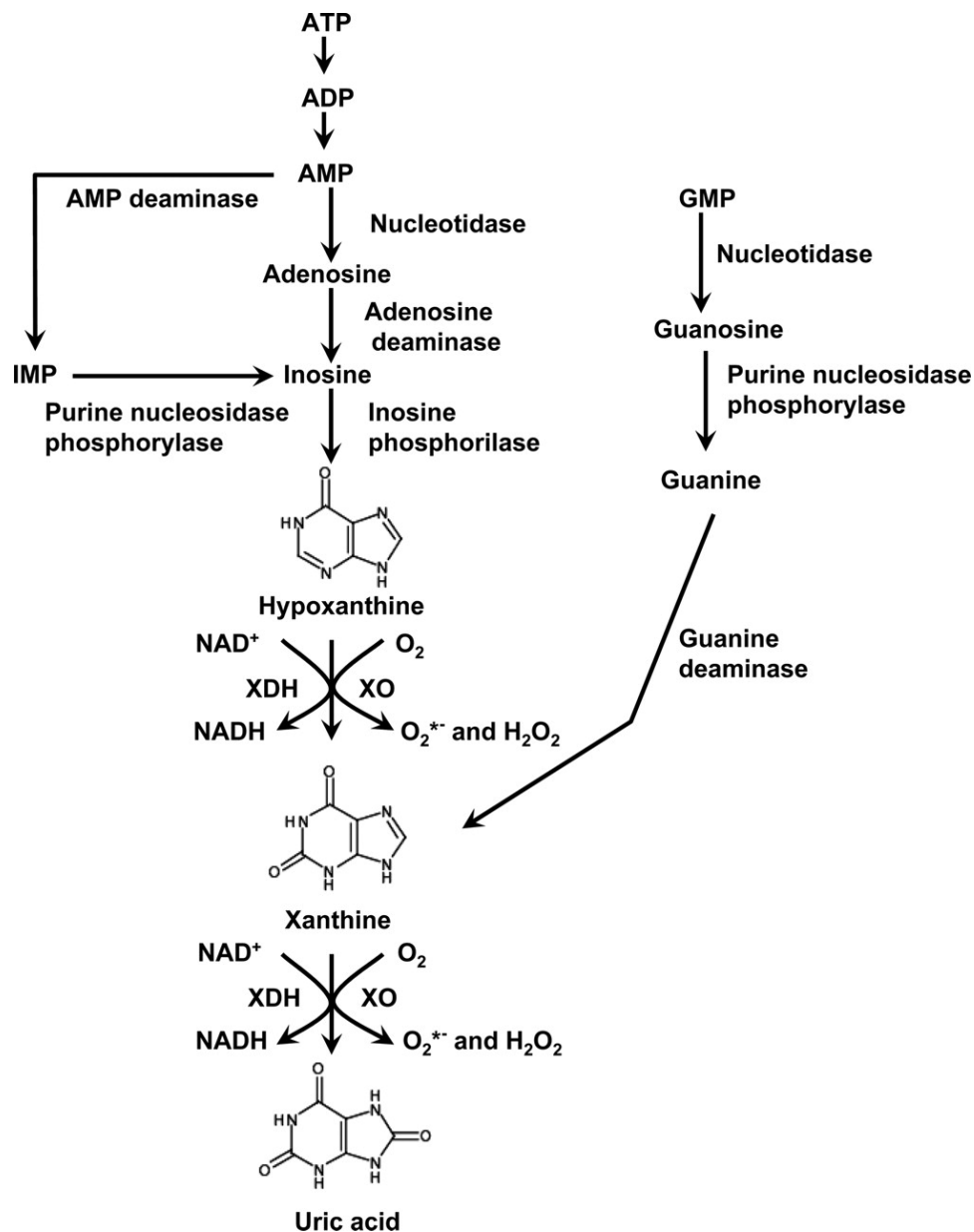


Figure I.2.25. Voie de dégradation de la purine.

L'acide urique est produit, via la xanthine oxydase, à partir de xanthine. Cette dernière est formée à partir de l'ATP, qui, sous l'action de différentes enzymes dont la nucléotidase, l'adénosine déaminase et l'inosine phosphorylase, est converti en hypoxanthine puis en xanthine.

La xanthine peut également être produite à partir de GMP grâce à l'action des enzymes nucléotidase, purine nucléosidase phosphorylase et guanine déaminase.

(Pacher, 2006)

2.1.4.2.2 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) (Fig. I.2.25) est une métallo-enzyme appartenant à la famille des molybdoenzymes, qui inclut notamment l'aldéhyde oxydase et la sulfite oxydase (Kisker et al., 1997). Elle est présente sous forme homodimérique, avec chaque sous-unité constituée d'une chaîne peptidique liant un cofacteur molybdoptérine (Mo-pt), 2 centres Fe-S identiques et un cofacteur FAD (« flavin adénine dinucléotide ») (Hille and Nishino, 1995; Pacher et al., 2006).

Elle est généralement désignée par le terme « xanthine oxydo-réductase » (XOR) car la xanthine réductase (XDH) et la XO sont encodées par le même gène (Nishino et al., 2008). La xanthine oxydo-réductase existe tout d'abord sous sa forme réduite XDH, mais est rapidement convertie sous sa forme oxydée XO, soit par protéolyse, de façon irréversible, soit de façon réversible via l'oxydation de résidus cystéine permettant la formation de ponts disulfures (Nishino et al., 2008).

Son rôle principal réside dans le catabolisme des purines via l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, puis de la xanthine en acide urique (Hille and Nishino, 1995; Parks and Granger, 1986). Cette réaction d'oxydation via la XO permet à la fois la production de 2 molécules d' H_2O_2 et de 2 molécules d' O_2^- (Hille and Massey, 1981). La production d' O_2^- par la XDH est cependant limitée puisque la NAD^+ représente l'accepteur d'électrons privilégié de la XDH (Sanders et al., 1997). L' O_2^- produit par la XO ou dans une moindre mesure par la XDH, est capable de s'associer ensuite avec le NO généré par les NOS ou « nitric oxide synthases », permettant alors la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$) (Godber et al., 2000).

Comme les NADPH oxydases, la xanthine oxydase contribue également à une augmentation de la production de ROS, l'impliquant dans la défense de l'hôte contre les microorganismes mais aussi dans le développement de maladies cardiovasculaires.

L' O_2^- , produit par la XO, induit notamment un dysfonctionnement endothélial chez des patients hypercholestérolémiques (Cardillo et al., 1997; Harrison, 2004; Ohara et al., 1993). Cette observation peut être corrélée avec les résultats d'Ohara en 1993 montrant un taux jusqu'à 3 fois plus élevé d' O_2^- , produit via la xanthine oxydase, au niveau de vaisseaux sanguins malades par rapport à des vaisseaux sains chez des lapins nourris avec un régime riche en cholestérol (Ohara et al., 1993).

De plus, Patetsios et al., en 2001, ont observé une co-localisation de cholestérol avec la XOR au sein de plaques athéroscléreuses carotidiennes. Ils ont également montré que la concentration en acide urique dans ces plaques est 5 à 6 fois plus importante, suggérant une augmentation de l'activité de XOR dans les lésions athéroscléreuses (Patetsios et al., 2001).

Enfin, il semblerait que des mmLDLs obtenues par incubation avec de la XO soient capables d'induire en culture l'apoptose de cellules endothéliales et cellules musculaires lisses via une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique BAD et une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Napoli et al., 2000).

2.1.4.2.3 Les lipoxygénases

Les lipoxygénases (LOX) appartiennent à la famille des enzymes peroxydant les lipides, en catalysant l'oxygénation stéréosélective et régiosélective d'acides gras polyinsaturés

Human gene	Former name	Mouse gene	Former name	Major expression
ALOX15	12/15-LOX	alox15	Lc12-LOX ^a	Eosinophils, bronchial epithelium
ALOX15B	15-LOX2	alox15b	8-LOX	Hair roots, skin, prostate
ALOX12	pl12-LOX ^b	alox12	pl12-LOX	Thrombocytes, skin
ALOX12B	12R-LOX	alox12b	12R-LOX	Skin
ALOXE3	eLOX3	aloxe3	eLOX3	Skin
ALOX5	5-LOX	alox5	alox5	Leukocytes, macrophages, dendritic cells
Pseudogene		alox12e	elox12	Skin

^a lc – leukocyte-type.

^b pl – platelet-type.

Tableau I.2.4. Gènes ALOX humains et murins et les cellules/tissus où ils sont principalement exprimés.
(Kuhn et al., 2015)

Genes	Atherosclerosis/heart disease	Immune response	Neurological disorder	Cancer	Skin disease	Others
<i>ALOX15</i>	A near null mutant (T560M) in coronary artery disease [140]			Rectal cancer [100] Colon cancer [141] Adenoma recurrence [142] Breast cancer [39] Prostate cancer [12]		Bone mineral density↓[56,143–144]
<i>ALOX15B</i>	↑ in carotid plaque with thrombosis [43] ↑ in carotid lesion [32] Variants in coronary artery disease [145]			Esophageal cancer [35] Adrenocortical tumor [36] Breast cancer [39] Epithelial tumors [37] Prostate cancer cells [38] Head and neck carcinoma [40] ↑ in TAMs isolated from renal cell carcinoma [42]		
<i>ALOX12</i>	Variants in subclinical atherosclerosis [146]	Variants in Toxoplasmosis [147]	Bipolar disorder [49] Schizophrenia [50]	Methylation in AML[61] Esophageal squamous cell carcinoma [64] Rectal cancer [100] Adenoma recurrence [142] Colorectal cancer [148] E261R mutation Breast cancer [48] Colon cancer [47] Colorectal cancer [65] Colorectal adenoma [149]		Bone mineral density↓[54–57,150] Fat mass↑[53]
<i>ALOX12B</i>					ARCI [81–82, 94,151] NCIE [84–86]	
<i>ALOXE3</i>					ARCI [82, 94,151] NCIE [84,86]	
<i>ALOX5</i>	Variants in atherosclerosis [152] ↑ in atherosclerosis [153] Variants in subclinical atherosclerosis [146]	Variants in asthma [97,154,155] Variants in AHR [98,99]		Inverse correlation Rectal cancer [100] Ovarian cancer [101] Colon cancer [47]		
<i>ALOX5AP</i>	Variants in subclinical atherosclerosis [146]	Variants in asthma [126,156]		Rectal cancer [100] Adenoma [100]		

Tableau I.2.5. Lien entre les gènes ALOX et les maladies, dont les maladies cardiovasculaires chez l'homme.
(Mashima and Okuyama, 2015)

possédant un motif (1Z, 4Z)-penta-1,4-dinéoïque en dérivés hydroperoxydes (Brash, 1999; Kuhn et al., 2005; Kuhn and Thiele, 1999).

Chez les mammifères, la nomenclature la plus utilisée est celle des gènes codant pour ces enzymes: ALOX5 (5-LOX), ALOX15 (12/15-LOX), ALOX15B (15-LOX2), ALOX12, (p12-LOX), ALOX12B (12R-LOX) et ALOXE3 (eLOX3) (Tableau I.2.4) (Kuhn et al., 2015; Mashima and Okuyama, 2015).

Au sein de cette famille, trois isoformes de LOX semblent jouer un rôle dans l'athérogenèse. ALOX5 et ALOX15B sont en effet fortement exprimées au sein des lésions athéroscléreuses avancées humaines, au contraire d'ALOX15 qui est, quant à elle, exprimée dans les lésions précoces humaines (Tableau I.2.5) (Kuhn et al., 2015; Yla-Herttuala et al., 1991).

ALOX15(B) et ALOX12(B) sont capables d'oxyder des acides gras libres, de l'acide arachidonique et de l'acide linoléique. De plus, contrairement aux autres LOX, elles sont capables d'oxyder l'acide arachidonique et l'acide linoléique se trouvant dans des systèmes lipides-protéines tels que les phospholipides intégrés dans les membranes ou les esters de cholestérol présents dans les lipoprotéines (Wittwer and Hersberger, 2007). En effet, chez l'homme, ces enzymes oxydent l'acide arachidonique au niveau du C₁₂ et C₁₅, induisant la formation d'acides 12- et 15-hydro(per)oxy-éicosatétraénoïques (12- et 15-HpETE). Ces produits sont ensuite réduits en dérivés hydroxyles, 12-HETE et 15-HETE, par les peroxydases cellulaires (Kuhn et al., 1993). De plus, elles sont capables d'oxyder l'acide linoléique aux mêmes positions (C₁₂ et C₁₅), permettant la formation d'acide 13-hydro(per)oxy-octadécadiénoïque (13-HpODE), qui sera réduit en 13-HODE (Kuhn et al., 1993).

Elles participent ainsi à certaines modifications lipidiques dans les LDLs.

Il existe différentes données expérimentales suggérant l'implication d'ALOX15 (12/15-LOX) dans l'oxydation des LDLs et la formation subséquente de cellules spumeuses. Zhu et al., en 2003, ont notamment montré, avec des macrophages péritonéaux incubés avec des LDLs, qu'ALOX15 est capable d'être transloqué du cytoplasme vers la membrane où elle oxyde les LDLs (Zhu et al., 2003). Ainsi il semblerait que l'oxydation des LDLs dépende de la liaison de la LDL avec le récepteur LRP (« LDL-related protein ») : après liaison, la LRP permet la translocation des esters de cholestérol des LDLs vers la membrane, sans qu'il n'y ait par la suite endocytose ou dégradation de la LDL. Cette liaison induit une translocation d'ALOX15 du cytosol vers la membrane plasmique (Kuhn et al., 2015; Swarnakar et al., 2001; Zhu et al., 2003).

In vivo, Yla-Herttuala a montré en 1995 qu'une surexpression d'ALOX15 (15-LOX) humaine médiée par un rétrovirus induit une accumulation d'Ox-LDLs au niveau d'artères de lapins transduites, comparées à des artères de lapins « contrôle », lorsque les lapins sont nourris avec un régime riche en cholestérol (Yla-Herttuala et al., 1995).

De plus, il a été démontré que les 15-HETE et 13-HODE induisent une augmentation de l'expression de CD36, récepteur « scavenger », via l'activation du facteur de transcription PPAR γ (Delerive et al., 2000; Huang et al., 1999). Cependant, 13-HODE est également capable d'induire une augmentation de l'expression d'ABCA1 via l'activation de PPAR γ et ainsi d'augmenter l'efflux de cholestérol des macrophages, ce qui empêcherait la formation de cellules spumeuses (Hersberger and von Eckardstein, 2003).

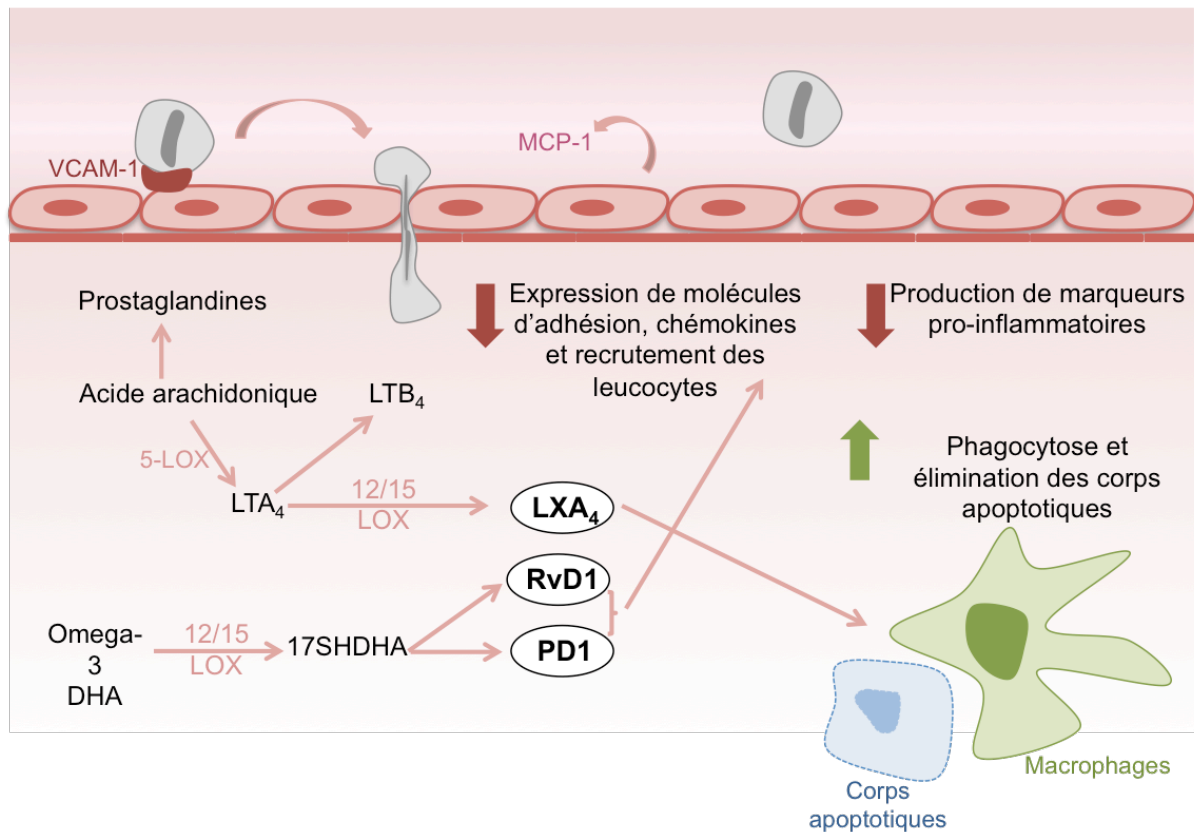


Figure I.2.26. Rôle des médiateurs lipidiques dans l'athérosclérose.

Sous l'action de la phospholipase A2 cytosolique, l'acide arachidonique est formé à partir des phospholipides dans la cellule. Il est ensuite transformé en prostaglandines et en leucotriènes (LT) après plusieurs réactions enzymatiques. La leucotriène LTA₄, sous l'action d'ALOX15 (12/15-LOX), est transformée en lipoxine A₄ (LXA₄), un médiateur de résolution de l'inflammation.

L'acide docosahéxaénoïque (DHA) est lui, transformé en 17SHDHA (« 17S-hydroxydocosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoic acid ») par ALOX15, puis en résolvine D1 (RvD1) et protectine D1 (PD1), eux aussi étant des médiateurs lipidiques de la résolution.

Ces différents médiateurs promeuvent la phagocytose des cellules apoptotiques, ainsi que la diminution de l'expression des molécules d'adhérence et des chémokines induisant donc une diminution du recrutement des leucocytes. Ils induisent également une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-17 et CCL5).

Adapté de (Merched et al., 2008)

En plus de son rôle dans l'oxydation des LDLs, ALOX15 serait également impliqué dans le recrutement des monocytes via une augmentation de l'adhérence de ces cellules via la surexpression de MCP-1 (« monocyte chemoattractant protein-1 »), ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 ») et VCAM-1 (« vascular adhesion molecule-1 ») (Bolick et al., 2005; Hatley et al., 2003; Reilly et al., 2004; Viita et al., 1999), mais aussi dans la prolifération des cellules musculaires lisses via l'activation du facteur de transcription ID3, régulateur du cycle cellulaire et de la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (Natarajan et al., 1997; Taylor et al., 2005a).

Cependant, le rôle exact d'ALOX15 dans l'athérogenèse n'est pas encore totalement défini. En plus des arguments présentés ci-dessus, plusieurs études ont confirmé le rôle pro-athérogène d'ALOX15 via des expériences sur souris *Alox15*^{-/-} (Cyrus et al., 1999; George et al., 2001; Poeckel et al., 2009). Au contraire, les travaux de Shen et al., Trebus et al. et Merched et al., étudiant la surexpression d'ALOX15 dans deux modèles de lapins et un modèle murin respectivement, ont suggéré un effet anti-athérogène d'ALOX15 (Merched et al., 2008; Shen et al., 1996; Trebus et al., 2002). En effet, ALOX15, ainsi que d'autres lipoxigénases, joueraient également un rôle dans la production de médiateurs lipidiques de résolution, importants afin de limiter les dommages aux tissus et aux organes. Les travaux de Merched et al., sur des macrophages de souris *ApoE*^{-/-} croisées avec des souris transgéniques surexprimant *12/15-Lox (Alox15)*, ont montré qu'ALOX15 serait capable d'induire la production de lipoxine-A₄ (LXA₄), de résolvine D1 et de protectine D1, des médiateurs lipidiques importants dérivés des acides éicosapentaénoïque et docasahéxaénoïque. Ces médiateurs réguleraient la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et joueraient également des rôles de résolution de l'inflammation au niveau de l'endothélium vasculaire via une diminution de l'expression de *Vcam-1* et *Mcp-1* par la protectine D1 et de l'expression de la *P-sélectine* par LXA₄ (Fig. I.2.26) (Merched et al., 2008).

Kuhn et al. suggèrent que le rôle controversé d'ALOX15 dans l'athérogenèse pourrait être expliqué par des différences de mécanismes moléculaires entre les différents modèles animaux utilisés (pour une revue, voir (Kuhn et al., 2015)).

2.1.4.2.4 La myéloperoxydase (MPO)

Depuis environ une dizaine d'années, les données suggérant que des concentrations élevées en MPO dans le plasma représentent un risque prédictif pour les maladies cardiovasculaires, se sont accumulées (pour une revue, voir (Nicholls and Hazen, 2005)). C'est la raison pour laquelle en collaboration avec les équipes de Karim Zouaoui Boudjeltia et Pierre Van Antwerpen (ULB), nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail à la MPO et aux LDLs oxydées en présence de MPO.

2.1.4.2.4.1 Origine et synthèse

La myéloperoxydase est une enzyme appartenant à la famille des peroxydases héminiques, présente, chez l'homme, dans les leucocytes et plus particulièrement dans les granules azurophiles des polymorphonucléaires neutrophiles. Elle représente à elle seule 5 % des protéines des neutrophiles. Elle est également détectée, en proportion moindre, notamment dans les monocytes, macrophages et cellules de Kupffer (pour une revue, voir (Bos et al., 1978; Daugherty et al., 1994; Klebanoff, 2005; Malle et al., 2007)).

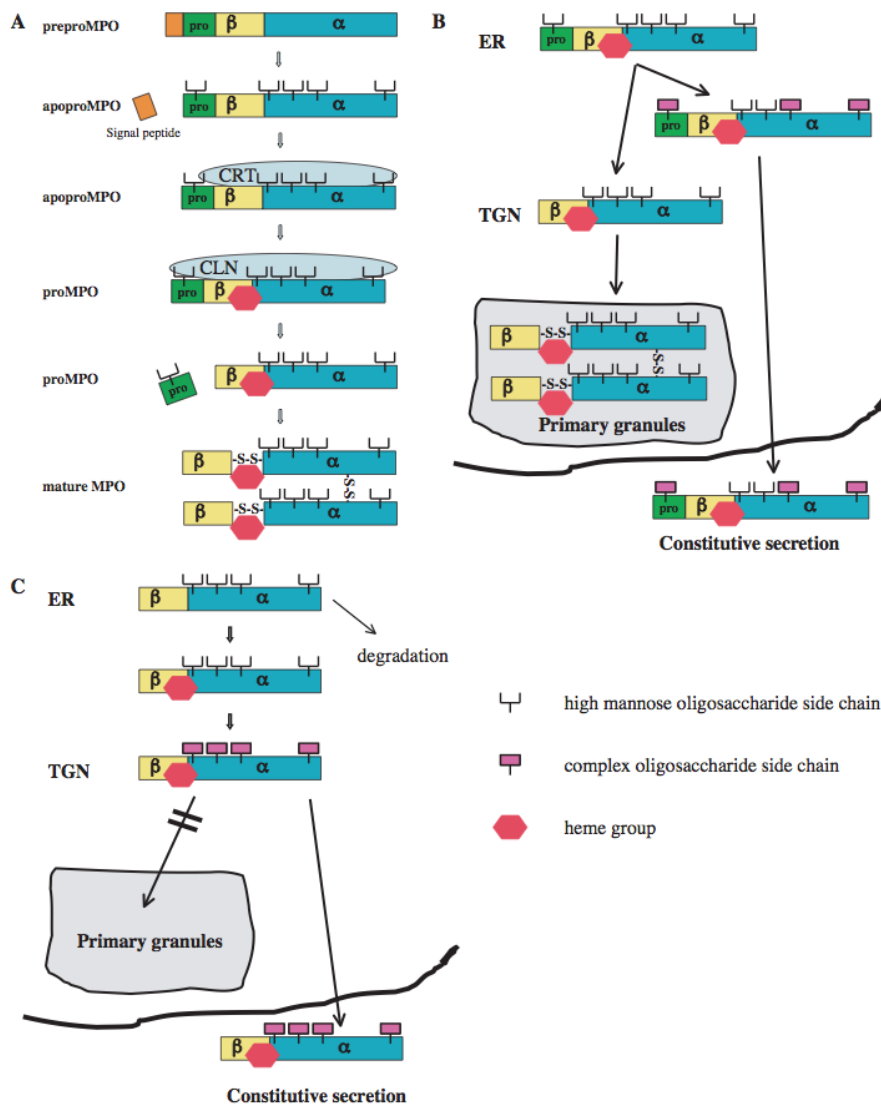


Figure I.2.27. Synthèse de la myéloperoxydase.

A. L'enzyme est, tout d'abord, produite, comme produit primaire de la traduction, sous forme d'une séquence préproMPO (80 kDa), composée d'une chaîne lourde α , d'une chaîne légère β et d'un propeptide (pro). Elle devient apoproMPO après clivage du peptide signal et incorporation d'oligosaccharides riches en mannose dans le réticulum endoplasmique (ER). Cette forme s'associe de plus avec les protéines chaperones calréticuline (CRT) et calnexine (CLN), lui permettant d'évoluer vers la forme proMPO après incorporation du groupement hème. Cette forme est enzymatiquement active. La forme proMPO devient une forme mature dimérique et symétrique, dite « MPO » (146 kDa), via différents clivages protéolytiques, permettant le détachement du propeptide et l'enlèvement d'un hexapeptide situé entre la chaîne lourde et légère, ainsi que l'homodimérisation de deux proMPO via la formation d'un pont di-sulfure.

B. La MPO peut également être formée, dans le réticulum endoplasmique (ER), en tant que monomère proMPO, contenant un groupement hème. Le propeptide de la proMPO est clivé dans les endosomes tardifs, permettant la formation d'une forme mature dimérique (MPO) dans les granules azurophiles (« primary granules »). Après modification des oligosaccharides en oligosaccharides complexes, dans l'appareil de Golgi, une fraction de la forme proMPO est constitutivement sécrétée.

C. La protéine MPO mutante, ne contenant pas de propeptide, est en partie dégradée dans le réticulum endoplasmique (ER) et en partie transportée dans l'appareil de Golgi où s'achève la N-glycosylation. La MPO mutante n'est pas ciblée vers les granules azurophiles, mais est sécrétée de manière constitutive.

(Hansson et al., 2006)

Cependant, son abondance diminue lorsque les monocytes se différencient en macrophages. Ces derniers sont en général incapables de produire l'enzyme (Locksley et al., 1987; Nakagawara et al., 1981).

La synthèse de la MPO débute au niveau de la moelle osseuse : elle est produite par les promyélocytes et les promonocytes pendant la différenciation granulocytaire. Une fois produite comme précurseur, elle subit ensuite plusieurs clivages et modifications post-traductionnelles (Fig. I.2.27) (Borregaard, 1997; Gullberg et al., 1999).

La forme préproMPO (80 kDa) est tout d'abord synthétisée comme produit primaire de la traduction, comprenant une chaîne lourde α et une chaîne légère β . Cette étape est suivie du clivage du peptide signal, d'une N-glycosylation et d'une dé-glycosylation limitée : l'enzyme est appelée « apoproMPO » (90 kDa) (Fig. I.2.27). Dans le RE, l'enzyme interagit aussi avec des chaperones et incorpore le groupement hème. Le groupement hème est capable de contenir le Fe^{3+} . Il peut subir plusieurs réactions d'oxydoréduction, permettant à l'atome de fer de passer d'un état d'oxydation à l'autre (Malle et al., 2007). Après incorporation de la molécule d'hème, l'enzyme passe dans le Golgi où le propeptide est enlevé, tandis que la forme active proMPO est clivée en 2 sous-unités qui restent liées par un pont disulfure. Toutes ces étapes mènent finalement à la synthèse d'une forme mature, homodimérique, dite MPO, après sa sortie du réseau trans-golgien (Fig. I.2.27) ((Hasilik et al., 1984; Nauseef, 1987; Olsson et al., 1984); pour une revue, voir (Hansson et al., 2006)).

Cependant, la MPO peut être également synthétisée de façon non classique. En effet, en cas d'expression du gène de la MPO dans les cellules spumeuses, celles-ci ne sont pas capables d'achever la maturation par protéolyse de la forme proMPO: la forme proMPO est alors sécrétée dans le milieu extracellulaire. De plus, il est également possible que certaines formes de proMPO échappent à la maturation dans les granulocytes et soient sécrétées en tant que monomères dans l'environnement extracellulaire ((Hansson et al., 2006), pour une revue voir (Malle et al., 2007)).

2.1.4.2.4.2 Mécanismes enzymatiques de la MPO

Le cycle catalytique de la MPO est complexe. La réaction transformant l'enzyme native en composé I est appelée « cycle d'halogénéation ». Tandis que celle qui transforme le composé I en composé II et permet finalement de revenir à son état d'enzyme native est appelée « cycle de peroxydation » (Fig. I.2.28).

L' H_2O_2 est utilisé afin de former le composé I à partir de l'enzyme native MPO-Fe(III). Cette réaction produit de l' H_2O (réaction 1). Le composé I, quant à lui, contient un radical cation ferryl π et oxyde les ions halogénures (ex.: Cl^- , I^-) ou les ions pseudohalogénures (ex.: SNC^-) ainsi que les substrats organiques et inorganiques (Fig. I.2.28) (pour une revue, voir (Malle et al., 2007)). Après cette réaction d'oxydation, l'enzyme revient à son état natif ferrique. Le composé I peut également être réduit en composé II (réaction 3), qui comporte du Fe(IV)-OH. Une fois le composé II réduit, il revient à son état ferrique (réaction 4) ou forme le composé III par réaction avec l' H_2O_2 (réaction 6) (Fig. I.2.28) (pour une revue, (Malle et al., 2007)).

Le composé III peut être également formé lorsque l'enzyme native réagit avec un anion superoxyde (réaction 9) ou lorsque la forme ferreuse MPO-Fe(II) réagit avec de l' O_2 (réaction 8).

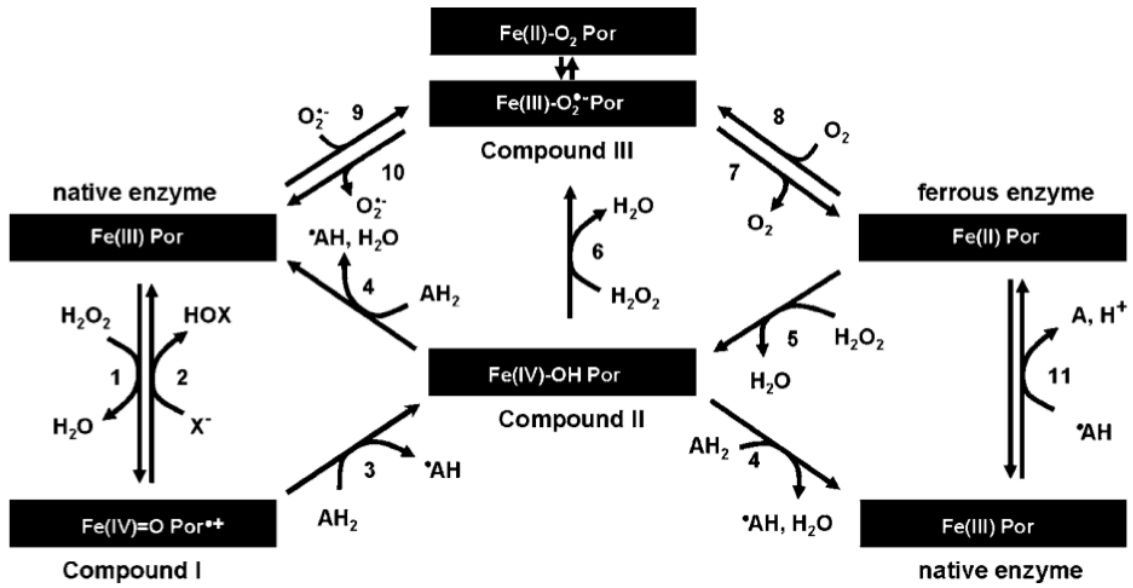


Figure I.2.28. Schéma représentant les différences réactions impliquant la MPO avec les états oxydatifs correspondants.

(Malle et al., 2007)

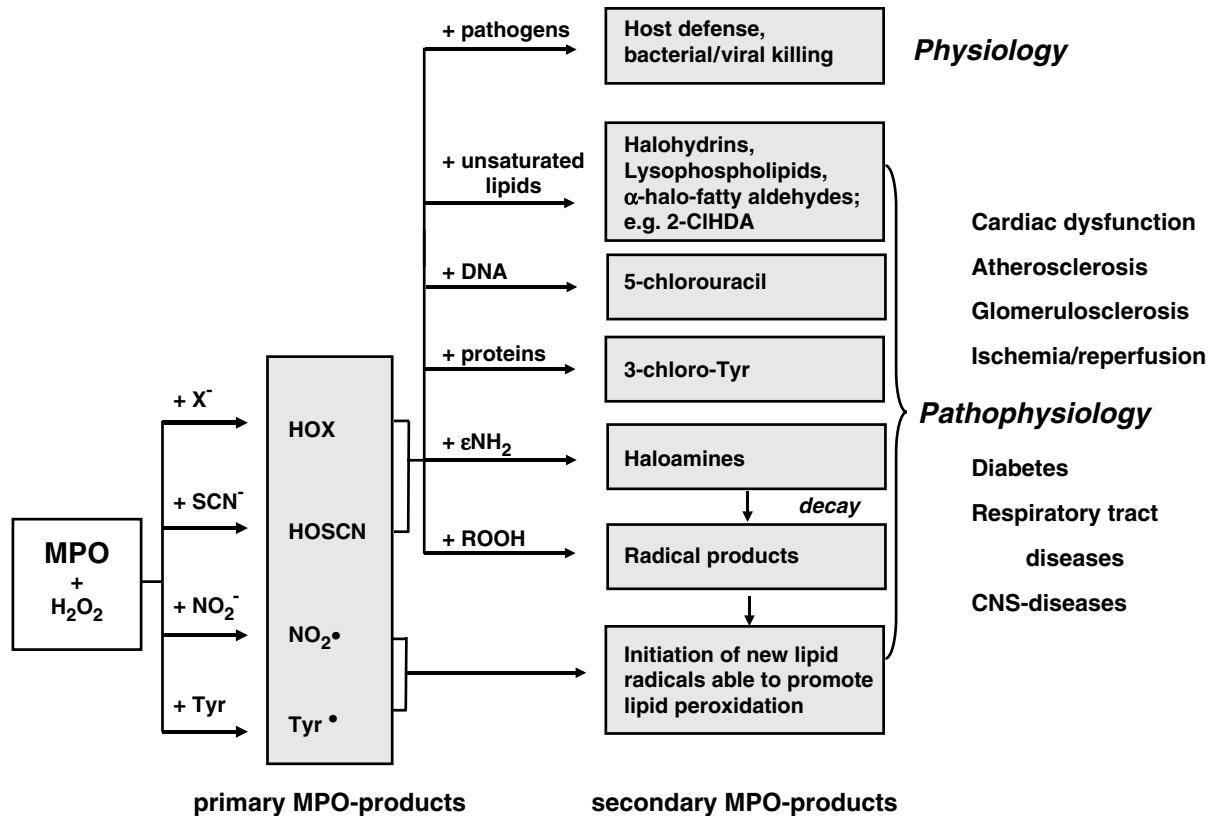


Figure I.2.29. Rôles des produits primaires et secondaires provenant de l'activité de la MPO en conditions physiologiques et pathologiques. (Malle et al., 2007)

A l'état ferreux, la MPO est susceptible d'être réduite par des intermédiaires radicalaires formés au cours du « cycle peroxydase » (réaction 11) (Fig. I.2.28) (pour une revue, voir (Malle et al., 2007)).

La MPO catalyse donc deux réactions majeures, responsables de ses activités de chloration et de peroxydation.

La réaction principale est l'oxydation des halogénures X^- (ex. : Cl^- , Br^-) (chloration) :



Cette réaction dépend des concentrations de X^- et d' H_2O_2 . Mais lorsque le pH diminue, la production d'acide hypochloreux (HOCl) augmente. A forte concentration, l' H_2O_2 inactive la MPO. Celle-ci doit donc être inférieure ou égale à 100 μM . Les composés hypohaleux (HOX, et en particulier l'acide hypochloreux/hypochlorite (HOCl/OCl, pK_a 7.53)) générés par cette réaction, sont des oxydants puissants à action microbicide au sein du phagosome.

La deuxième réaction est une réaction de peroxydation (Lau and Baldus, 2006) :



L'enzyme a une activité optimale à pH 5.5, mais elle reste active à travers une gamme étendue de pH (Deby-Dupont and Lamy, 1999).

Un autre substrat de la MPO est le NO, qui est oxydé en NO_2^- (nitrite) (Abu-Soud and Hazen, 2000; Eiserich et al., 2002). Cependant, lorsque les concentrations de tyrosine libre ou d'ascorbate sont 1000 fois plus élevées que celle de NO, cas fréquent en conditions physiologiques, il y a compétition. La tyrosine ou l'ascorbate seront oxydés, par les composés I et II, en radicaux tyrosyl ou ascorbyl, respectivement. Ces radicaux peuvent alors oxyder à leur tour, le NO en NO_2^- , dont les concentrations peuvent atteindre 200 μM en cas de maladies inflammatoires (en conditions normales : 1 à 5 μM) (Lau and Baldus, 2006; Torre et al., 1996; van der Vliet et al., 1997).

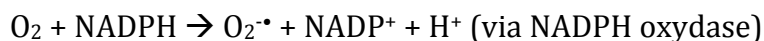
En présence d' H_2O_2 et de MPO, le NO_2^- est oxydé en $NO_2 \cdot$, espèce radicalaire instable et réactive, qui peut initier des réactions de peroxydation lipidique (Lau and Baldus, 2006; Malle et al., 2007).

2.1.4.2.4.3 Rôles physiologiques de la MPO

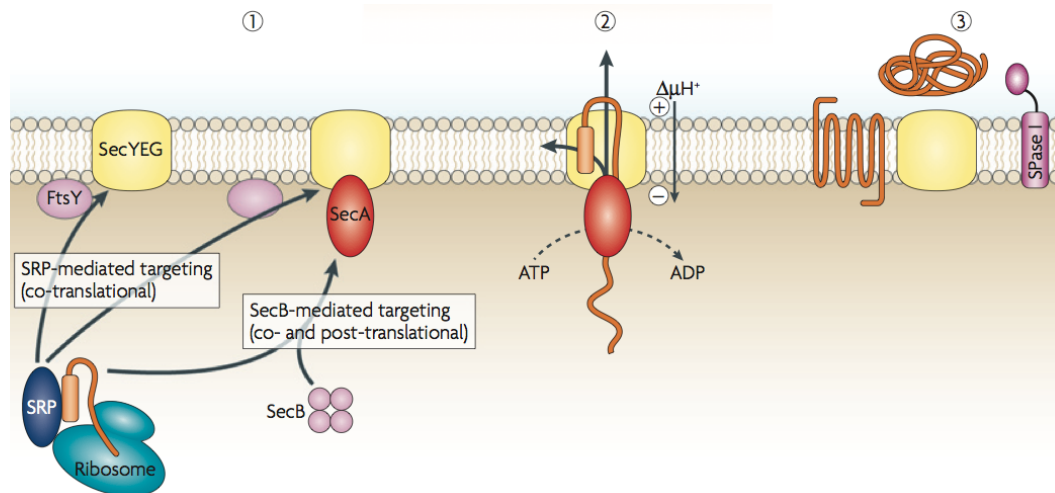
De par la production d'ions halogénures et de radicaux oxydants, la MPO est impliquée dans la défense de l'hôte en raison de son activité bactéricide (Fig. I.2.29).

En effet, lors de la phagocytose de bactéries par les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), elles sont exposées à différents systèmes antimicrobiens, incluant l' H_2O_2 , les ions halogénures, et la MPO en particulier (Klebanoff, 2005; Nauseef, 2007).

L' O_2 est utilisé pour la production des molécules microbicides, $O_2 \cdot^-$ et l' H_2O_2 dans une réaction nommée « respiratory burst » ou explosion oxydative.



A.



B.

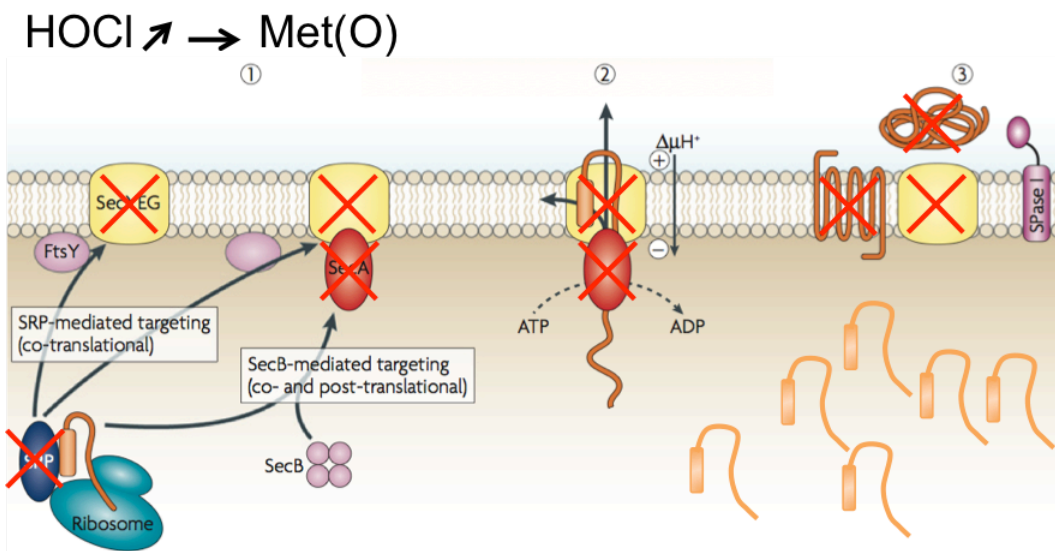


Figure I.2.30. Représentation schématique du processus de sécrétion des protéines par le système de translocation d'une bactérie Gram et de son altération par l'HOCl.

A. (1) Une fois synthétisée par le ribosome, la pré-protéine qui doit être sécrétée (ligne orange), est synthétisée avec son peptide signal hydrophobe (rectangle orange) et envoyée, vers le complexe de translocation SecYEG, soit via la chaperone SecB soit via SRP (« signal recognition particle) lié au ribosome. SRP est utilisé dès que la protéine se dissocie du tunnel de sortie du ribosome (cas des protéines membranaires ou des protéines avec un peptide « signal » très hydrophobe). SecB, une chaperone tétramérique, intervient une fois que la traduction est pratiquement terminée (cas des protéines sécrétoires).

FtsY et SecA agissent, respectivement, comme récepteurs pour SRP et pour SecB. En effet, soit FtsY interagit avec SRP et la pré-protéine, soit SecB interagit avec la pré-protéine et se lie à SecA, une ATPase. (2) Celle-ci permet la translocation ATP-dépendante de la pré-protéine à travers le translocon SecYEG. (3) Le peptide signal est ensuite enlevé par la SPase1 (« signal peptidase-1 ») et la protéine se replie du côté trans de la membrane ou bien s'intègre dans la bicouche lipidique.

B. Les protéines formant le translocon contiennent de la méthionine (ou tout autre acide aminé vulnérable). Dans le cas d'une action bactéricide de la MPO, l'HOCl, produit à des concentrations élevées, oxyde la méthionine en Met(O). Cette oxydation semble inactiver plusieurs protéines impliquées dans la translocation des protéines sécrétées et membranaires, ce qui contribue à la diminution drastique de la viabilité des bactéries.

Adapté de (Papanikou et al., 2007)



L'oxygène moléculaire subit une réduction univalente via un électron cédé par le NADPH. Celui-ci est régénéré par le cycle des pentoses phosphates.

Cependant, l' H_2O_2 et l' O_2^{\bullet} à eux seuls ne sont pas suffisants dans la protection de l'hôte contre l'infection bactérienne, puisque le premier n'est pas un bactéricide puissant et le deuxième a été décrit comme étant inoffensif pour la bactérie. Ils sont donc utilisés afin de former des oxydants plus efficaces tels que les acides hypohaleux (ex. : HOCl) ou des radicaux oxydants plus toxiques (Chapman et al., 2002; Rosen et al., 2009). Ainsi dans les PMN, en présence de MPO, les ions chlorures Cl^- sont oxydées via l' H_2O_2 en HOCl (voir réaction 2 ci-dessus).

Dans la défense de l'hôte, l'HOCl a pour action principale d'oxyder la méthionine (Met), présente en membrane externe et au niveau du périplasma des bactéries phagocytées, en méthionine sulfoxyde (Met(O)), produit stable (Fig. I.2.30). L'oxydation de Met est MPO-dépendante. Rosen et al. (2009) ont en effet montré que la réactivité de l'HOCl avec Met est beaucoup plus élevée ($3,8.10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) que celle de l' H_2O_2 ($0,02 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) ou des ions O_2^{\bullet} ($3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) (Rosen et al., 2009).

En présence de concentrations élevées en HOCl (entre 30 et 250 μM), Rosen et al. ont observé une diminution de la viabilité bactérienne, mais aussi une diminution significative des processus de translocation des protéines bactériennes à travers la membrane plasmique, dépendant des voies SecA et SRP, ces deux voies, convergeant vers le translocon membranaire SecYEG. Cette diminution, entraînant une accumulation de protéines dans le cytoplasme, pourrait être due à l'oxydation de la méthionine ou d'autres acides aminés vulnérables de SecYEG. Enfin, les données de cette équipe suggèrent aussi que l'effet bactéricide du HOCl serait lié surtout à l'oxydation des protéines cytosoliques ou de la membrane interne bactérienne (Fig. I.2.30) (Papanikou et al., 2007; Rosen et al., 2009).

De plus, il a été montré dans la même étude que les bactéries sont plus susceptibles lorsque le système de réparation de la Met(O) est invalidé, tandis qu'elles sont plus résistantes lorsque la méthionine sulfoxyde A, une enzyme de réparation, est surexprimée (Rosen et al., 2009). En plus de la méthionine, l'HOCl peut également oxyder la cystéine ou les clusters de protéines Fe-S (Rosen et al., 2009).

Néanmoins, lorsque la production de MPO devient chronique et excessive, elle peut devenir dommageable pour les cellules et tissus de l'hôte infecté, en raison des réactions des produits secondaires de la MPO avec l'ADN, des protéines, des lipides insaturés et des groupements ROOH, contribuant ainsi à des maladies chroniques telles que le diabète, les maladies liées au système nerveux central ou aux voies respiratoires. Elle peut, de plus, être impliquée dans la formation de lésions athéroscléreuses et donc *in fine* contribuer à des maladies cardiovasculaires inflammatoires chroniques (Fig. I.2.29) (pour une revue, voir (Nicholls and Hazen, 2005)).

2.1.4.2.4.4 Rôle de la MPO dans l'athérosclérose

La MPO est une enzyme hautement cationique, capable de se lier aux cellules endothéliales, aux leucocytes mais aussi aux LDLs (Carr et al., 2000b). Elle génère plusieurs espèces réactives dont l'HOCl, les chloramines (RNH_2Cl) obtenues après

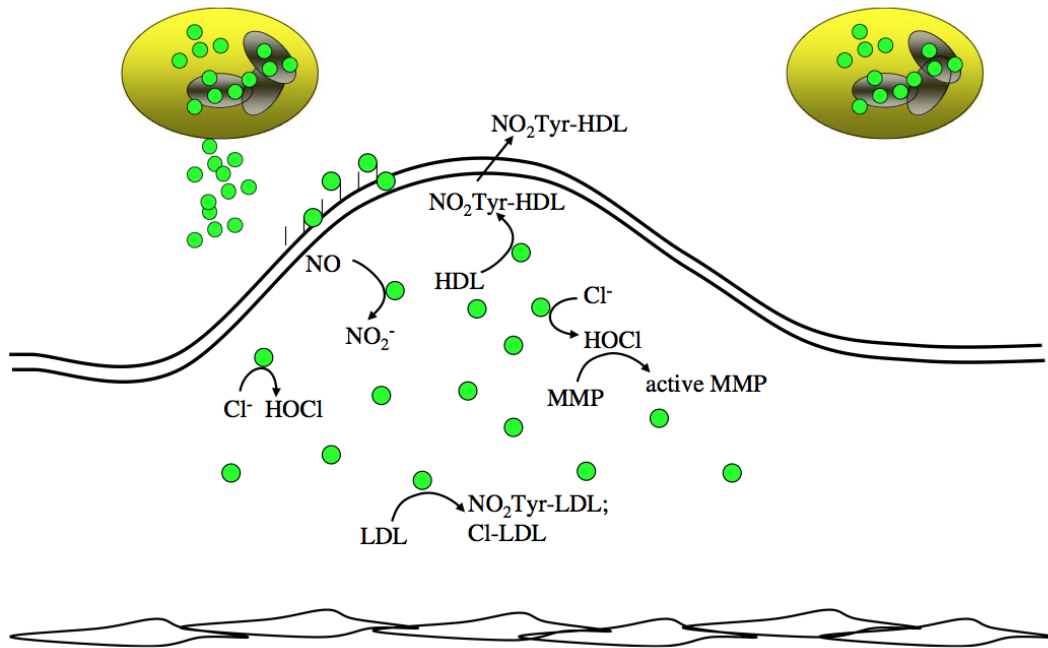


Figure I.2.31. Action de la myéloperoxydase dans la paroi artérielle, via l'HOCl et le NO_2^\bullet .

La myéloperoxydase est capable, après oxydation avec des ions chlorures et du NO, de générer respectivement de l'HOCl et du NO_2^\bullet . Ces produits de la réaction peuvent ensuite induire des modifications au sein des LDLs, mais aussi des HDLs. De plus, cette enzyme peut activer, via l'HOCl, les métalloprotéinases de matrice (MMPs) ou à l'inverse, réprimer les inhibiteurs de MMPs.

(Lau and Baldus, 2006)

réaction avec les amines RNH₃ ou l'ammonium, des radicaux tyrosyl et du dioxyde d'azote qui oxydent à leur tour les antioxydants présents dans les LDLs ainsi que l'APOB100 et la partie lipidique (Babior, 1984; Carr et al., 2000a; Rosen et al., 2009).

En plus d'entraîner des modifications oxydatives, les produits primaires de l'oxydation médiée par la MPO, notamment la 3-nitrotyrosine (3-NO₂-Tyr) et la 3-chlorotyrosine (3-Cl-Tyr) peuvent également induire une agrégation des LDLs ou des « cross-linkings » (Fig. I.2.31) (Podrez et al., 2000a).

Leeuwenburgh et al. ont mis en évidence que les LDLs isolées à partir de lésions athéroscléreuses humaines contiennent 100 fois plus de 3-NO₂-Tyr que les LDLs circulantes de donneurs sains (Leeuwenburgh et al., 1997a; Leeuwenburgh et al., 1997b). Hazen & Heinecke, en 1997, ont observé que la concentration de 3-Cl-Tyr est 6 fois plus élevée dans des lésions athéroscléreuses avancées humaines en comparaison avec des tissus aortiques sains (Hazen and Heinecke, 1997). La 3-chlorotyrosine, produite uniquement à partir d'une réaction catalysée par la MPO, est considérée comme bio-marqueur de l'oxydation à la MPO (Podrez et al., 2000a).

La MPO, sous forme catalytiquement active, a également été détectée au sein de lésions athéroscléreuses humaines, où elle est co-localisée notamment avec des cellules spumeuses (Daugherty et al., 1994; Moguilevsky et al., 2004).

De plus, il a été montré qu'il existe une corrélation entre des concentrations en MPO leucocytaire et circulante élevées et un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires (Duzguncinar et al., 2008). Une étude clinique a notamment mis en évidence que le taux plasmatique de MPO chez des personnes en bonne santé, permet de prédire le risque de développer des maladies cardiovasculaires. Les individus présentant les taux les plus élevés présentent un risque plus élevé de développer des symptômes dans les 8 ans (Meuwese et al., 2007). Il semble également exister une corrélation entre la concentration plasmatique de MPO et une susceptibilité accrue de la plaque à se rompre (Ndrepepa et al., 2008).

Enfin, une étude a été menée sur des individus avec une déficience en MPO. Ces individus étaient protégés d'un risque de maladies cardiovasculaires par opposition aux individus « contrôle ». Mais ils présentaient une sensibilité plus grande aux infections et aux maladies inflammatoires chroniques (Kutter et al., 2000). De plus, des individus avec un polymorphisme -463G/A au sein du promoteur de la MPO ne présentaient pas cette protection contre le développement de maladies artérielles coronariennes en comparaison avec des individus homozygotes A/A. Il a en effet été démontré chez les individus G/A que la MPO est plus exprimée (Asselbergs et al., 2004; Nikpoor et al., 2001; Pecoits-Filho et al., 2003).

Il existe également de nombreuses études épidémiologiques suggérant que la MPO serait bien un biomarqueur pour prédire les risques de maladies cardiovasculaires, mais les comparaisons entre études ne sont pas toujours faciles, les méthodes de dosage de la MPO n'étant pas standardisées (Tableau I.2.6) (Schindhelm et al., 2009).

Enfin, il est important de signaler des différences non négligeables entre l'homme et la souris. Au contraire de l'homme, les macrophages des lésions athéroscléreuses murines n'expriment pas la MPO. De plus, les produits de l'oxydation de la MPO sont peu ou pas détectés au sein de ces lésions. De plus, Brennan et al. (2001) ont montré que la MPO murine jouerait un rôle protecteur dans l'athérosclérose. En effet, des souris *Ldl-r^{-/-}* irradiées puis transplantées avec des cellules de moelle osseuse de souris déficientes

Table 1. Overview of prospective and case-control studies assessing the association of myeloperoxidase with cardiovascular disease.									
First author, year (ref. #)	Sample type	Study population	n, Cases (controls)	Men, %	Age, years	Follow-up, mo	Outcome	Risk, 95% CI	Comparison
Apple 2007 (23)	Heparin plasma	Patients with ACS	457	57% (No event) 48% (Event)	57 (16) (No event) 62 (18) (Event)	4	All-cause mortality	0.9 (0.4–2.1)	Above vs below 99th percentile
Baldus 2003 (4)	Serum	Patients with ACS	1090	71 (Low MPO) 69 (High MPO)	61.4 (10.5) (Low MPO) 62.5 (10.4) (High MPO)	6	MI ^a or mortality	2.25 (1.32–3.82)	High vs low MPO
Brennan 2003 (5)	Plasma	Patients with chest pain	142 (462)	55 (No MI) 70 (MI)	61.4 (13.8) (No MI) 66.5 (12.8) (MI)	1 and 6	MI	4.7 (2.9–7.7)	4th vs 1st Quartile MPO
Brevetti 2008 (6)	Serum	Patients with PAD	156	77	67.1 (8.2)	12–24	CVD events	6.80 (1.20–38.7)	High vs low MPO
Cavusoglu 2007 (7)	Plasma	Patients with ACS	193	100	65.0 (9.3) (Low MPO) 64.7 (10.8) (High MPO)	24	MI	1.60 (1.09–2.36)	Per 1 SD of log(MPO)
Dominguez 2008 (8)	Serum	Patients STEMI and CS	38	78 (Survivors) 65 (Nonsurvivors)	66 (10) (Survivors) 75 (12) (Nonsurvivors)	NA	In-hospital mortality	3.9 (1.8–7.5)	MPO, continuous
El-Bejjani 2008 (18)	Plasma	HIV-infected adults	62 (62)	94	46.0 (40–52) 45.5 (39–51)	12	CVD events	NA	Cases vs controls
Exner 2006 (9)	Serum	Asymptomatic CAD patients	1019	62	69 (61–76)	7.5	Progression of ICA stenosis	2.57 (1.39–4.75)	Above vs below MPO median
Khan 2007 (10)	EDTA plasma	Patients with STEMI	384 (257)	21 (1st quartile) 15 (4th quartile)	61.8 (12.3) (1st quartile) 67.6 (11.9) (4th quartile)	>1	Death and nonfatal MI	6.91 (1.79–26.73)	Above vs below median log(MPO)
Meuwese 2007 (11)	Serum	Healthy individuals	1138 (2237)	63 (Controls) 64 (Cases)	65.3 (7.7) (Controls) 65.5 (7.8) (Cases)	96	CAD	1.36 (1.07–1.73)	Log(MPO), continuous
Mocatta 2007 (12)	EDTA plasma	Patients with MI	512	80	61.7 (11.0)	60	All-cause mortality	1.81 (1.07–3.05)	Above vs below MPO median
Morrow 2008 (13)	Plasma	Patients with ACS	1524	68 (Below median) 66 (Above median)	61 (52–69) 61 (53–70)	1	Nonfatal MI or hospitalization	2.10 (1.36–3.23)	Log(MPO), continuous
Ndrepepa 2008 (14)	EDTA plasma	Patients with stable CAD	680 (194)	42 (Controls) 73 (Cases)	58.7 (Controls) 74.5 (Cases)	NA	ACS	2.08 (1.54–2.81)	MPO, continuous
Stefanescu 2008 (17)	EDTA plasma	Patients with stable CAD	382	46 (1st Tertile) 72 (3rd Tertile)	64.7 (1st Tertile) 68.4 (3rd Tertile)	42	All-cause mortality	1.06 (0.71–1.59)	High vs low and intermediate MPO
Zhang 2001 (15)	Leukocytes/blood	Patients with and without established CAD	158 (175) 80 (Cases)	58 (Controls) 80 (Cases)	55 (10) (Controls) 64 (13) (Cases)	NA	NA	11.9 (5.5–25.5)/ 20.4 (8.9–47.2)	Cases vs controls

^aMI, myocardial infarction; PAD, peripheral artery disease; STEMI, ST-segment elevation MI; CS, cardiogenic shock; ICA, internal carotid artery; NA, not applicable.

Tableau I.2.6. Tableau regroupant plusieurs études visant à étudier l'association entre MPO et maladies cardiovasculaires.
(Schindhelm et al., 2009)

	MDA-HNE ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonyl (nmol/mg)
LDL		
Native LDL	0.32 \pm 0.15	0.81 \pm 0.3
Mox-LDL	0.21 \pm 0.12	2.72 \pm 0.21*
LDL-Cu ²⁺	2.45 \pm 0.29* [†]	33.00 \pm 1.47*

Note: Malondialdehyde and hydroxynonenal assays were carried out according to the method described by Gérard-Monnier et al. (1998) with slight modifications, while a carbonyls assay was performed as described by Yan et al. (1995). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$) and analyzed by a Kruskal-Wallis ANOVA on ranks.

* $P < 0.05$ vs native LDL or native albumin, using a Dunnett's posthoc test.

[†]Concentration enhanced by the addition of Cu²⁺, $P < 0.009$.

[‡]Concentration enhanced by the addition of Cu²⁺, $P < 0.002$.

[§]In albumin, which does not contain lipids, neither MPO nor Cu²⁺ oxidation increased the amount of MDA-HNE, but MPO oxidation highly boosted its carbonyl concentration ($P < 0.001$)

Tableau I.2.7. Analyse comparative des dommages oxydatifs induits par la MPO et le CuSO₄, aux niveaux des fractions lipidiques et protéiques des LDLs.

A l'inverse de l'oxydation au CuSO₄, la myéloperoxydase, via la production d'HOCl, induit principalement des modifications au niveau de la partie protéique, l'APOB100 de la LDL (aldéhydes détectés par le « carbonyl assay »), avec très peu de peroxydation lipidique (mesurée par les « malondialdehyde-hydroxynonenal assays »).

L'oxydation au CuSO₄ induit, quant à elle, une majorité de modifications au niveau de la partie lipidique avec des concentrations élevées en peroxydes lipidiques détectés. Ceux-ci, via des produits de décomposition (voir Fig. I.2.20) induiraient à leur tour une modification des résidus lysine de l'apoB100, ce qui expliquerait l'abondance de carbonyl.

Adapté de (Boudjeltia et al., 2006)

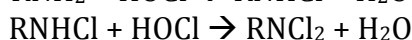
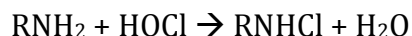
pour la MPO développent des lésions athéroscléreuses plus grandes que les souris *Ldl-r^{-/-}* contrôles (Brennan et al., 2001). Néanmoins, les souris *Ldl-r^{-/-}* développent également des lésions de taille plus importante lorsque les macrophages de ces lésions surexpriment la MPO humaine, après transplantation avec des cellules de moelle osseuse de souris transgéniques pour la MPO humaine (McMillen et al., 2005).

En conclusion, il a été montré *in vivo* que les Ox-LDLs sont des entités complexes et hétérogènes. Plusieurs systèmes sont probablement responsables de l'oxydation des LDLs *in vivo* (Miller and Shyy, 2017). *In vitro*, c'est en général un seul protocole d'oxydation qui est utilisé à la fois. Dans notre travail, nous avons choisi d'étudier la MPO (Jiang et al., 2011), même si nous avons conscience qu'il ne s'agit pas de l'unique système d'oxydation enzymatique des LDLs.

2.1.4.2.4.5 Oxydation des lipoprotéines en présence de MPO *in vitro*

Plusieurs équipes ont caractérisé les LDLs oxydées avec de la MPO *in vitro*.

Contrairement au cuivre, la myéloperoxydase, de par l'action de ses produits de réaction (ex. : H₂O₂), oxyde principalement la partie protéique de la lipoprotéine, avec peu ou pas de peroxydation des lipides (Fig. I.2.22) (Jiang et al., 2011; Lau and Baldus, 2006; Schindhelm et al., 2009). En effet, l'HOCl réagit avec les groupes amines-ε des résidus lysine de l'APOB des LDLs. Cette réaction induit principalement la formation de N-chloramines (Hazell and Stocker, 1993).



Une fraction des N-chloramines générées se décompose ensuite en aldéhydes (R-CH=O), impliqués dans les « cross-linkings » et agrégations subséquentes des LDLs modifiées. En effet, les aldéhydes formés peuvent ensuite réagir avec un autre groupe amine-ε, provenant de la même APOB ou de l'APOB d'une autre LDL. Cette réaction induit la formation de bases de Schiff, qui peuvent ensuite être hydrolysées (R-CH=N-CH₂-R') ou être réduites en produits stables (R-CH₂-N-CH₂-R') (Hazell et al., 1994).

Outre les résidus lysine, d'autres acides aminés tels que la cystéine, la méthionine, le tryptophane et la tyrosine, sont aussi susceptibles d'être oxydés via l'HOCl produit par la MPO (Hazell and Stocker, 1993; Heinecke, 2003).

L'oxydation médiée par l'HOCl induit également une peroxydation des lipides avec une faible production de 4-hydroxynonéal (4-HNE) et de TBARS (« thiobarbituric acid reactive substances ») (Tableau I.2.7) (Boudjeltia et al., 2006; Spickett et al., 2000). Panasencko et al., en 1994, ont montré que cette réaction de peroxydation est pH-dépendante (Panasencko et al., 1994). Cependant, il est intéressant de noter que la production de peroxydes lipidiques suite à une oxydation avec la MPO est considérablement plus faible par rapport à une oxydation avec du sulfate de cuivre (Tableau I.2.7) (Boudjeltia et al., 2006). En plus de la formation d'hydroperoxydes lipidiques, l'HOCl réagit aussi avec le cholestérol avec production d'oxystérols (van den Berg et al., 1993).

Les HDLs peuvent également être modifiées par la MPO. Elles sont modifiées au niveau de l'APOAI, cible privilégiée de la MPO, en raison d'un site de liaison spécifique de

l'APOAI pour la MPO. Les HDLs, ainsi modifiées, deviennent dysfonctionnelles, avec une diminution de leur capacité d'efflux du cholestérol (Bergt et al., 2004; Zheng et al., 2004), ainsi qu'avec une augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires (Schindhelm et al., 2009). Zheng et al. ont notamment montré que le contenu en 3-NO₂-Tyr et 3-Cl-Tyr de l'APOAI est plus élevé chez les individus souffrant de maladies cardiovasculaires par rapport à des individus sains (Zheng et al., 2004).

2.1.4.3 Modifications des LDLs *in vivo*

Les LDLs oxydées sont des entités complexes, résultant de la combinaison de plusieurs processus oxydatifs, qui ne font pas encore l'unanimité (pour des revues, voir (Parthasarathy et al., 2010; Yoshida and Kisugi, 2010)). Le site où les LDLs s'oxydent *in vivo* est également une question débattue depuis très longtemps et toujours non résolue. En effet, l'oxydation pourrait avoir lieu soit au niveau de l'intima dans l'espace sous-endothélial, soit déjà dans le plasma.

En ce qui concerne la première hypothèse, la plus généralement proposée, il semblerait qu'un système oxydatif tel que la myéloperoxydase, soit bien présente dans la subendothéliale où elle a été détectée par immunohistochimie (Baldus et al., 2001; Eiserich et al., 2002). Grâce à son interaction avec les glycosaminoglycans présents à la surface des cellules endothéliales, la MPO serait internalisée et se retrouverait finalement dans l'espace subendothélial après transcytose, ce qui la mettrait en présence des LDLs. Tiruppathi et al. (2004) ont également proposé que la transcytose de la MPO se ferait via l'albumine et les cavéoles. D'après ces auteurs, l'interaction entre albumine et MPO induirait l'internalisation de la MPO via une ABP (« albumin-binding protein ») au niveau des cavéoles, suivie de sa transcytose (Tiruppathi et al., 2004).

Cependant, on peut trouver des LDL oxydées dans la circulation. Pour certains auteurs, elles proviendraient des lésions (Itabe, 2003), mais il n'est pas exclu que l'oxydation puisse déjà commencer dans le milieu sanguin. Les LDLs seraient piégées au niveau de la barrière endothéliale par les glycosaminoglycans et oligosaccharides présents à la surface des cellules endothéliales (interaction apolipoprotéine-B100/protéoglycans de matrice) et s'oxyderaient en présence de myéloperoxydase cationique, libérée par les PMNs circulants. Son caractère cationique lui confère la capacité d'interagir avec les héparanes sulfate et glycoprotéines chargés négativement à la surface de l'endothélium, au niveau du glycocalyx. De plus, Carr et son équipe ont montré que la MPO pouvait se lier aux LDLs, tout en conservant son activité catalytique (Carr et al., 2000b). Ainsi modifiées, les LDLs seraient recrutées vers le site inflammatoire (Lau and Baldus, 2006; Malle et al., 2007; Miller et al., 2010).

Dans un cas comme dans l'autre, ces LDLs modifiées au niveau de l'apolipoprotéine-B100 accumulées au niveau de l'intima, sont reconnues par des récepteurs « scavenger » dont l'expression n'est pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, favorisant ainsi l'accumulation de cholestérol et de lipides et la formation de cellules spumeuses (voir 2.1.5.2 Récepteurs « scavenger ») (Fig. I.2.32). Les cellules spumeuses constituent le composant cellulaire majeur des lésions athéroscléreuse.

Les modifications des LDLs les plus communément évoquées sont celles liées à leur oxydation. Mais elles peuvent également subir une lipolyse, une protéolyse ou une agrégation, augmentant ainsi l'inflammation locale et favorisant la formation de cellules spumeuses (Lusis, 2000). Enfin, il faut aussi mentionner la glycation des LDLs, résultant de réactions non-enzymatiques du glucose ou de ses métabolites avec les amines secondaires des lysines, abondantes au niveau de l'APOB100. Les LDLs ainsi modifiées

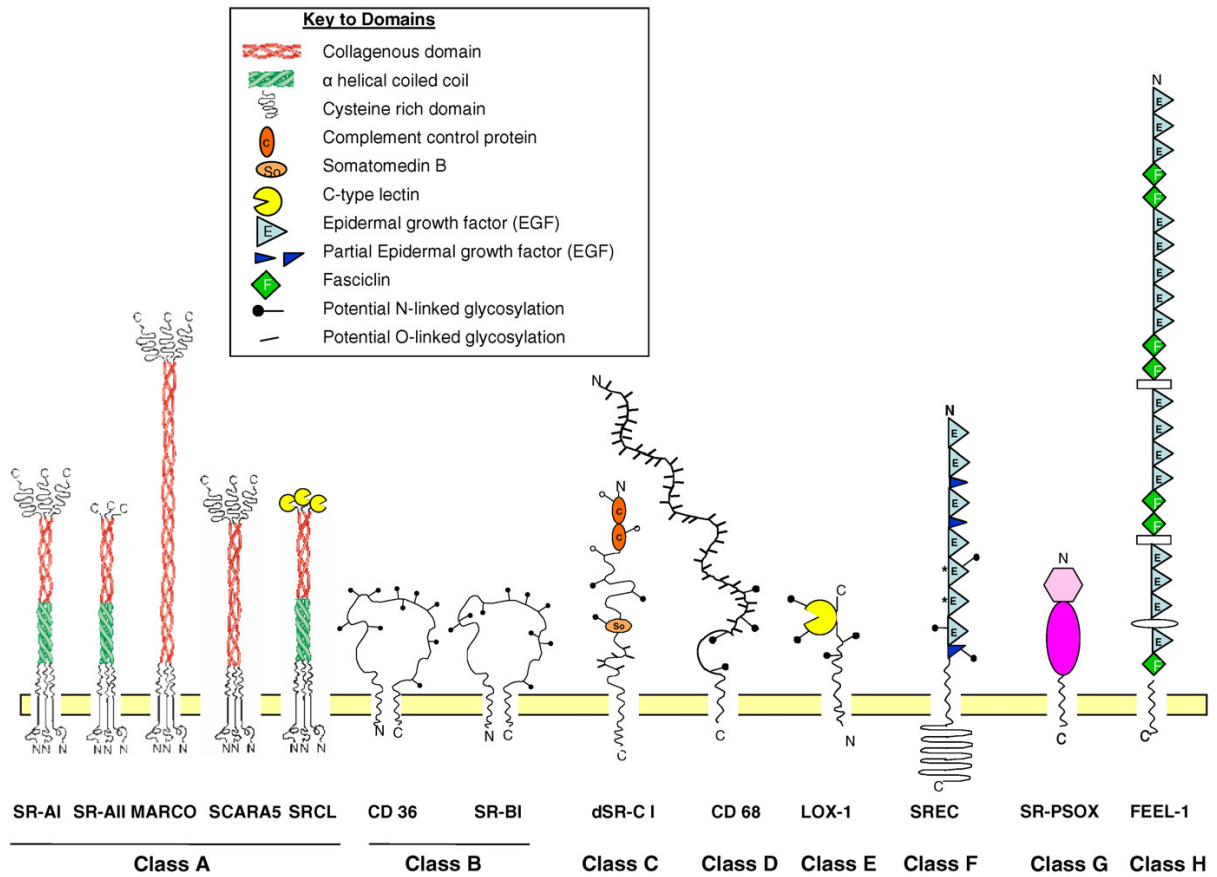


Figure I.2.32. Récepteurs "scavenger".

Les récepteurs "scavenger" sont classés en fonction de leur homologie de structure. Les domaines sont décrits dans la légende.

(Plüddemann et al., 2007)

ne sont également plus reconnues par les récepteurs aux LDLs natives (Soran and Durrington, 2011; Younis et al., 2008).

2.1.5 Formation de cellules spumeuses

La formation et la progression des lésions athéroscléreuses sont en majeure partie dues à la présence des macrophages et à leur capacité de transformation en cellules spumeuses via l'internalisation massive de lipoprotéines modifiées (Fig. I.2.4). Cette charge en lipides est rendue possible via la reconnaissance, entre autres, d'Ox-LDLs et de Mox-LDLs (ou MpOx-LDLs)², par des récepteurs particuliers appelés récepteurs « scavenger » (Fig. I.2.32), par des transporteurs aux lipoprotéines tels que les transporteurs de type ABC-ATPases, ou par des récepteurs du complément tels que les récepteurs FcγR.

Par contre, la stimulation avec les LDLs natives, reconnues par le LDL-R, n'induit pas, quant à elles, la formation de cellules spumeuses.

2.1.5.1 Récepteurs aux LDLs natives (LDL-R)

Le LDL-R (« low-density lipoprotein receptor ») a pour rôle physiologique de permettre l'internalisation des lipoprotéines transportant le cholestérol. Il a été découvert en 1973, grâce aux travaux de Goldstein et Brown portant sur l'hypercholestérolémie familiale (Goldstein and Brown, 1973).

L'expression du LDL-R est ubiquitaire, mais est particulièrement importante au niveau des hépatocytes et elle est soumise à une régulation contrôlée par la concentration intracellulaire en cholestérol (voir 2.1.3.1.2. Régulation de sa synthèse et internalisation) (Fig. I.2.9). Ce récepteur lie les LDLs natives dans un environnement à pH neutre et fait partie de la famille des récepteurs aux LDLs (Fig. I.2.33), qui inclut des récepteurs aux VLDLs. Outre l'endocytose de lipoprotéines, ces différents récepteurs reconnaissent des ligands très diversifiés et exercent de nombreuses fonctions, y compris dans la transduction de certains signaux (pour une revue, voir (Go and Mani, 2012; Goldstein and Brown, 2009; Li et al., 2001b)).

Le LDL-R comporte sept modules LA (« LDL-receptor type A ») qui permettent la liaison du ligand au récepteur, du côté amino-terminal. Le domaine EGFP (« Epidermal Growth Factor Precursor »), comprenant deux modules EGF-like suivis de six répétitions YMTD (domaine « propulseur ») et un troisième module EGF-like, est responsable de la libération de la particule de LDL dans l'endosome. Le pH plus acide des endosomes entraîne la libération des particules des LDLs : en effet, à plus faible pH (pH 5), le récepteur passe d'une conformation ouverte à fermée. Les modules 4 et 5 interagissent avec le domaine « propulseur », affaiblissant ainsi la liaison de la lipoprotéine aux modules LA 3 à 7 (Figs. I.2.34 et I.2.35) (Beffert et al., 2004; Gent and Braakman, 2004; Herz, 2001; Jeon and Blacklow, 2005). Le récepteur est recyclé vers la membrane plasmique tandis que les LDLs sont dégradées après la fusion avec les lysosomes : le cholestérol est rendu à nouveau disponible pour la cellule, grâce à l'hydrolyse des esters

² Les LDLs oxydées avec la myéloperoxydase sont à la fois abrégées sous la forme Mox-LDLs et MpOx-LDLs dans ce manuscrit. En effet, le terme « Mox-LDLs » est en général utilisé. Mais pour l'article publié dans *Mediators of Inflammation*, nous avons dû utiliser le terme « MpOx-LDLs » afin d'éviter la confusion avec les cellules polarisées, appelées « Mox » par Kadl et al. (2010).

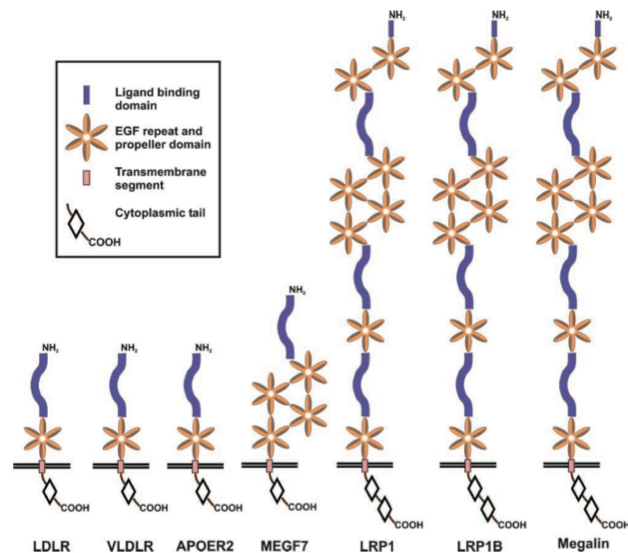


Figure I.2.33. Famille des récepteurs de type LDL-R.

Chacun des 7 membres de la famille des récepteurs à LDL-R possède un, voire plusieurs domaines de liaison à leur(s) ligand(s). Ils présentent également au moins un domaine d'homologie à l'EGF (« Epidermal Growth Factor »), un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Le motif NPxY de la queue cytoplasmique est impliqué dans l'endocytose et dans le clustering de protéines adaptatrices nécessaires dans les voies de signalisation.

Adapté de (Beffert et al., 2004)

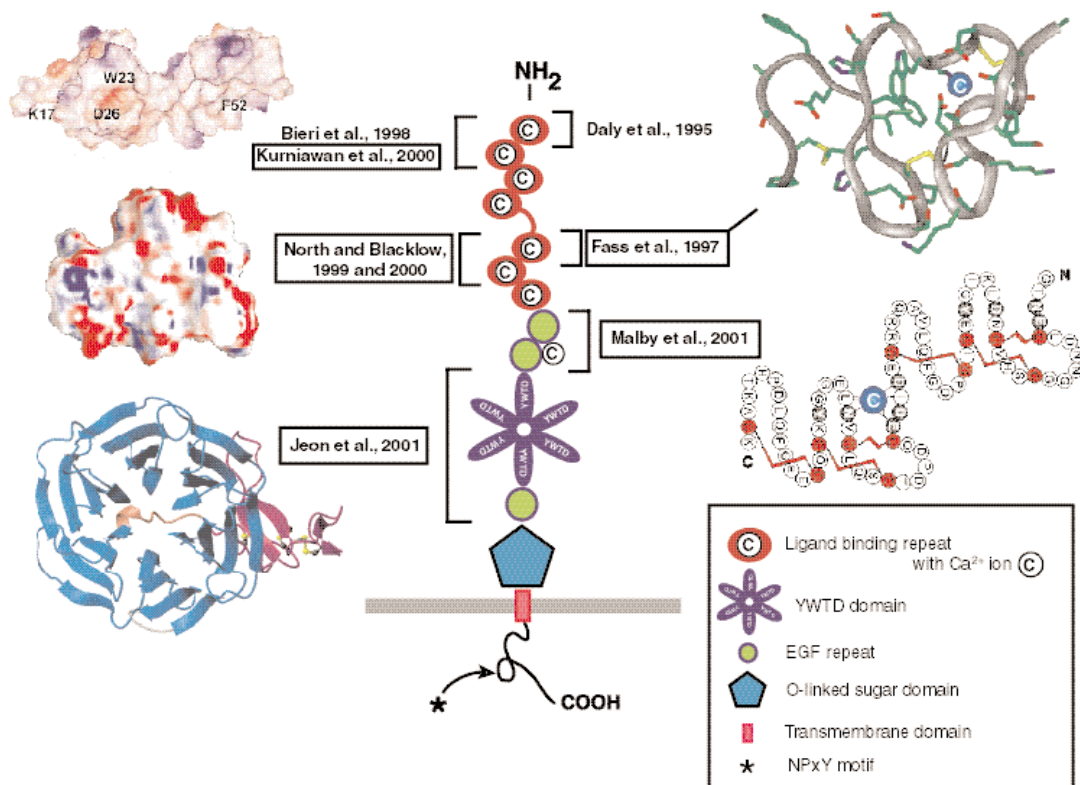


Figure I.2.34. Structure du LDL-R.

Le LDL-R est une protéine transmembranaire constituée d'un domaine de liaison au ligand (Ca^{2+} dépendant), d'un domaine EGFP (« Epidermal Growth Factor Precursor »), comprenant deux modules EGF-like, de six répétitions YMTD (domaine « propulseur »), d'un troisième module EGF-like et d'un domaine porteur de sucres O-liés. Sa queue cytoplasmique, contient un motif NPxY, nécessaire pour l'endocytose et le recrutement de protéines adaptatrices.

(Herz, 2001)

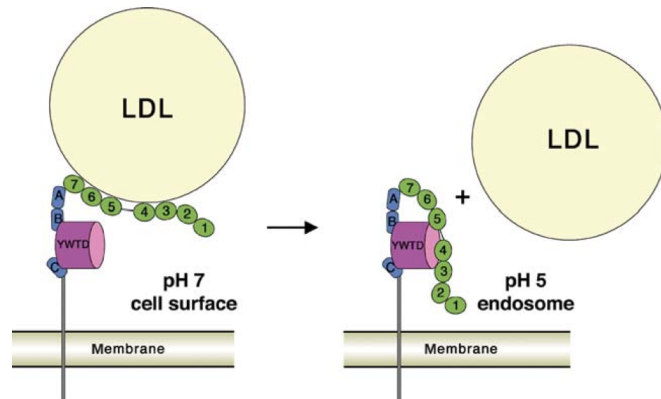


Figure I.2.35. Relargage des LDLs en fonction du pH.

Le LDL-R est une protéine transmembranaire, possédant un domaine EGFP (« Epidermal Growth Factor Precursor »), comprenant deux modules EGF-like suivis de six répétitions YMTD (domaine « propulseur ») et d'un troisième module EGF-like, suivi de sept répétitions LA (« LDL-receptor de type A »). Les modules LA 3 à 7 permettent la liaison des LDLs au récepteur. Cependant, le pH plus acide des endosomes entraîne la libération des particules de LDLs: en effet, à pH 5, le récepteur prend une conformation fermée. Les modules LA 4 et 5 interagissent avec le domaine « propulseur », empêchant ainsi la liaison de la lipoprotéine aux modules LA 3 à 7.

(Jeon and Blacklow, 2005)

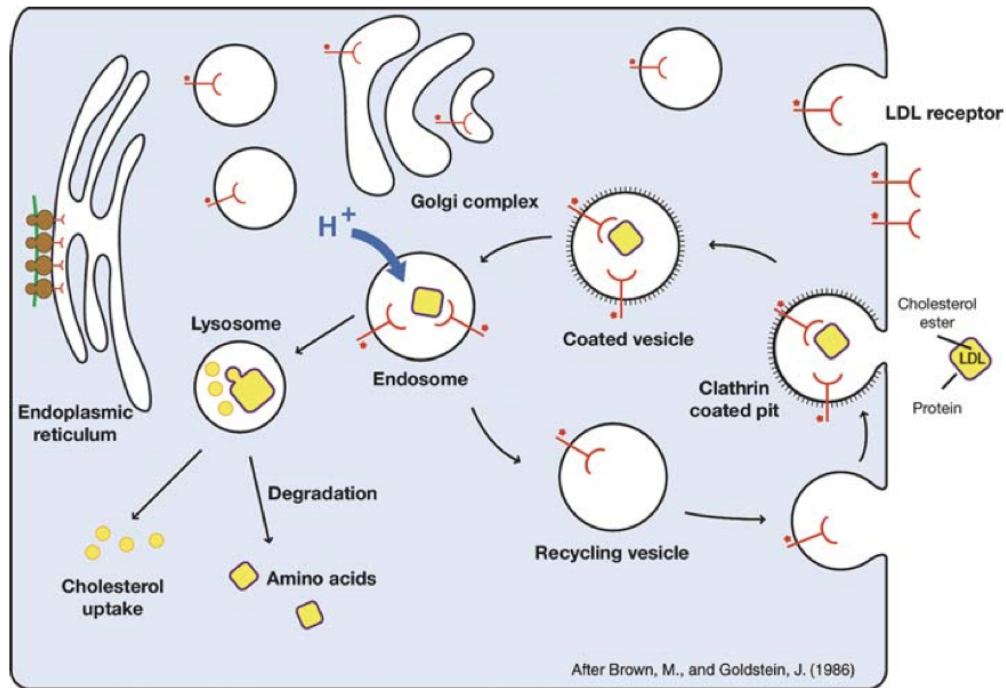


Figure I.2.36. Voie d'internalisation et de recyclage du LDL-R et de la particule de LDL.

Le LDL-R est un récepteur reconnaissant l'APOE des VLDLs, mais surtout, l'APOB100 des LDLs natives. La reconnaissance est possible grâce aux sept modules LA (« LDL-receptor type A ») : la liaison a lieu lorsque le pH du milieu est neutre. Le complexe LDL-LDL-R est alors internalisé dans une vésicule tapissée de clathrine, qui s'acidifie et devient un endosome. A pH plus acide, le complexe se dissocie à cause de la conformation fermée qu'adopte le récepteur.

Le récepteur retourne en surface cellulaire tandis que les LDLs subissent une dégradation lysosomale, avec recyclage du cholestérol et des acides aminés.

(Jeon and Blacklow, 2005)

de cholestérol ; il en est de même pour les acides aminés. Cette étape de recyclage du cholestérol est suivie d'une fine régulation des gènes codant le LDL-R, les enzymes de la synthèse du cholestérol et de son estérification, via le facteur SREBP2 (Fig. I.2.36) (Ikonen, 2008).

L'expression du LDL-R est également régulée au niveau post-traductionnel par la sérine endoprotéase PCSK9 (« proprotein convertase subtilisin/kenin type 9 »), principalement exprimée dans le foie et les intestins et elle-même régulée par SREBP2. En se liant au LDL-R, PCSK9 induit sa dégradation par les lysosomes (Fig. I.2.37) (Lagace, 2014). De par son rôle, PCSK9 est donc une cible très prometteuse pour de nouveaux traitements (voir 3.2.5 Modèles murins exploitant la technique d'édition de génome CRISPR-Cas9).

Suite à ces régulations, les LDLs natives n'induisent donc pas la formation de cellules spumeuses, au contraire des LDLs oxydées (Gent and Braakman, 2004; Jeon and Blacklow, 2005).

Le LDL-R reconnaît également les mmLDLs (« minimally-modified LDLs »). En effet, ces particules ne sont oxydées qu'au niveau de la partie lipidique, permettant toujours à l'APOB100, intacte, d'être reconnue par le récepteur aux LDLs natives.

Au contraire, lorsque les lipoprotéines, et plus précisément, lorsque l'APOE (des B-VLDLs) ou l'APOB100, ont été modifiées, elles ne sont plus reconnues par ce récepteur, mais bien par les récepteurs dits « scavenger » (Fig. I.2.32).

A l'inverse du LDL-R, l'internalisation des LDLs par les récepteurs « scavenger » n'est pas suivie d'une régulation de leur expression. C'est la raison pour laquelle les macrophages se chargent massivement en lipides et forment des cellules spumeuses (Sun et al., 2005; Zhao and Dahlman-Wright, 2010).

2.1.5.2 Récepteurs « scavenger »

Les macrophages expriment la plupart des récepteurs « scavenger » illustrés aux figures I.2.32 et I.2.38 (Moore and Freeman, 2006; Pluddemann et al., 2007). Nous nous focaliserons sur trois classes principales, les récepteurs de classe A, B et E. Ces récepteurs sont également exprimés sur d'autres types cellulaires (Tableau I.2.8) et reconnaissent des ligands très diversifiés, dont les lipoprotéines modifiées (ou non) (Fig. I.2.39), des cellules apoptotiques et des bactéries (Stephen et al., 2010). Ils sont beaucoup plus diversifiés d'un point de vue structural comparativement à la famille des récepteurs aux LDLs (Levitan et al., 2010).

2.1.5.2.1 Récepteurs « scavenger » de classe A

Le premier récepteur « scavenger », SR-A ou « acetyl LDL receptor », fut découvert en 1979 par Goldstein et Brown (Goldstein et al., 1979; Steinberg et al., 1989).

Les récepteurs SR-AI (ex. : MSR1 « macrophage scavenger receptor-1 ») sont des glycoprotéines membranaires homotrimériques avec six domaines distincts: un domaine cytoplasmique N-terminal court, un domaine transmembranaire, une région intermédiaire, un motif en hélices α « coiled coil », un domaine de type collagène et enfin, un domaine C-terminal riche en cystéine. Ce dernier est absent dans le cas des

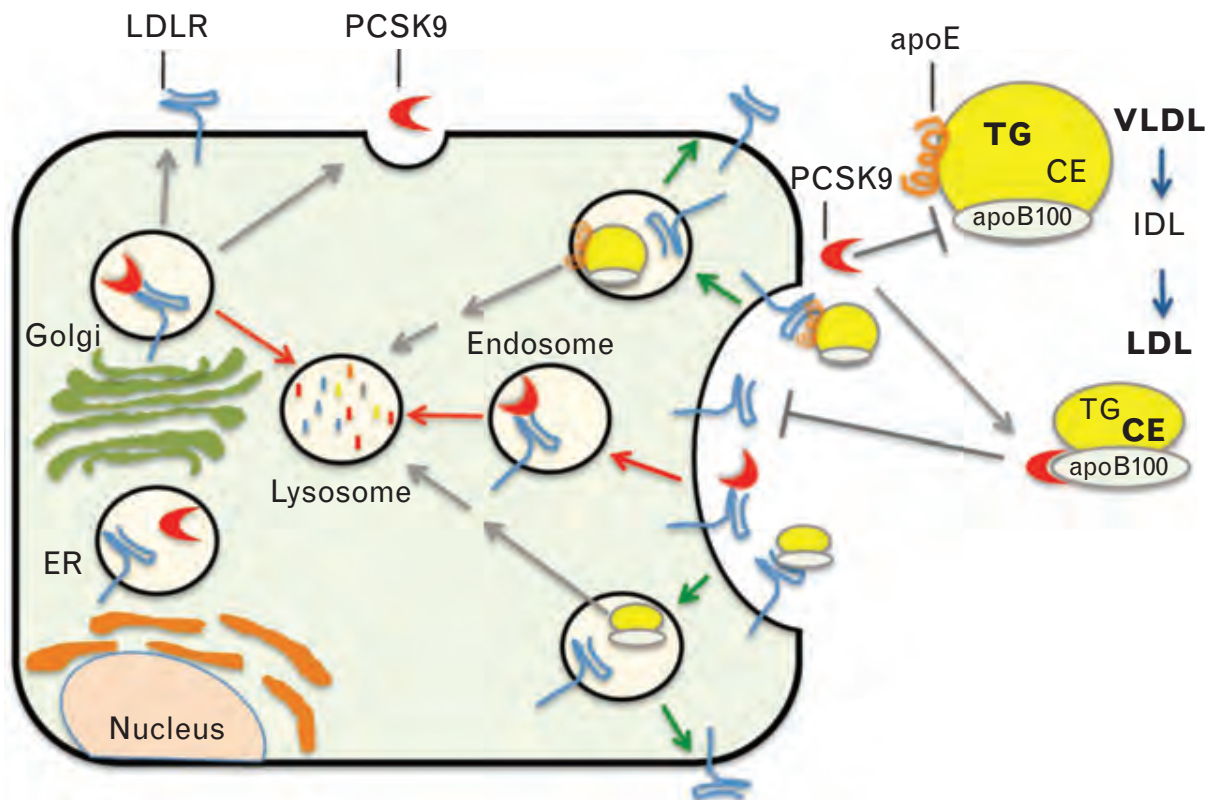


Figure I.2.37. Rôle de PCSK9 dans la dégradation du LDL-R et régulation par l'apoB100.

Dans les cellules hépatiques, il existe deux voies de dégradation du LDL-R médiée par PCSK9. La première débute par la liaison de PCSK9 avec le LDL-R internalisé dans des vésicules provenant du trans-Golgi, l'amenant ainsi à être dégradé dans les lysosomes.

L'autre voie consiste en la liaison, à la surface de la cellule, de PCSK9 sécrétée, avec le motif EGF-A (« epidermal growth factor-like A ») du LDL-R. Une fois internalisés dans l'endosome, PCSK9 empêche le recyclage en membrane du LDL-R, qui sera dégradé ensuite par les lysosomes.

Dans la circulation sanguine, PCSK9 est également capable de se lier à l'APOB100 des LDLs. Grâce à cette liaison, l'APOB100 empêche la liaison de PCSK9 au LDL-R exprimé en membrane. Les mécanismes menant à l'inhibition de l'activité de PCSK9 par l'APOB100 ne sont pas encore connus à ce jour.

(Lagace et al., 2014)

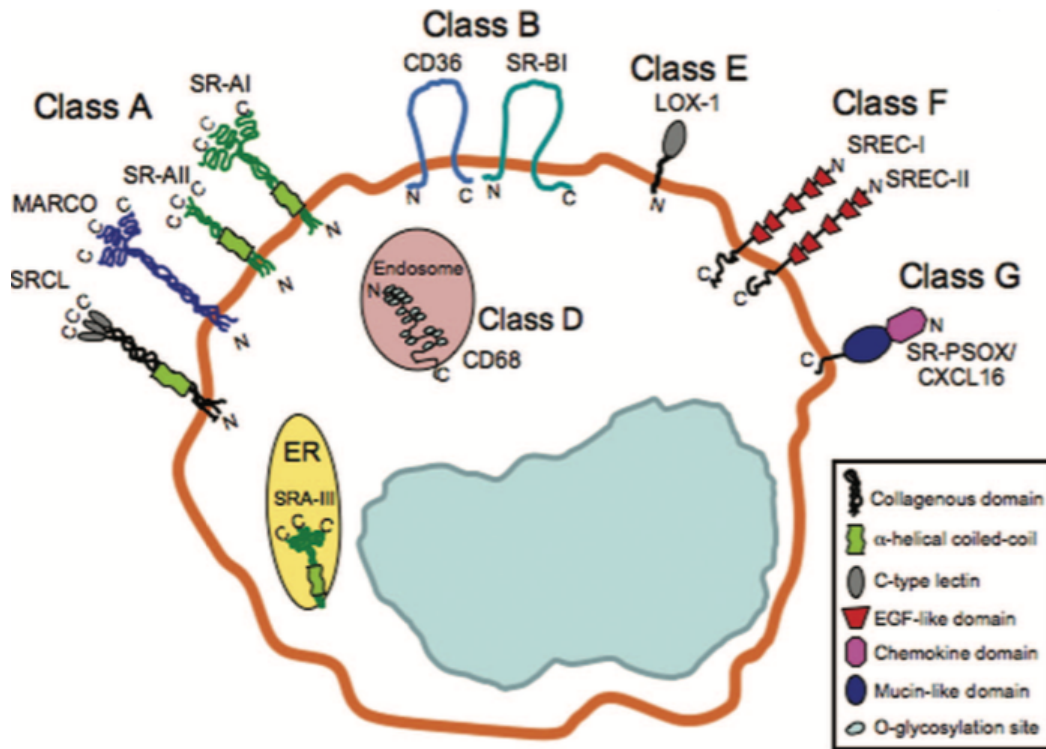


Figure I.2.38. Récepteurs « scavenger » exprimés dans les macrophages.
(Moore and Freeman, 2006)

TABLE 1: The major scavenger receptor ligands and expression profiles.

Class	Scavenger receptor	Ligands	Expression profile	Involvement in CVD?
A	SR-A	AcLDL, OxLDL, β -amyloid, molecular chaperones, ECM, AGE, apoptotic cells, activated B-cell, bacteria	Macrophages, mast, dendritic, endothelial and smooth muscle cells	Yes—involved in OxLDL uptake by macrophages leading to foam cell formation
A	MARCO	AcLDL, OxLDL, apoptotic cells, B cells, bacteria	Macrophages, dendritic cells	No
B	SR-B	HDL, LDL, OxLDL, apoptotic cells	Monocytes/macrophages, hepatocytes and adipocytes	Reduces atherosclerosis through reverse cholesterol transport of HDL
B	CD36	AcLDL, OxLDL, HDL, LDL, VLDL, β -amyloid, AGE, apoptotic cells	Macrophages, platelets, adipocytes, epithelial and endothelial cells	Yes—OxLDL uptake into macrophages leading to foam cell formation
E	LOX-1	OxLDL, molecular chaperones, ECM, AGE, apoptotic cells, activated platelets, bacteria	Endothelial and smooth muscle cells, macrophages, and platelets	Yes—OxLDL uptake in endothelial cells, leads to endothelial dysfunction
F	SREC-I/II	AcLDL, OxLDL, molecular chaperones, apoptotic cells	Endothelial cells and macrophages	Low levels of AcLDL uptake
G	SR-PSOX	OxLDL and bacteria	Macrophages, smooth muscle, dendritic, endothelial cells, and B- and T cells.	Yes—involved in OxLDL uptake in macrophages
H	FEEL-I/II	AcLDL, molecular chaperones, ECM, AGE, bacteria	Monocytes/macrophages, endothelial cell	No known link

SR-A: scavenger receptor class A, AcLDL: acetylated low density lipoprotein, OxLDL: oxidised low density lipoprotein, ECM: extracellular matrix, AGE: advanced glycation end products, MARCO: macrophage receptor with collagenous structure, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, VLDL: very low density lipoprotein, LOX-1: lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, FEEL-I/II: fasciadin, epidermal growth factor (EGF)-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1.

Tableau I.2.8. Les récepteurs « scavenger », leurs principaux ligands et leurs profils d'expression.
(Stephen et al., 2010)

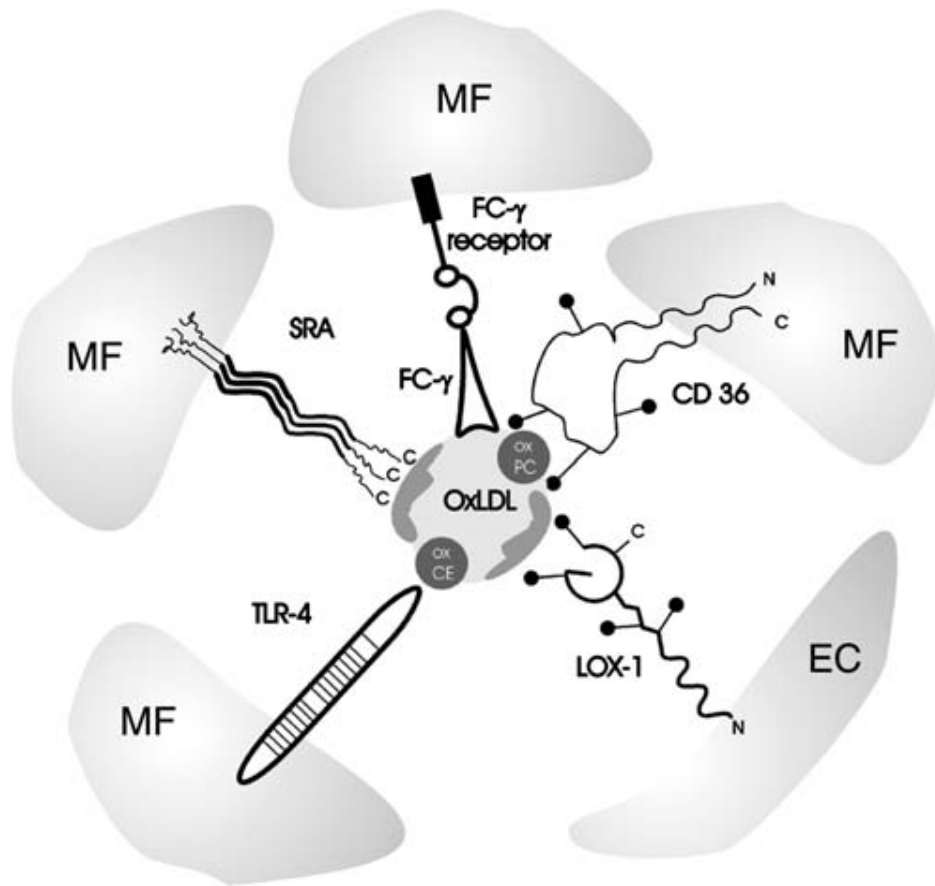


Figure I.2.39. Représentation schématique des mécanismes de reconnaissance des Ox-LDLs par les récepteurs « scavenger ».

Les principaux types de récepteurs « scavenger » capables de reconnaître les LDLs oxydées sont les récepteurs SRA-I/II et CD36. Ils reconnaissent les Ox-LDLs au niveau de l'APOB100 modifiée et au niveau des phospholipides oxydés, respectivement. Les Ox-LDLs peuvent également être reconnues par les récepteurs Fc et par TLR4. TLR4 reconnaît en effet les esters de cholestérol oxydés des LDLs.

Enfin, LOX-1, récepteur « scavenger » de classe E, reconnaît également l'APOB100 modifiée des LDLs oxydées.

Ces récepteurs sont notamment exprimés par les macrophages (MF) et les cellules endothéliales (EC).

(Levitan et al., 2010)

récepteurs SR-AII (Greaves and Gordon, 2009; Moore and Freeman, 2006; Murphy et al., 2005; Pluddemann et al., 2007; Stephen et al., 2010).

Les récepteurs « scavenger » de classe A (SR-A) (Figs. I.2.32 et I.2.38) sont majoritairement exprimés dans les macrophages, mais aussi au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Ces récepteurs reconnaissent préférentiellement les LDLs acétylées (Ac-LDLs) et ont une affinité plus faible pour les Ox-LDLs (pour une revue, voir (Moore and Freeman, 2006)). Leur expression au niveau ARNm est fortement induite en présence d'Ox-LDLs. Il est intéressant de noter que la présence de $TNF\alpha$, de $TGF\beta 1$, de N-acétylcystéine et d' $IFN\gamma$ entraîne une diminution de leur expression en ARNm et donc une diminution de la liaison des Ac-LDLs qu'ils reconnaissent (Murphy et al., 2005).

Les SR-A reconnaissent les LDLs modifiées, et plus précisément, les résidus lysine, dérivatisés par des produits spécifiques de la peroxydation lipidique, tels que l'hydroxynonéal (HNE) ou acétylés, au niveau de l'APOB100. L'étude de Wang et al. a également montré que SR-AI est capable de reconnaître les LDLs carbamylées au niveau de la partie protéique, cette carbamylation étant catalysée par le système $MPO/H_2O_2/SCN^-$. La reconnaissance des LDLs carbamylées par SR-AI induit la formation de cellules spumeuses (Wang et al., 2007).

En plus de ces LDLs modifiées, les SR-A reconnaissent aussi différents types de bactéries et des molécules non-lipoprotéiques chargées négativement (Tableau I.2.8) (Greaves and Gordon, 2009; Moore and Freeman, 2006; Murphy et al., 2005; Pluddemann et al., 2007).

2.1.5.2.2 Récepteurs « scavenger » de classe B

Le récepteur CD36 (ou SCARB3) (Figs. I.2.32 et I.2.38) appartient à la famille des récepteurs « scavenger » de classe B (SR-B). Le récepteur CD36 est une glycoprotéine avec deux domaines transmembranaires dont les extrémités N- et C-terminales sont toutes deux cytoplasmiques. Le domaine central extracellulaire de CD36 contient des ponts disulfures intra-chaînes (Levitan et al., 2010; Murphy et al., 2005).

Il est à la fois exprimé dans les monocytes, les macrophages, mais aussi au niveau des plaquettes, des cellules endothéliales, des adipocytes, des cellules musculaires lisses et de certains types de cellules épithéliales (Tableau I.2.8) (Murphy et al., 2005; Stephen et al., 2010).

Son expression est augmentée en présence des LDLs modifiées, telles que les Ac-LDLs et Ox-LDLs, mais aussi en présence d'IL-4 ou de M-CSF, mais pas en présence de HDLs, du LPS ou de l' $IFN\gamma$ (Murphy et al., 2005). Cette augmentation de l'expression de CD36 par les Ox-LDLs ou l'IL-4, est médiée par l'activation du facteur de transcription $PPAR\gamma$. CD36 reconnaît donc les LDLs modifiées et les internalise, ce qui n'est pas le cas pour les LDLs natives. Des expériences réalisées sur des macrophages invalidés pour CD36, suggèrent qu'il est également un récepteur pour les LDLs modifiées avec la myéloperoxydase (Febbraio et al., 2000; Kunjathoor et al., 2002).

Au contraire des SR-A, le récepteur CD36 reconnaît surtout les produits d'oxydation des phospholipides (PL) oxydés (Podrez et al., 2003; Podrez et al., 2002a; Podrez et al., 2002b; Rigotti et al., 1995).

Il faut néanmoins signaler que Podrez et al. ont montré que l'incubation de macrophages avec des LDLs modifiées par le système oxydatif $MPO-H_2O_2-NO_2^-$, générant une nitration des résidus tyrosine de l'APOB100 et une peroxydation lipidique, induit la formation de cellules spumeuses. CD36 serait responsable de l'internalisation de ces LDLs oxydées

puisque la formation de cellules spumeuses n'est pas observée dans des macrophages déficients pour CD36 (Podrez et al., 2000b).

La structure de SR-BI (alias Scarb1) (Figs. I.2.32 et I.2.38), un autre membre dans la famille des SR-B, est très similaire à celle de CD36. De plus, ce récepteur est également exprimé dans les monocytes et les macrophages, avec comme différence un haut niveau d'expression dans les tissus adipeux et stéroïdogènes. De même, cette glycoprotéine a la capacité de lier les Ac-LDLs et les Ox-LDLs. Cependant, elle reconnaît aussi les HDLs natives et son expression est régulée par de nombreux facteurs dont les facteurs de transcription tels que SREBP (pour une revue, voir (Leiva et al., 2011)).

SR-BI joue un rôle essentiel dans le transport inverse du cholestérol et dans son métabolisme, car il favorise le transfert de cholestérol des cellules aux HDLs et le transport sélectif de ce cholestérol au foie (Fig. I.2.13). Ce récepteur a donc une action plutôt anti-athérogénique (Huby et al., 2006; Ikonen, 2008; Leiva et al., 2011; Pluddemann et al., 2007).

Ce sont, dans ce cas-ci, les Ox-LDLs, le TNF α , l'IL-1 et le LPS qui induisent une diminution de l'expression de SR-BI au niveau ARNm et donc de la prise d'esters de cholestérol par les HDLs (Murphy et al., 2005). Tout comme CD36, SR-BI est capable de former des dimères ou des multimères (Pluddemann et al., 2007).

Enfin, Marsche et al. ont montré, dans des macrophages THP-1, que les LDLs modifiées par l'HOCl, produit de la réaction catalysée par la MPO, sont des ligands du récepteur SR-BI, mais aussi du récepteur CD36 (Marsche et al., 2003).

2.1.5.2.3 Récepteurs « scavenger » de classe E

LOX-1 (« Lectin-like oxidized LDL receptor-1 ») (Figs. I.2.32 et I.2.38), encodé par le gène *OLR1* « *Oxidized low-density lipoprotein-1* », est un récepteur de classe E, exprimé dans l'endothélium vasculaire, ainsi que dans les macrophages, les cellules musculaires lisses et les plaquettes. Cette glycoprotéine membranaire (50 kDa) possède un domaine N-terminal cytoplasmique court, un domaine transmembranaire, un domaine « neck » et un domaine C-proximal « lectin-like » (type C) (Murphy et al., 2005; Sawamura et al., 1997; Taye and El-Sheikh, 2013).

En conditions basales, l'expression de LOX-1 est faible, tandis qu'elle est augmentée suite à la présence de (d') ROS, TNF- α , IL-1 α et IL-1 β , CRP (« C-reactive protein »), phosphatidylsérine, TGF- β 1, glucose en taux élevé, hormones endogènes (ex. aldostérone) et aussi en présence d'Ox-LDLs (Morawietz et al., 2002; Taye et al., 2010a; Taye et al., 2010b; Yan et al., 2011). En présence d'Ox-LDLs, la transcription de LOX-1 est induite, ce qui est suivi, après plusieurs étapes, par la formation d'un homodimère, activé après la liaison des Ox-LDLs. Ce complexe LOX-1 – Ox-LDLs est ensuite internalisé via endocytose et est dissocié dans les endosomes, les Ox-LDLs étant ensuite dégradées dans les lysosomes. LOX-1 est, quant à lui, recyclé dans la membrane plasmique (Murphy et al., 2008).

De plus, ce récepteur joue un rôle dans l'étape d'adhérence lors du recrutement des monocytes pendant le processus inflammatoire (Adachi and Tsujimoto, 2006; Mehta et al., 2006; Murphy et al., 2005; Pluddemann et al., 2007; Taylor et al., 2005b).

L'expression des récepteurs « scavenger » de classe E, tout comme celle des récepteurs « scavenger » des autres classes, est majoritairement régulée par le facteur de transcription PPAR γ , activé en présence de ligands tels que les acides gras oxydés

9-HODE ou 13-HODE présents dans les Ox-LDLs, mais aussi par les signaux extracellulaires tels que des cytokines (ex. : $TNF\alpha$, $IFN\gamma$) (Geng and Hansson, 1992; Hsu et al., 1996; Levitan et al., 2010; Lusic, 2000).

L'importance des récepteurs « scavenger », dans la reconnaissance des LDLs oxydées et donc dans la progression des lésions athéroscléreuses, a été démontrée notamment par la création de souris déficientes pour *Sr-a* et *Cd36* respectivement (Febbraio et al., 2000; Suzuki et al., 1997). Cependant, des discordances entre les études peuvent être notées (Levitan et al., 2010). En effet, pour certains, l'inactivation de l'expression de ces récepteurs a été décrite pour avoir des effets anti-athérogènes. Par exemple, Suzuki et al. ont montré que l'inactivation des récepteurs SRA-I/II dans des souris *ApoE*^{-/-} a pour conséquence une diminution de plus de 50 % de la taille des lésions athéroscléreuses (Suzuki et al., 1997). De même, l'inactivation de *Cd36* dans des souris *ApoE*^{-/-} entraîne une diminution de 45 à 75 % de la taille des lésions (Febbraio et al., 2000). D'autres, au contraire, observent que l'inactivation a des effets plutôt pro-athérogènes. Pour de Winther et al., l'inactivation de *Sr-a* chez des souris *ApoE3**Leiden a pour effet le développement de lésions plus complexes, sans diminution de la taille des lésions (de Winther et al., 1999). De même, Moore et al. ont également observé une augmentation de la taille de 20 à 40 % des lésions de souris *ApoE*^{-/-}, invalidées pour *Sr-a*/II ou *Cd36* (Moore et al., 2005). Une des hypothèses pour expliquer ces différences, proposée dans la revue de Levitan et al., serait qu'il y ait des différences dans la durée pendant laquelle les souris ont été nourries avec un régime hyperlipidémique. De plus, les équipes n'ont étudié ni les mêmes zones de l'aorte, ni les mêmes stades de développement de l'athérosclérose, les premières travaux étudiant les lésions précoces et les études plus récentes les lésions tardives (Levitan et al., 2010). Enfin, une étude de 2008 a mis en évidence que des patients déficients pour CD36 présentent une athérosclérose sévère et une morbidité associée aux maladies coronaires artérielles plus élevée, par rapport à des individus sains (Yuasa-Kawase et al., 2012).

En plus de la diversité des récepteurs « scavenger », les LDLs oxydées sont hétérogènes et les effets qu'elles déclenchent sont multiples (pour une revue récente, voir (Negre-Salvayre et al., 2017)).

La question de savoir si les récepteurs « scavenger » jouent un rôle plutôt positif ou négatif dans le développement des lésions athéroscléreuses reste donc débattue à l'heure actuelle.

2.1.5.3 Transporteurs de type ABC-ATPases

Outre les récepteurs « scavenger », il existe d'autres molécules reconnaissant les lipoprotéines, appartenant à la famille des transporteurs « ABC » (ou « ATP-Binding Cassette »). Ces protéines sont également membranaires (avec deux domaines cytoplasmiques de liaison à l'ATP et deux domaines transmembranaires) et ont la capacité de transporter, contre leur gradient de concentration, différents substrats à travers les membranes cellulaires, en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs ABC de type A1, G1 ou G4 participent activement à la formation des cellules spumeuses, via le transport des lipides (Lorkowski and Cullen, 2002).

Le transporteur de type G1 est ubiquitaire et comme mentionné précédemment, il semble impliqué dans le transport inverse du cholestérol (Fig. I.2.13) (Lorkowski and Cullen, 2002). Ce transport consiste en un processus de transfert du cholestérol aux

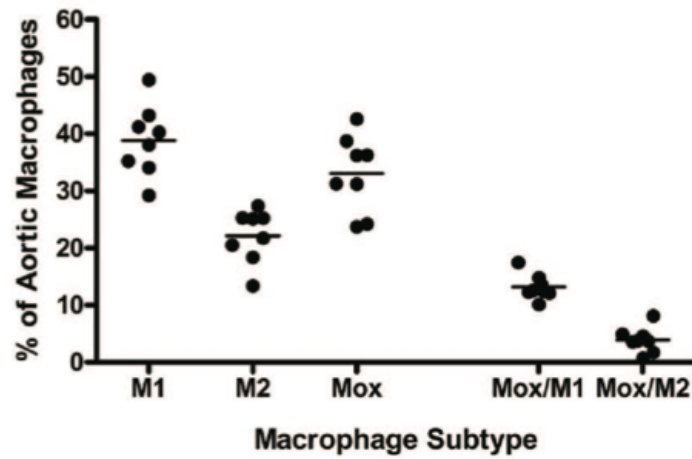


Figure I.2.40. Proportion de macrophages M1, M2 et Mox dans des lésions athéroscléreuses d'aorte de souris *Ldl-r^{-/-}*. (Kadl et al., 2010)

HDLs natives, interagissant en membrane avec SR-BI (Cavelier et al., 2006; Yvan-Charvet et al., 2010) (Fig. I.2.19).

ABCG4 représente le membre de la famille des ABCG ayant le plus haut degré d'homologie avec ABCG1. Il est fortement exprimé au niveau ARNm dans le cerveau, la moelle osseuse et dans le foie chez la souris, alors que chez l'homme, il l'est seulement dans le cerveau. Comme dans le cas d'ABCG1, l'expression du gène d'ABCG4 est notamment régulé par la présence d'oxystérols. Une déplétion en cholestérol par l'ajout de cyclodextrine induit une diminution de son expression, tout comme pour ABCA1 et ABCG1 (Lorkowski and Cullen, 2002; Yoshikawa et al., 2002; Yvan-Charvet et al., 2010).

2.1.5.4 Autres récepteurs aux lipoprotéines : TLR4 et FcγRIII

Dans la reconnaissance des LDLs modifiées, sont également impliqués certains TLRs et plus précisément le TLR4. Les TLRs appartiennent à la grande famille des PRRs et ont la particularité de reconnaître des PAMPs (ex. : LPS), mais aussi des DAMPs (ex. : mmLDLs, Ox-LDLs) (voir 1.1.1.2 Macrophages : origine, hétérogénéité et fonctions) (Howell et al., 2011; Miller et al., 2009; Miller et al., 2010; Miller et al., 2005). Il a notamment été observé qu'une déficience en TLR4 provoque une atténuation du développement du processus athéroscléreux chez des souris *ApoE*^{-/-} hyperlipidémiques (Bjorkbacka et al., 2004; Michelsen et al., 2004).

Le récepteur FcγRIII (Fc γ receptor III alias CD16) intervient, quant à lui, dans l'internalisation des complexes immuns de par la reconnaissance de la région Fc des IgG. Ces complexes immuns peuvent être formés par l'association d'auto-anticorps liés à des LDLs oxydées. Leur internalisation mènera alors à la formation de cellules spumeuses (Lopes-Virella et al., 1997). Il est intéressant de noter que ce récepteur n'est pas exprimé dans les macrophages humains THP-1 (Lopes-Virella et al., 1997).

2.2 Polarisation des macrophages dans les lésions athéroscléreuses

In vitro, plusieurs modèles de macrophages polarisés ont été mis au point et décrits (voir 1.1.2 Polarisation des macrophages). Néanmoins, la liste des macrophages polarisés *in vitro* n'est pas exhaustive. En effet, d'autres types de macrophages polarisés ont été découverts et caractérisés *in vivo*.

Ainsi, comme discuté précédemment (voir 1.1.2.1.3 Macrophages Mox), il semblerait qu'il existe d'autres classes de macrophages outre les macrophages M1 et M2, comme par exemple le phénotype Mox chez la souris (Fig. I.2.40). Chez l'homme, aucune étude n'a encore démontré la présence d'un tel phénotype (Kadl et al., 2010).

Une classe supplémentaire de macrophages a également été décrite chez l'homme: les macrophages HA-mac (ou MHem), riches en fer et détectés dans les plaques athéroscléreuses hémorragiques. Ces macrophages surexpriment CD163, ce qui permet d'augmenter leur capacité à phagocyter le complexe hémoglobine/haptoglobine, entraînant une augmentation de la sécrétion de l'IL-10, favorisant ainsi la différenciation des monocytes en macrophages M2, probablement à des fins de résorption de la lésion (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011).

Des macrophages humains exprimant CD68⁺CD14⁺ ont également été retrouvés au niveau des artères coronaires. Ils sont caractérisés par une plus grande expression de gènes pro-inflammatoires. Au contraire, les macrophages CD68⁺CD14⁻ sont présents au niveau des régions saines des artères et surexpriment des gènes décrits pour être

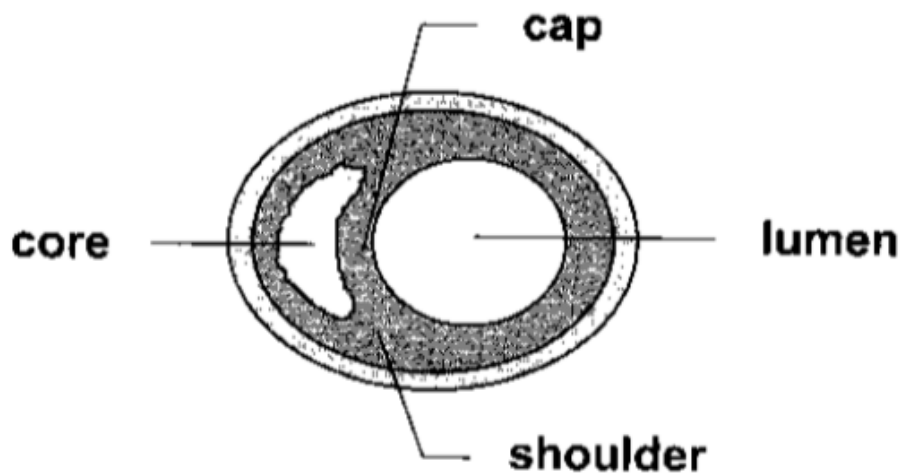


Figure I.2.41. Représentation schématique d'une coupe d'une plaque athéroscléreuse dans la crosse aortique.
(Pasterkamp et al., 1999)

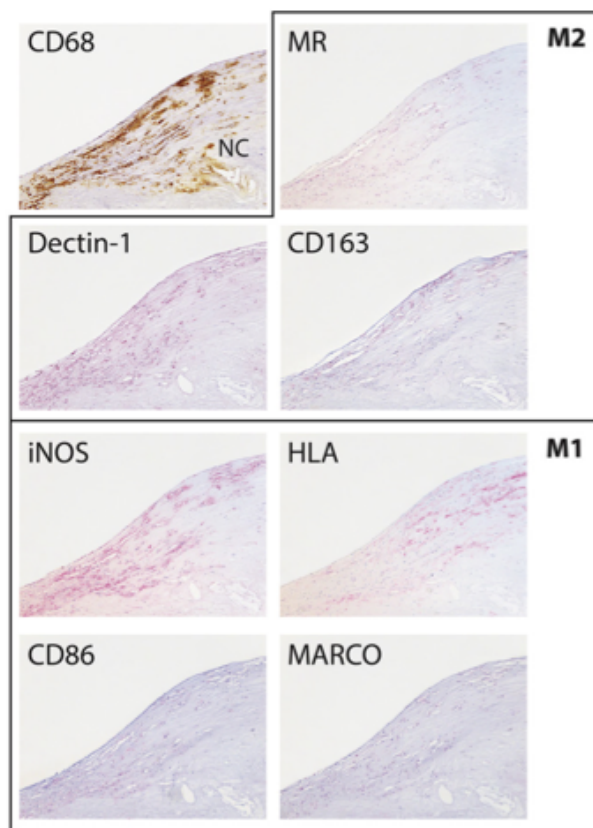


Figure I.2.42. Micrographies de coupes histologiques de plaques athéroscléreuses au niveau d'un des flancs (région dite « shoulder »), après marquage immunohistochimique.

Les macrophages situés dans la partie « shoulder » des plaques athéroscléreuses semblent être, de façon prédominante, des macrophages M1.

Les marqueurs M2 (au-dessus) utilisés sont MR (MRC1), la dectine-1 et CD163. Les marqueurs M1 (en-dessous) utilisés sont l'iNOS, HLA, CD86 et MARCO. Les macrophages sont mis en évidence via une détection de CD68 (brun).

Grossissement 100 x.

(Stöger et al., 2012)

impliqués dans le transport inverse du cholestérol, tels que ABCG1, et dans l'émigration des macrophages hors de la paroi vasculaire, tels que CCR7 (Brocheriou et al., 2011; Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011).

De même, les macrophages CD68⁺MR⁻ sont des macrophages pro-inflammatoires, retrouvés dans le cœur lipidique de la lésion et contiennent quelques grandes gouttelettes lipidiques. Les macrophages M2, CD68⁺MR⁺, chargés de plusieurs gouttelettes de taille inférieure, sont eux trouvés à la périphérie de la plaque (Bouhlef et al., 2007; Chinetti-Gbaguidi et al., 2011; Chinetti-Gbaguidi et al., 2015; Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011).

Notons tout de même qu'*in vivo*, le rôle des macrophages M2, dits anti-inflammatoires, dans le processus athéroscléreuse, n'est pas encore totalement compris. Ils seraient athéro-protecteurs via leur action inhibitrice des réponses pro-inflammatoires et leur rôle dans l'efférocytose des corps apoptotiques. Mais étant dépendants de l'IL-4, il semblerait qu'ils soient aussi pro-athérogènes dans les lésions, l'IL-4 étant probablement produite par les polymorphonucléaires neutrophiles ou les cellules NKT (« Natural Killer T »). En effet, ces macrophages dépendants de l'IL-4 surexpriment CD36, un des récepteurs « scavenger » responsables de l'internalisation de LDLs oxydées et donc de la formation de cellules spumeuses. La cytokine IL-4 induit aussi l'expression de métalloprotéinases de matrice, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, susceptible de fragiliser les lésions (Martinez et al., 2006; Mosser and Edwards, 2008; Pello et al., 2011; Thorp and Tabas, 2009).

Le comportement *in vivo* des macrophages polarisés, au sein des lésions athéroscléreuses, est décrit dans le paragraphe suivant.

2.2.1 Comportement dynamique des macrophages M1 et M2 dans les plaques *in vivo*

Les données se sont accumulées au cours des dernières années, mettant en évidence que le phénotype des macrophages présents au niveau des lésions variait dans l'espace et le temps au sein des lésions athéroscléreuses (pour une revue récente, voir (Liberale et al., 2017)). Par exemple, Stöger et al. (2012) ont montré, par immunohistochimie, sur du matériel humain provenant d'une endartériectomie, que les macrophages M1 seraient présents au sein des régions dites « épaules », qui sont plus enclines à la rupture. Tandis que les macrophages M2 seraient présents dans l'adventice et les régions stables de la plaque, plus riches en cellules (Figs. I.2.41-I.2.43) (Pasterkamp et al., 1999; Stoger et al., 2012). De plus, les macrophages M2 ont également été détectés, via le marqueur MRC1, dans des zones situées loin du cœur lipidique de la lésion (Chinetti-Gbaguidi et al., 2011).

L'équipe de Caligiuri a étudié le phénotype des macrophages en fonction de la progression des lésions, dans le modèle de souris *ApoE*^{-/-}, en suivant l'expression d'*Arg2* (marqueur M1) et d'*Arg1* (marqueur M2). Ils ont observé qu'au sein des lésions précoces, les macrophages, en faible nombre, sont en prédominance des macrophages M2, ce qui, d'après ces auteurs, pourrait signifier l'induction d'un mécanisme réparateur, visant à limiter la progression de la maladie. Cependant, au sein des lésions tardives, non seulement le nombre de macrophages a augmenté, mais ils sont, en plus, de manière prédominante des macrophages M1 (Fig. I.2.44) (Khallou-Laschet et al., 2010). Ces auteurs proposent l'hypothèse d'un « switch » progressif des cellules M2, présentes dans les lésions précoces, en cellules M1. Selon Pello et al. (2011), la capacité d'efférocytose

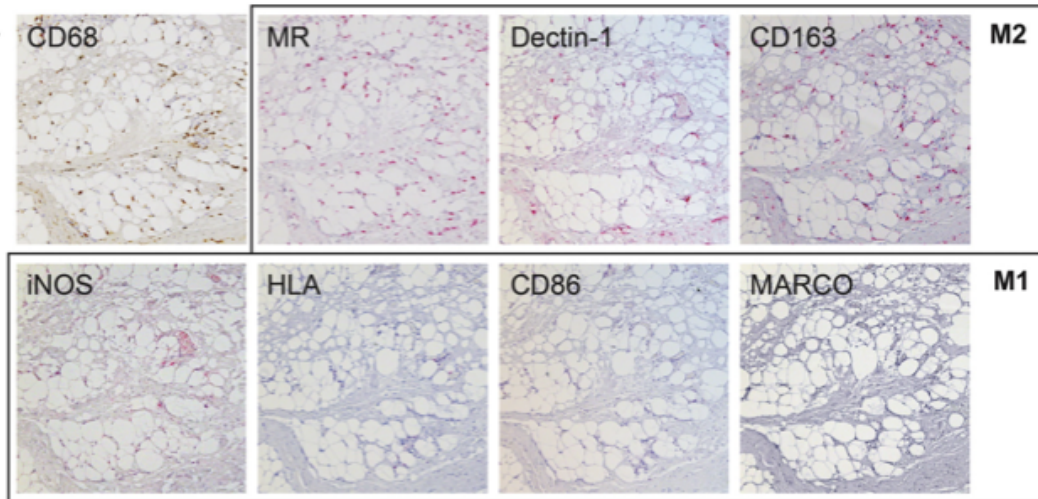


Figure I.2.43. Micrographies de coupes de tissus périvasculaires au niveau de l'adventice après marquage immunohistochimique.

Les macrophages de l'adventice semblent être, de façon prédominante, des macrophages M2.

Les marqueurs M2 (au-dessus) utilisés sont MR (MRC1), la dectine-1 et CD163. Les marqueurs M1 (en-dessous) utilisés sont l'iNOS, HLA, CD86 et MARCO. Les macrophages sont mis en évidence via une détection de CD68 (brun).

Grossissement 100 x.

(Stöger et al., 2012)

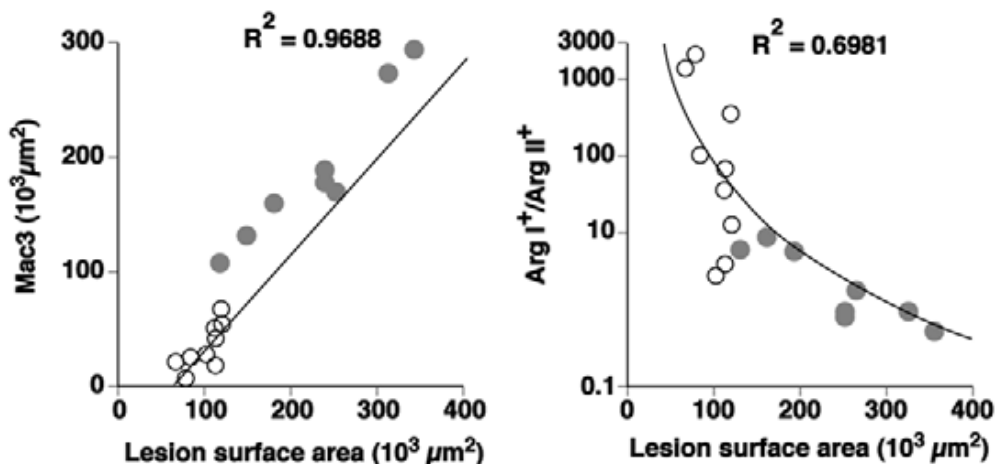


Figure I.2.44. Expression de marqueurs M1 et M2 dans les lésions athéroscléreuse de souris ApoE^{-/-} en fonction de l'évolution des lésions.

Dans leur étude, Khallou-Laschet et son équipe ont caractérisé les lésions précoces et avancées et plus particulièrement, le nombre et le phénotype des macrophages dans ces lésions.

Ils ont remarqué que le nombre de macrophages (mesure de MAC3; à gauche) était faible dans les lésions précoces, avec une prédominance de macrophages avec le phénotype M2 (à droite; expression d'ARG1). Par contre, dans les lésions plus étendues et plus avancées, le nombre de macrophages avait augmenté (à gauche). De plus, de manière plus intéressante, le phénotype M1 prédominait (à droite; expression d'ARG2), suggérant un changement ou « switch » phénotypique de M2 à M1. Afin de déterminer le phénotype des macrophages, l'expression de l'ARG2 (arginase-2) fut étudiée en tant que marqueur M1 et celle de l'ARG1 (arginase-1) en tant que marqueur M2.

Lésions chez des souris de 20 semaines (ronds blancs) et de 55 semaines (ronds gris).

(Khallou-Laschet et al., 2010)

des macrophages M2 pourrait devenir déficiente, entraînant une nécrose secondaire importante et un recrutement de nouvelles cellules inflammatoires. L'élimination inefficace des macrophages M1, s'accumulant, induirait ainsi une augmentation de la sécrétion de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires (ex. : IL-1 β , IL-12, TNF α , MCP-1), de MMPs (MMP2, MMP9), et donc la progression et déstabilisation de la plaque (Huang et al., 2012; Li et al., 2009; Pello et al., 2011; Thorp and Tabas, 2009). De plus, d'après Wolfs (2011), la présence de M-CSF ou de GM-CSF est un facteur à prendre aussi en considération. En effet, l'expression de M-CSF, constitutive, induit un phénotype M2 chez les macrophages, tandis que celle de GM-CSF, à l'inverse, induit un phénotype M1. Plus la plaque évolue, et plus la production de M-CSF et GM-CSF augmente à cause de stimuli inflammatoires ou de la présence d'Ox-LDLs par exemple. Mais le ratio entre ces deux facteurs est modifié et penche vers une prédominance de GM-CSF par rapport au M-CSF, entraînant l'induction d'un phénotype M1 chez les macrophages (Wolfs et al., 2011).

Signalons aussi qu'il existe plusieurs études décrivant le phénotype des macrophages dans des plaques athéroscléreuses en régression. Ces expériences ont notamment été réalisées avec le modèle murin Reversa (*Ldl-r^{-/-} ApoB^{100/100} Mtp^{fl/fl} Mx1Cre^{+/+}*), dans lequel l'hyperlipidémie peut être inversée par induction du « knock-out » conditionnel du gène codant pour MTTP (« microsomal triglyceride transfer protein », nécessaire pour l'assemblage des VLDLs) (voir 3.2.2 Modèles murins ciblés sur la régression des lésions : les souris Reversa) (Feig et al., 2011a; Feig et al., 2011b; Trogan et al., 2006). Une fois le gène invalidé, on observe une régression des plaques en quelques semaines avec une diminution du contenu en lipides et une augmentation de la production de collagène dans les plaques, en plus d'un changement de phénotype de la population des macrophages, les cellules M2 redevenant plus abondantes (Feig et al., 2011a). Bien que les mécanismes liés à l'augmentation des macrophages M2 et au changement de phénotype de M1 à M2 au sein des lésions ne soient pas encore compris, ces travaux sont en accord avec l'hypothèse d'un rôle réparateur associé aux macrophages M2.

A l'heure actuelle, les changements (ou « switch ») d'un phénotype à l'autre, observés par exemple dans les lésions athéroscléreuses, restent encore controversés.

Plusieurs hypothèses ont été proposées. En effet, selon certains auteurs, une même cellule serait capable de changer son phénotype en un autre en fonction des signaux du microenvironnement (Arnold et al., 2007; Crane et al., 2014). D'autres proposent que les macrophages devraient être considérés comme une population de cellules aux phénotypes différents et donc aux fonctions distinctes, à différentes étapes d'une réaction inflammatoire, c'est-à-dire que de nouveaux macrophages seraient, par exemple, recrutés au sein de la lésion en fonction des besoins et modifieraient donc la prédominance d'un phénotype par rapport à un autre (Nahrendorf et al., 2007).

Différentes études ont tenté de déterminer quelle hypothèse était à privilégier.

Certaines ont ainsi montré qu'il était possible d'observer simultanément la différenciation de monocytes Ly6C⁺ en macrophages M1 et de monocytes Ly6C⁻ en macrophages M2. De plus, la transdifférenciation de Ly6C⁺ M1 en Ly6C⁻ M2 serait également possible (Arnold et al., 2007; Crane et al., 2014).

Selon d'autres, les monocytes seraient recrutés à des moments différents pendant la réaction inflammatoire et ils rencontreraient donc des stimuli différents. Les macrophages acquerraient donc d'abord un phénotype M1, puis deviendraient M2 en phase de résolution (Arnold et al., 2007; Martinez et al., 2008). Cependant, des macrophages M2 ont été identifiés dans le cas d'un rein défectueux ou d'une blessure

dite « stérile », sans qu'il n'y ait détection de cytokines Th2 dans le microenvironnement (IL-4/IL-13). Selon les auteurs, ces macrophages dériveraient donc directement de macrophages M1 (Crane et al., 2014; Lin et al., 2009).

Enfin, *in vitro*, il a été montré que les monocytes humains sont capables d'acquérir un phénotype M1, puis de devenir des macrophages M2 suite à un changement de cytokines dans le milieu (Arnold et al., 2007; Italiani et al., 2014). D'autres études ont également montré qu'il était possible de reprogrammer des macrophages M2 afin qu'ils expriment des gènes M1, en les incubant avec des ligands des TLRs ou avec de l'IFN γ (Mylonas et al., 2009; Stout et al., 2005).

2.2.2 LDLs et polarisation des macrophages

Peu de données sont disponibles dans la littérature scientifique en ce qui concerne l'interférence des LDLs dans le processus de polarisation des macrophages. Plusieurs équipes indépendantes ont observé que les Ox-LDLs semblaient induire un phénotype M2 chez les macrophages. L'internalisation d'Ox-LDLs, par les macrophages, mène, en effet, à une augmentation de la concentration en oxystérols. Ceux-ci, en se liant aux LXRs (Liver X Receptors), les activent et ainsi promeuvent des réponses anti-inflammatoires que sont l'induction de l'efflux de cholestérol, l'inhibition de NF κ B, la répression de la production de cytokines pro-inflammatoires, de chémokines (ex. : CCL2) et de l'iNOS ((Ghisletti et al., 2007; Joseph et al., 2003), pour une revue, voir (Mantovani et al., 2009; Marathe et al., 2006)).

van Tits et collaborateurs ont aussi observé que des macrophages, en présence d'Ox-LDLs, affichent un phénotype anti-inflammatoire. Selon l'auteur, ce phénotype semble pertinent puisque les cellules M2 sont des macrophages exprimant un haut niveau de récepteurs de type « scavenger ». Ils seraient ainsi plus aptes à internaliser les Ox-LDLs. Et une plus expression plus élevée de récepteurs « scavenger » peut alors être associée à une plus grande capacité à former des cellules spumeuses. Mais les Ox-LDLs peuvent aussi induire des réponses pro-inflammatoires dans les macrophages M2, en présence de LPS. Cependant, dans leur manuscrit, van Tits et al. signalent que la capacité d'accumuler des LDLs oxydées par le cuivre n'a pas encore été étudiée chez les macrophages M1 et M2 (van Tits et al., 2011). Cette question sera abordée dans ce travail.

Groeneweg et son équipe ont également montré que des macrophages murins dérivés de précurseurs de la moelle osseuse, traités préalablement avec des Ox-LDLs, présentent une réponse inflammatoire plus marquée en présence de LPS (Groeneweg et al., 2006; van Tits et al., 2011). Cependant, cette observation n'exclut pas la possibilité d'une induction vers un phénotype M2 par les Ox-LDLs. Une hypothèse à vérifier serait qu'en réponse au LPS, les macrophages M2 modifieraient leur expression génique pour surexprimer des gènes pro-inflammatoires, menant les cellules vers un phénotype M1. Ces cellules phagocytaires seraient alors plus aptes au processus d'endocytose.

Isa et al. (2011) ont aussi évalué l'impact des Ox-LDLs sur les macrophages polarisés humains. Ils ont pu déterminer que les macrophages M2 étaient plus sensibles à la lipotoxicité induite par les Ox-LDLs, par rapport aux macrophages M0 et les monocytes (Isa et al., 2011).

Enfin, il a été montré qu'en fonction du degré d'oxydation des Ox-LDLs, ceux-ci pouvaient se lier aux complexes CD14-TLR4-MD2 ou CD36-TLR4-TLR6 (*in vitro*) et induire l'activation de la voie de signalisation impliquant IRAK4, MyD88 et d'autres

protéines de signalisation menant à l'activation de NFκB, et donc au phénotype M1 (Kim et al., 2011; Michelsen et al., 2004; Mullick et al., 2005; Rekhter et al., 2008).

Dans ce travail, nous aborderons la question de l'impact des Mox-LDLs (ou MpOx-LDLs) sur le phénotype des macrophages puisque qu'aucune étude n'a encore, à ce jour, été publiée sur ce sujet.

Enfin, il ne faut pas négliger que les Ox-LDLs circulant dans le sang ont également un impact sur les monocytes. En effet, en 2000, une étude a montré que les Ox-LDLs diminueraient l'expression de CCR2 au niveau des monocytes humains, en activant PPARγ. Cette activation serait médiée par des composants lipidiques des Ox-LDLs comme par exemple le 9-HODE et le 13-HODE, des métabolites de l'acide linoléique oxydé. CCR2 est important puisqu'il médie le recrutement des monocytes au niveau de sites de l'inflammation. La diminution d'expression de CCR2 pourrait donc avoir pour effet, selon les auteurs, d'empêcher la transmigration inverse des monocytes et donc de retenir les monocytes au sein de la lésion athéroscléreuse (Han et al., 2000). Fuhrman et al. ont également montré que les Ox-LDLs sont capables d'induire la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages via l'activation, par le 7β-hydroxycholestérol, du récepteur au M-CSF. Le 7β-hydroxycholestérol, ainsi que le 7-cétocholestérol, sont en effet des composants actifs des Ox-LDLs, induisant la différenciation des monocytes en macrophages (Fuhrman et al., 2008). Enfin, les travaux de Bekkering et al. ont mis en évidence qu'une incubation de monocytes humains avec des LDLs oxydées au cuivre, pendant 24 heures, induit la formation de macrophages au phénotype pro-inflammatoire. En plus de présenter une augmentation de la production d'IL-6, IL-8, IL-18, TNFα et MCP1, ces macrophages surexpriment également CD36 et SR-A et présentent une expression diminuée d'ABCA1 et ABCG1, augmentant leur capacité de formation de cellules spumeuses. L'induction du phénotype pro-inflammatoire serait médiée par une reprogrammation épigénétique se passant au niveau des histones, à savoir une augmentation de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 dans les régions promotrices des cytokines, chémokines et transporteurs impliqués (Bekkering et al., 2014).

Ainsi, la présence de stimuli dans le sang tels que les Ox-LDLs, pourrait donc peut-être déjà induire un engagement des monocytes vers un phénotype M1 ou M2. Cette question sera abordée dans la dernière partie de ce travail.

Il est donc avéré que les macrophages sont bien impliqués dès les premiers stades de l'athérosclérose. Ils jouent, à la fois, un rôle de résolution via l'expression de gènes anti-inflammatoires (M2) contribuant à la résorption de la lésion, et un rôle d'amplification de la maladie via l'expression de gènes pro-inflammatoires (M1). Mais le rôle éventuel que les lipoprotéines, et en particulier les LDLs modifiées, pourraient jouer dans la polarisation des macrophages, reste largement méconnu, ainsi que l'effet de la polarisation sur la capacité à former des cellules spumeuses.

3. ETUDE *IN VIVO* DE L'IMPACT DE LA POLARISATION DES MACROPHAGES SUR L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS ATHEROSCLÉREUSES

Bien que les études *in vitro* se justifient entre autres pour des raisons éthiques, elles présentent des limitations et l'utilisation de modèles animaux se révèle souvent indispensable afin de comprendre la maladie, son initiation, son évolution et ses conséquences, à un niveau plus systémique.

Le modèle *in vivo* le plus communément utilisé dans le cadre de l'athérosclérose est la souris, bien que les souris sauvages soient en général très peu disposées à développer spontanément des lésions athéroscléreuses. Ce choix s'explique pour des raisons multiples : le coût raisonnable des souris, la facilité de leur hébergement et des soins prodigués, la facilité de reproduction et de manipulation génétique (transfert d'un transgène, invalidation d'un gène ou son remplacement par le gène correspondant humain par exemple). De plus, dans les modèles murins d'athérosclérose, les lésions apparaissent et se développent rapidement dans un intervalle de temps relativement court de quelques mois (Tableau I.3.1) (Getz and Reardon, 2012; Jawien et al., 2004; Potteaux et al., 2007).

Cependant, il est nécessaire de garder en mémoire que plusieurs modèles murins d'athérosclérose requièrent des régimes riches en cholestérol et/ou lipides, considérés comme non physiologiques. De plus, la distribution des lésions athéroscléreuses ainsi que plusieurs paramètres influençant l'athérogenèse diffèrent entre l'homme et la souris. En effet, chez la souris, les lésions se développent principalement au niveau de régions privilégiées telles que la racine aortique, la crosse aortique et l'artère brachiocéphalique, tandis que chez l'homme, elles apparaissent au niveau des artères coronaires, carotidiennes et des vaisseaux périphériques (ex. : artère iliaque). Il est intéressant de noter que les souris *ApoE* x *Sr-b1* KO développent également de l'athérosclérose dans les artères coronariennes (Getz and Reardon, 2012). En plus de développer des lésions différemment de l'homme, il existe donc également des différences entre les modèles murins.

De plus, au contraire des individus souffrant d'athérosclérose chronique, les souris ne développent en général pas de cape fibreuse épaisse, caractéristique des lésions humaines. Leurs lésions athéroscléreuses sont donc peu enclines à se rompre, à l'inverse de chez l'homme. Ceci pourrait être expliqué par le petit diamètre de l'aorte murine (moins de 1 mm de diamètre), augmentant ainsi la tension superficielle, ce qui pourrait potentiellement empêcher la rupture de la plaque (Getz and Reardon, 2012; Jawien et al., 2004).

En plus de ces caractéristiques, les souris diffèrent de l'humain via leur profil lipidique : chez l'homme, 75 % du cholestérol plasmatique est transporté par les LDLs, au contraire de la souris « wild-type » chez laquelle le cholestérol est principalement transporté par les HDLs (Fig. I.3.1). De plus, cette dernière n'exprime pas la CETP (« cholesteryl ester transfer protein »), une enzyme plasmatique impliquée dans le transfert d'esters de cholestérol des HDLs aux VLDLs et LDLs (Getz and Reardon, 2012; Jawien et al., 2004). Ces caractéristiques contribuent donc à leur résistance au développement de lésions athéroscléreuses, en l'absence de régime riche en lipides ou de modification(s) génétique(s) (Getz and Reardon, 2012; Jawien et al., 2004). Nous avons également évoqué que pour la myéloperoxydase, il existe également des différences importantes entre l'homme et la souris (2.1.4.2.4.4 Rôle de la MPO dans l'athérosclérose).

Souris	Profil lipoprotéinique et caractéristiques principales	Utilisation dans la littérature
<p>Lésions induites par le régime alimentaire, riche en lipides (« Diet-induced »)</p>	<p>1) Régime athérogène (composition non décrite) : formation de lésions mais pas toujours observée. Augmentation de la mortalité des souris.</p> <p>2) Régime alimentaire riche en graisses (30 %), 5 % de cholestérol, 2 % d'acide cholique. → Après 5-6 semaines : développement de lésions avec cellules spumeuses, au niveau de la racine aortique. → 2 souches répondant au régime sont sélectionnées : C57BR/cdj et CBA/J : avec un régime normal, pas de lésions et taux de cholestérol plasmatique total = 100 mg/dl.</p> <ul style="list-style-type: none"> • C57BR/cdj : avec un régime riche en graisses, augmentation du taux de cholestérol plasmatique total (400 mg/dl) et développement de lésions (racine aortique). • CBA/J : augmentation du taux de cholestérol plasmatique total (200 mg/dl) et développement mineur de lésions aortiques. • Les 2 modèles : diminution du taux de HDLs plasmatiques. • MAIS régime toxique (infections respiratoires morbides et perte de poids). <p>3) Régime « Paigen » : modification du régime de Thompson. Il contient 15 % de graisses, 1,25 % de cholestérol et 0,5 % d'acide cholique. Un des plus utilisés aujourd'hui. → Après 14 semaines à 9 mois : présence de lésions (racine aortique), qui restent à un stade précoce le plus souvent (C57BL/6J > C57/LJ > DBA/2J = AKR/J = 129/J).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lésions très petites à 4-5 mois de régime (200 à 1000 microns²). • MAIS régime non physiologique car le contenu en cholestérol est extrêmement élevé par rapport au régime humain (0,05 – 0,15 %) et présence d'acide cholique. • L'équipe de Lusis a montré que ce régime était inflammatoire en lui-même (Liao 1993). 	<p>1) Equipe de Wissler (1968) : (Vesselinovitch and Wissler, 1968; Vesselinovitch et al., 1968)</p> <p>2) Equipe de Thompson (1969) : (Breckenridge et al., 1985; Roberts and Thompson, 1976; Thompson, 1969)</p> <p>3) Paigen (1985) : (Liao et al., 1993; Paigen et al., 1985a; Paigen et al., 1985b)</p>

<i>ApoE</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> • Lésions au niveau de tout le tronc artériel avec une prédilection au niveau de la racine aortique comme chez l'homme, au niveau de la courbe inférieure de la crosse aortique, des artères coronaires proximales et des embranchements des artères secondaires. • Ces souris présentent jusqu'à 5 fois plus de cholestérol plasmatique total par rapport à des souris WT, ainsi qu'une diminution de la concentration en HDLs d'environ 45 %. • Avec un régime de type « Western », le cholestérol plasmatique total augmente jusque 1000 à 2000 mg/dl (surtout des VLDLs, mais aussi une légère augmentation de LDLs). Ces souris sont caractérisées par une formation accélérée des lésions, avec une taille plus importante. Lorsqu'elles sont nourries 5 semaines sous ce régime, elles présentent des lésions 3 à 4 fois plus grandes que les souris <i>ApoE</i>^{-/-} nourries avec un régime normal. 	<p>(Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992) (Getz and Reardon, 2012; Khallou-Laschet et al., 2010; Nakashima et al., 1994; Palinski et al., 1994; Plump and Breslow, 1995; Qiao et al., 1994; Reddick et al., 1994; Roselaar et al., 1996; Smith et al., 1995; Tangirala et al., 1995; Zhou et al., 1996)</p>
<i>LDL-R</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> • Avec un régime normal: augmentation du taux de cholestérol plasmatique total de deux fois (250 mg/dl) par rapport à des souris WT, tandis que la concentration en triglycérides reste inchangée (120-135 mg/dl). Cependant, la concentration en LDLs augmente de manière importante (7,4 à 9 fois) chez les souris homozygotes, avec une légère augmentation du taux de VLDLs. Il n'y a pas d'effet important sur le taux de HDLs plasmatiques (augmentation de 1,3 fois chez les souris <i>LDL-R</i>^{-/-} par rapport aux souris WT). • Les lésions sont petites et précoces (présence de cellules spumeuses) avec un régime normal. • Avec un régime Paigen : concentration en cholestérol plasmatique total de 1500 mg/dl. • Avec un régime de type « Western » : concentration en cholestérol plasmatique total de 400 mg/dl. • Avec un régime riche en lipides, les lésions se développent au-delà du stade précoce, vers un stade intermédiaire fibro-prolifératif. 	<p>(Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al., 1994) (Babaev et al., 2000; Barcat et al., 2006; Hartvigsen et al., 2007; Linton et al., 1999; Teupser et al., 2003)</p>

Tableau I.3.1. Comparaison des modèles murins de base utilisés dans les études portant sur l'athérosclérose.

Dans ce chapitre, nous allons décrire quelques modèles murins incontournables dans le contexte de l'athérosclérose. Des études concernant la polarisation ont déjà été menées avec certains de ces modèles (*ApoE*^{-/-}, Reversa). Les autres modèles décrits également ici pourraient être très utiles, à l'avenir, pour comprendre l'impact de la polarisation des macrophages sur le développement des lésions *in vivo*.

3.1 Modèles murins de base afin d'étudier l'athérosclérose

Les souris C57BL/6 sont les plus susceptibles de développer de l'athérosclérose, lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisses, en cholestérol et contenant de l'acide cholique, au contraire des autres souches (Tableau I.3.1). C'est pour cette raison que ces souris, avec ce background génétique, sont généralement choisies dans les études *in vivo* portant sur l'athérosclérose.

Il a notamment été montré que les cellules endothéliales isolées à partir d'une aorte de souris C57BL/6 développent une réponse inflammatoire plus importante (expression de gènes inflammatoires tels que *Mcp-1* et *M-csf*) en réponse à une stimulation avec des mmLDLs (« minimally modified low-density lipoproteins »), par rapport à des cellules endothéliales de souris C3H/HeJ (Shi et al., 2000). De plus, nourries avec un régime riche en graisses, les souris C57BL/6 présentent une diminution de la concentration en HDLs plasmatiques, en comparaison avec des souris de la même souche nourries avec un régime normal (Paigen, 1995; Paigen et al., 1987).

Une fois le background choisi, les souris sont génétiquement modifiées afin de développer des lésions athéroscléreuses au plus proche de la situation humaine.

Dans la littérature, le modèle murin préférentiellement utilisé dans le cadre de l'athérosclérose est la souris *ApoE*^{-/-}, créée par Plump et al., et Piedrahita et al. en 1992 (Tableau I.3.1) (Bar et al., 2008; Getz and Reardon, 2012; Jawien et al., 2004; Khallou-Laschet et al., 2010; Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). Cette modification génétique est obtenue en invalidant le gène *ApoE* (dans des cellules souches embryonnaires murines électroporées) par recombinaison homologue avec un plasmide contenant un gène de résistance à la néomycine. Des souris chimériques ont ensuite été produites après injection des blastocystes porteurs du gène invalidé. Ces chimères sont capables de transmettre le gène *ApoE* invalidé à leur descendance. Les souris homozygotes *ApoE* KO ont été obtenues en croisant deux souris hétérozygotes (Jawien, 2012; Jawien et al., 2004; Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992).

L'avantage de ce modèle est le développement spontané de lésions athéroscléreuses, même lorsque les souris sont nourries avec un régime normal contenant 4 à 5 % de graisses. Leurs lésions sont similaires à celles de l'homme, en ce qui concerne les étapes de développement, les types cellulaires présents et la présence de lipoprotéines oxydées. Le taux de cholestérol plasmatique de ces souris est compris entre 300 et 500 mg/dl. Pour rappel, le taux de cholestérol plasmatique total des souris WT est compris entre 157 et 192 mg/dl (mâles et femelles, respectivement).

Lorsque les souris *ApoE*^{-/-} sont nourries avec une alimentation riche en graisses et en cholestérol (« Western-type diet » contenant 21 % de graisses, 0,15 % de cholestérol, pas de cholate), le taux de cholestérol plasmatique augmente jusqu'à plus de 1000 voire 2000 mg/dl et les lésions sont plus riches en cellules spumeuses. Avec un régime normal, les lésions athéroscléreuses précoces, c'est-à-dire constituées principalement de cellules spumeuses, sont détectables aux semaines 8 à 10, les lésions intermédiaires à la

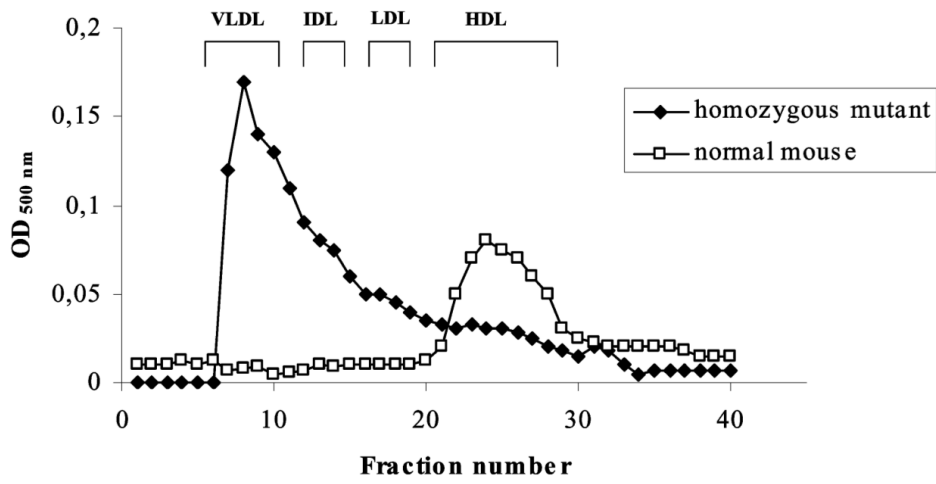


Figure I.3.1. Profil lipoprotéinique des souris WT et des souris *ApoE*^{-/-}.
 (Jawien et al., 2004)

15^e semaine (avec cellules musculaires lisses) et les lésions avancées (avec cape fibreuse, matrice extracellulaire et cellules musculaires lisses) sont observées à partir de la 20^e semaine. Bien entendu, le processus d'évolution des lésions est accéléré lorsque ces souris sont nourries avec une alimentation riche en lipides. Enfin, Rosenfeld et al. ont montré que les lésions de souris *ApoE*^{-/-} plus âgées sont susceptibles d'un certain degré d'instabilité, puisque des hémorragies peuvent être observées au niveau des plaques de l'artère brachiocéphalique (Getz and Reardon, 2012; Hayek et al., 1995; Jawien et al., 2004; Nakashima et al., 1994; Namekata et al., 2012; Palinski et al., 1994; Potteaux et al., 2007; Qiao et al., 1994; Reddick et al., 1994; Rosenfeld et al., 2000).

Le gène de l'*ApoE* code pour l'apolipoprotéine E, une glycoprotéine synthétisée principalement par le foie et le cerveau. Il a été montré qu'elle est impliquée dans des réponses anti-inflammatoires, notamment de par l'inhibition des voies de signalisation de l'IL-1 β et de l'IL-18 en empêchant la phosphorylation et donc l'activation d'IRAK-1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Elle est également capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en réduisant la production de l'IL-2 (Kawamura et al., 2007; Kelly et al., 1994). Elle est également majoritairement impliquée dans l'assemblage des particules lipoprotéiniques autres que les LDLs, et donc dans le transport du cholestérol vers le foie, via la reconnaissance des récepteurs à l'APOE et à l'APOB (Jawien et al., 2004; Potteaux et al., 2007).

Cependant, ce modèle n'est pas assez représentatif de la situation humaine puisque les souris *ApoE*^{-/-} présentent une augmentation importante du taux de VLDLs dans le sang et pas de LDLs (Fig. I.3.1). En effet, chez ces souris, le cholestérol plasmatique est principalement transporté par les lipoprotéines structurées par l'APOB48, contrairement à l'homme chez qui les LDLs, constituées d'APOB100, sont les principales lipoprotéines impliquées dans l'évolution des plaques athéroscléreuses (Getz and Reardon, 2012; Jawien et al., 2004). Nous reviendrons sur cette différence au point suivant.

Selon Getz and Reardon, la concentration élevée de VLDLs plasmatiques chez ces souris est due en grande partie à l'absence de l'APOE, ligand permettant la reconnaissance par les récepteurs LDL-R (qui en plus de reconnaître l'APOB100, reconnaît aussi l'APOE) et LRP (LDL-related protein), responsables notamment de l'élimination de ces particules dans le sang (Getz and Reardon, 2012).

De plus, au contraire de l'homme, le taux de cholestérol plasmatique total ne varie pas en fonction de l'âge et du sexe de la souris (Jawien et al., 2004).

Enfin, il a été montré qu'une transplantation de cellules de moelle osseuse de souris WT (*ApoE*^{+/+}) dans une souris *ApoE*^{-/-}, entraîne une diminution du processus d'athérosclérose, mais aussi du taux de lipides plasmatiques. Cette diminution de la concentration en lipides plasmatiques médiée par l'APOE pourrait donc, à elle seule, contribuer au ralentissement et à la régression de l'athérosclérose (Getz and Reardon, 2012; Linton and Fazio, 1999). A l'inverse, une transplantation de cellules de moelle osseuse de souris *ApoE*^{-/-} dans une souris WT (*ApoE*^{+/+}), entraîne une augmentation du processus d'athérosclérose au niveau de la racine aortique, indépendamment des effets observés sur les taux de lipides plasmatiques (Van Eck et al., 2000). Ces résultats indiquent que l'*ApoE* pourrait exercer certains effets indépendamment de ses effets sur les lipides. Son rôle antiathérogène pourrait être lié à son action dans l'efflux de cholestérol à partir des cellules spumeuses (Getz and Reardon, 2012).

En parallèle au modèle *ApoE*^{-/-}, plusieurs équipes utilisent également le modèle de souris *Ldl-r*^{-/-}, créé en 1993 par Ishibashi et al. (Tableau I.3.1) (Ishibashi et al., 1993). Il s'agit

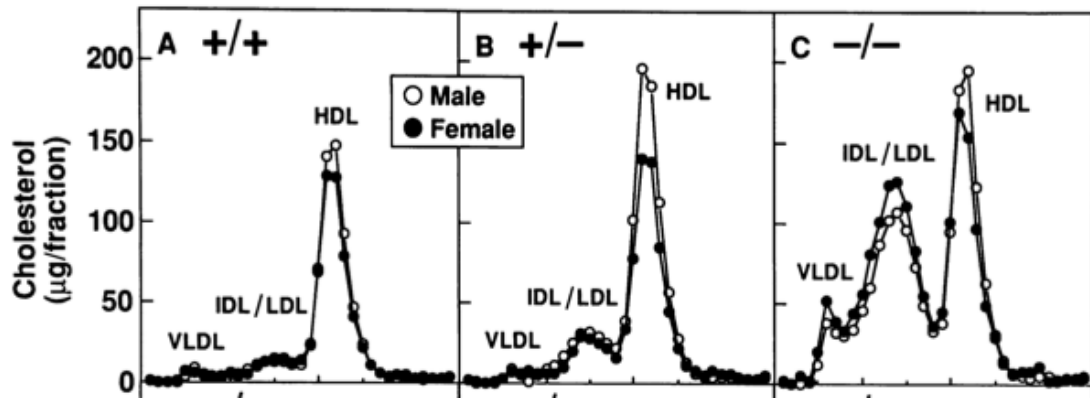


Figure I.3.2. Profil lipoprotéinique des souris WT (+/+) et des souris hétérozygotes (+/-) ou homozygotes (-/-) pour le gène *Ldl-r* invalidé.
Adapté de (Ishibashi et al., 1993)

d'un modèle *a priori* intéressant puisque comme pour les patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale, ces souris ne possèdent pas de LDL-R fonctionnel, empêchant ainsi la reconnaissance et donc l'élimination des lipoprotéines plasmatiques (Getz and Reardon, 2012; Ishibashi et al., 1993; Jawien, 2012; Jawien et al., 2004; Smith and Breslow, 1997). Ces souris présentent un taux moyennement élevé de LDLs et VLDLs dans le sang, sans modification de la concentration en HDLs : en effet, avec un régime normal, le cholestérol plasmatique total est de 200-250 mg/dl, de 600-800 mg/dl avec un régime riche en lipides (21 % de graisse, 0,15 % de cholestérol), et peut monter jusqu'à 1500 mg/dl avec le régime Paigen (15 % de graisse, 1,25 % de cholestérol et 0,5 % d'acide cholique) (Fig. I.3.2) (Getz and Reardon, 2012; Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al., 1994; Jawien et al., 2004; Potteaux et al., 2007; Smith and Breslow, 1997).

Un avantage par rapport au modèle *ApoE*^{-/-} est que l'expression du LDL-R par les cellules de la moelle osseuse, après transplantation de cellules *Ldl-r*^{+/+} dans des souris *Ldl-r*^{-/-} nourries avec un régime de type « Western diet », n'affecte pas d'elle-même le taux de lipides plasmatiques ou l'évolution des lésions, au contraire des souris *ApoE*^{-/-} (Getz and Reardon, 2012; Linton et al., 1999).

Cependant, ces souris développent peu d'athérosclérose, même avec un régime riche en lipides (Getz and Reardon, 2012; Jawien, 2012; Jawien et al., 2004; Potteaux et al., 2007; Smith and Breslow, 1997). De très nombreux régimes riches différents ont été utilisés, ce qui complique l'analyse comparative des différentes études publiées.

Il est donc nécessaire de combiner l'inactivation de ce gène avec des modifications affectant d'autres gènes impliqués dans le métabolisme lipidique par exemple.

3.2 Modèles murins ciblés

Sur base de ces deux modèles principaux créés, de nombreuses équipes de recherche ont entrepris de développer de nouveaux modèles afin de mieux se rapprocher de la pathologie humaine, mais aussi pour mieux comprendre le développement d'une lésion athéroscléreuse. Il existe notamment des modèles dans lesquels un gène est invalidé, un transgène humain est inséré et surexprimé ou un mutant conditionnel est créé, afin de, par exemple, mieux comprendre le métabolisme des lipides ou les effets de certaines thérapies sur la progression des lésions.

Vu la complexité du métabolisme des lipoprotéines, de très nombreux modèles murins ont été développés en vue de disséquer le rôle des différents acteurs impliqués tels que l'*ApoAIV*, *ApoAII*, *Srebp*, la lipase hépatique, la *Lcat* ou la *Cetp* (Escola-Gil et al., 2000; Fotakis et al., 2015; Fournier et al., 2000; Marotti et al., 1993; Mezdour et al., 1997; VerHague et al., 2013). De nombreux autres gènes intervenant dans l'athérogenèse ont aussi été ciblés, tels que des gènes impliqués dans le recrutement des monocytes (ex. : souris *Ldl-r*^{-/-} x *P-sélectine*^{-/-}, *Ldl-r*^{-/-} x *E-sélectine*^{-/-}) (Dong et al., 1998; Johnson et al., 1997), des gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol (ex. : souris *Abca1*^{-/-}, *Ldl-r*^{-/-} x *Abca1*^{-/-}, transplantation de cellules de moelle osseuse de souris *Abca1*^{-/-} x *Abcg1*^{-/-} dans des souris *Ldl-r*^{-/-} (Aiello et al., 2003; Francone et al., 2005; Yvan-Charvet et al., 2007) ou par exemple des gènes intervenant dans l'efférocytose (ex. : souris *Ldl-r*^{-/-} x *Erk5*^{-/-}) (Heo et al., 2014). Ces modèles dépassent le cadre de ce travail et nous nous focaliserons sur quelques modèles particulièrement pertinents (pour des revues, voir (Marschang and Herz, 2003) et (Getz and Reardon, 2012)).

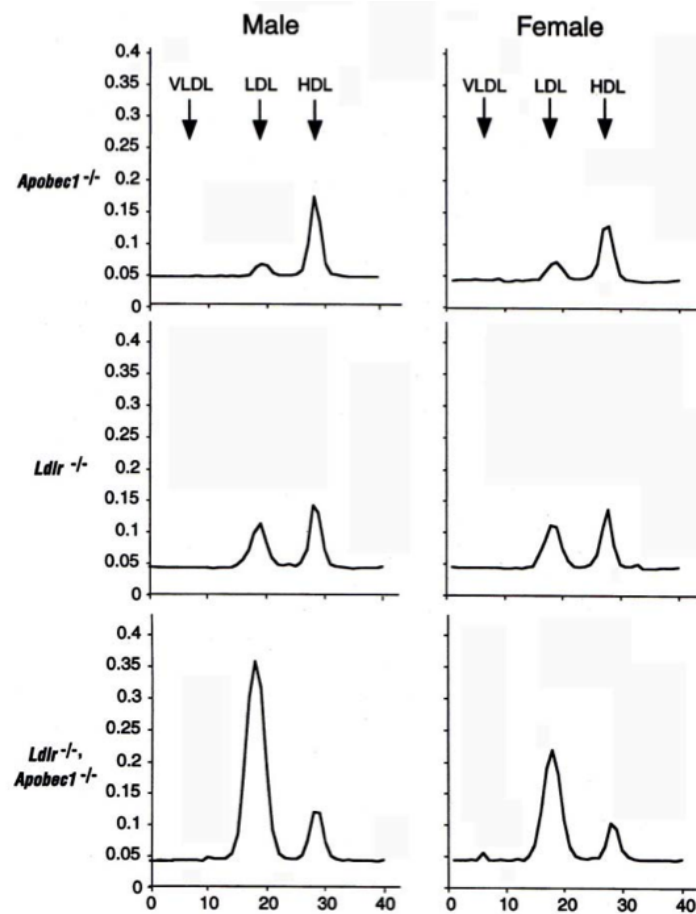


Figure I.3.3. Comparaison des profils lipoprotéiniques de souris mâles et femelles, *Ldlr*^{-/-}, *Apobec1*^{-/-} et *Ldlr*^{-/-} x *Apobec1*^{-/-}. (Powell-Braxton et al., 1998)

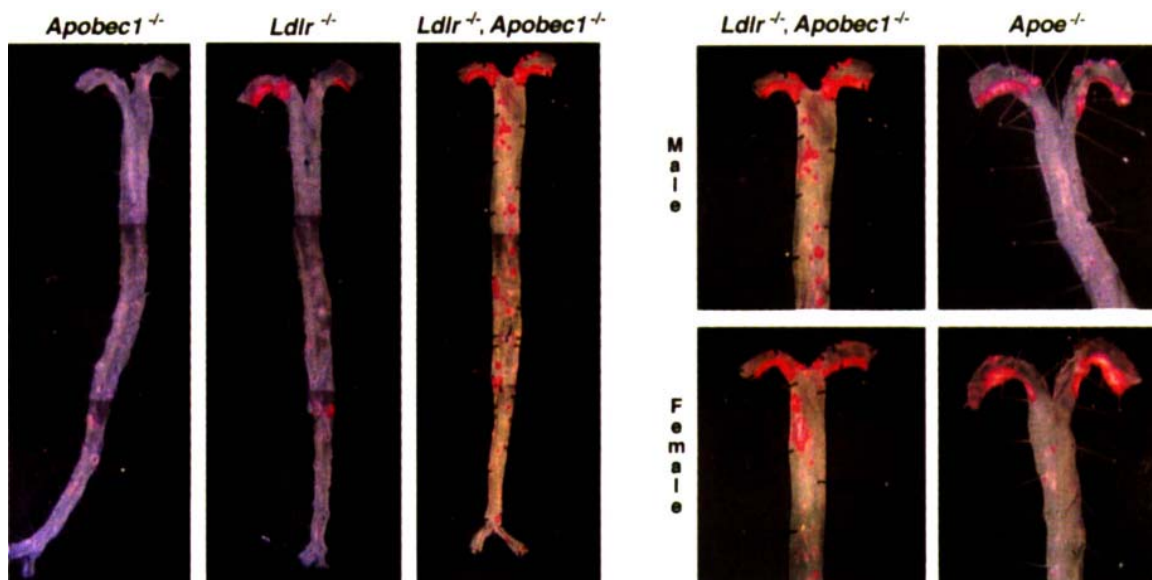


Figure I.3.4. Comparaison de la surface des lésions athéroscléreuse de souris *Apobec1*^{-/-}, *Ldlr*^{-/-} et *Ldlr*^{-/-} x *Apobec1*^{-/-} et de souris mâles et femelles *Ldlr*^{-/-} x *Apobec1*^{-/-} et *ApoE*^{-/-}. (Powell-Braxton et al., 1998)

3.2.1 Modèles murins avec des profils de lipoprotéines plus proches des profils humains

3.2.1.1 Souris *Ldl-r^{-/-} x Apobec^{-/-}*

Peu présentes dans la littérature récente, mais pourtant très pertinentes dans le cadre de l'athérosclérose, les souris « double knock-out » (DKO) *Ldl-r^{-/-} x Apobec^{-/-}*, créées par Powell-Braxton en 1998, développent des lésions spontanément avec un régime normal et présentent majoritairement un taux élevé de LDLs, avec un profil de lipoprotéines plus proche des profils humains (Fig. I.3.3) (Powell-Braxton et al., 1998).

En effet, chez la souris, les VLDLs produites par le foie sont majoritairement constituées d'APOB48, à cause de l'épissage de l'ARNm de l'*ApoB* via l'enzyme APOBEC-1 (« *ApoB* mRNA editing catalytic polypeptide-1 »), exprimée non seulement par les entérocytes, mais aussi dans le foie chez la souris (Davidson et al., 1995a; Davidson et al., 1988; Davidson et al., 1995b; Powell-Braxton et al., 1998). Cette enzyme catalyse la déamination d'une seule cytosine, avec la conversion de C en U, convertissant le codon correspondant à la glutamine-2153, en un codon STOP UAA (Davidson et al., 1995a), favorisant donc la production d'APOB48 au lieu d'APOB100 au niveau du foie, ce qui limite la transformation des VLDLs en LDLs.

Ces souris DKO, n'exprimant pas l'APOBEC-1, possèdent majoritairement des lipoprotéines structurées par l'APOB100, c'est-à-dire des LDLs. Cette modification induit donc de l'athérosclérose sévère, avec des lésions s'étendant de la crosse aortique jusqu'aux bifurcations iliaques (Fig. I.3.4). De plus, comme chez l'homme, ces souris présentent une disparité mâle/femelle en ce qui concerne le taux de LDLs plasmatiques et l'étendue des lésions (Figs. I.3.3-I.3.4 et Tableau I.3.2). La surface des lésions et le taux de cholestérol plasmatique augmentent aussi considérablement suite à un régime riche en lipides : après 9 semaines, la concentration en cholestérol augmente jusqu'à 1600 mg/dl et plus de 9 % de la surface de l'aorte des souris mâles est recouverte de plaques athéroscléreuses (Tableau I.3.3) (Powell-Braxton et al., 1998).

A l'heure actuelle, ce modèle murin représente celui le plus proche de la situation humaine. Cependant, assez étonnamment, il n'est toujours pas le modèle de premier choix lors d'études portant sur l'athérosclérose, les souris *ApoE^{-/-}* restant généralement la référence.

3.2.1.2 Souris *Ldl-r^{-/-} x Tg APOB100*

Les souris *Ldl-r^{-/-} x Tg APOB100*, développées en 1998 par l'équipe de Hobbs, ont des caractéristiques relativement similaires à celles des souris *Ldl-r^{-/-} x Apobec^{-/-}*. Ces souris expriment l'APOB100 humaine, induisant ainsi une augmentation importante de la concentration en LDLs plasmatiques (Fig. I.3.5). De plus, le contenu en cholestérol et triglycérides augmente de manière importante dans les LDLs de ces souris, par rapport à celui des souris WT et des souris *Ldl-r^{-/-}*. A l'inverse, la concentration en cholestérol dans les HDLs des souris *Ldl-r^{-/-} x Tg APOB100* diminue, en comparaison avec celle de souris WT et de souris *Ldl-r^{-/-}* (Fig. I.3.5) (Sanan et al., 1998).

De manière similaire aux souris *Ldl-r^{-/-} x Apobec^{-/-}*, les souris *Ldl-r^{-/-} x Tg APOB100* développent des lésions athéroscléreuses avec un régime normal. Ces lésions se développent au niveau de la racine aortique, mais aussi au niveau de la moitié postérieure de l'aorte, c'est-à-dire au niveau du segment abdominal de l'aorte et des

Table 1 Plasma lipid levels and atherosclerotic lesions in mice fed a chow diet

Genotype	n	Plasma total cholesterol (mg/dl)	Plasma total triglyceride (mg/dl)	Atherosclerotic lesions (% of the total surface area)
Male				
wild-type	7	192 ± 27	133 ± 18	0
<i>Apoe</i> ^{-/-}	8	558 ± 147	98 ± 33	5.1 ± 0.9
<i>Apobec1</i> ^{-/-}	21	118 ± 36 ^a	152 ± 42	0 ^d
<i>Ldlr</i> ^{-/-}	12	390 ± 75 ^a	140 ± 54	2.4 ± 1.8 ^d
<i>Ldlr</i> ^{-/-} <i>Apobec1</i> ^{-/-}	43	553 ± 133	208 ± 54 ^b	14.5 ± 3.8
Female				
wild-type	6	157 ± 49	126 ± 35	0
<i>Apoe</i> ^{-/-}	8	674 ± 70	108 ± 37	8.5 ± 6.4
<i>Apobec1</i> ^{-/-}	15	111 ± 37 ^a	91 ± 29 ^c	0 ^d
<i>Ldlr</i> ^{-/-}	8	262 ± 42 ^a	82 ± 15 ^c	0.2 ± 0.3 ^d
<i>Ldlr</i> ^{-/-} <i>Apobec1</i> ^{-/-}	33	441 ± 96	126 ± 36	7.4 ± 3.2

^aP < 0.001 versus *Ldlr*^{-/-}*Apobec1*^{-/-}. ^bP < 0.01 versus males from every other genotypes. ^cP < 0.03 versus *Ldlr*^{-/-}*Apobec1*^{-/-}. ^dP < 0.001 versus *Ldlr*^{-/-}*Apobec1*^{-/-}.

Tableau I.3.2. Tableau comparatif reprenant les concentrations en cholestérol et triglycérides plasmatiques totaux, ainsi que les surfaces des lésions athéroscléreuses, chez les souris *ApoE*^{-/-}, *Apobec*^{-/-}, *Ldl-r*^{-/-} et *Ldl-r*^{-/-} x *Apobec*^{-/-}, mâles et femelles, nourries avec un régime normal.

(Powell-Braxton et al., 1998)

Plasma lipid levels and atherosclerotic lesions in mice after high-fat diet									
Genotype	n	Plasma total cholesterol (mg/dl)		Plasma total triglyceride (mg/dl)		Atherosclerotic lesions (% of the total surface area)			
		pre-diet	HF diet	pre-diet	HF diet	56 days on diet		92 days on diet	
						chow diet	HF diet	chow diet	HF diet
Male									
<i>Apobec1</i> ^{-/-}	5	178±50	502±144	164±72	105±34	0	0	0	0
<i>LDL-R</i> ^{-/-} <i>Apobec1</i> ^{-/-}	6	629±128	1735±403	238±40	224±68	4.0±2.1	9.1±1.1	14.5±3.8	25.1±5.6
Female									
<i>Apobec1</i> ^{-/-}	5	118±72	370±57	118±39	76±13	nd	nd	0	0
<i>LDL-R</i> ^{-/-} <i>Apobec1</i> ^{-/-}	5	420±104	1610±158	169±32	111±18	0	0	7.4±3.2	20.2±3.8

Data are presented as mean ± s.d. for the indicated numbers of each genotype. nd = not determined. HF = high-fat diet

Tableau I.3.3. Tableau comparatif des concentrations en cholestérol et triglycérides plasmatiques totaux, ainsi que des surfaces des lésions athéroscléreuses, chez les souris *Apobec*^{-/-} et *Ldl-r*^{-/-} x *Apobec*^{-/-}, mâles et femelles, nourries avec un régime riche en lipides.

Adapté de (Powell-Braxton et al., 1998)

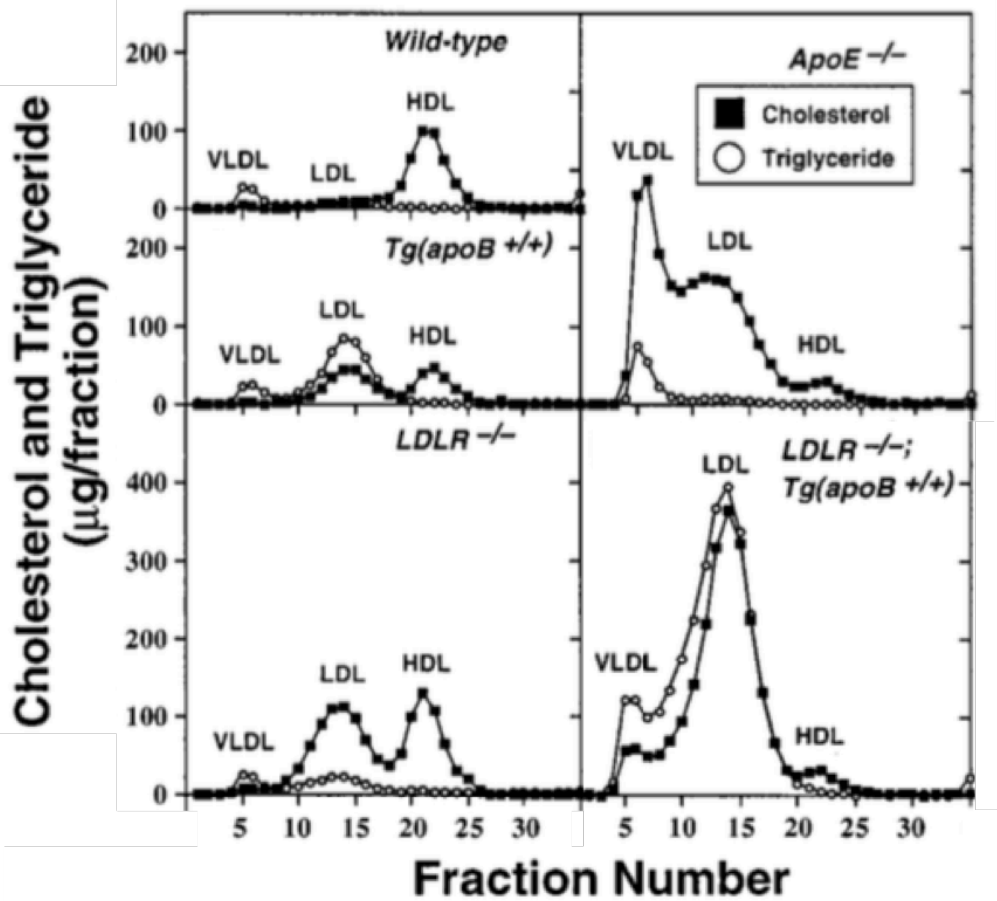


Figure I.3.5. Comparaison des profils lipoprotéiques de souris mâles WT, Tg *APOB100* humaine (Tg(*APOB*^{+/+})), *ApoE*^{-/-}, *Ldl-r*^{-/-} et *Ldl-r*^{-/-} x Tg *APOB100* (Tg(*APOB*^{+/+})). Adapté de (Sanan et al., 1998)

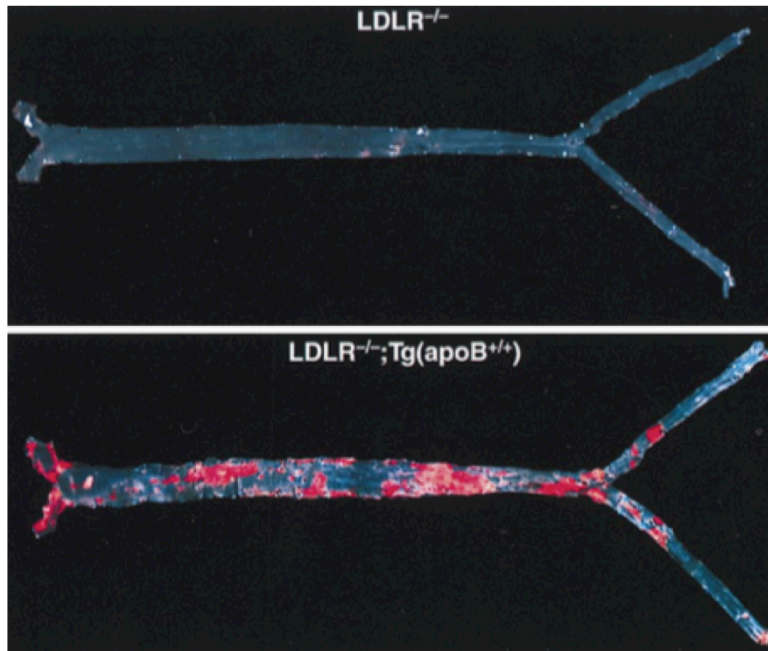


Figure I.3.6. Comparaison de la surface des lésions athéroscléreuses de souris *Ldl-r^{-/-}* et *Ldl-r^{-/-} x Tg APOB100* humaine (Tg (*APOB^{+/+}*)).
Adapté de (Sanan et al., 1998)

artères iliaques. Elles couvrent 15 à 20 % de la surface aortique (Fig. I.3.6) (Sanan et al., 1998).

Cependant à l'inverse des souris *Ldl-r^{-/-} x Apobec^{-/-}*, il ne semble pas y avoir de différences en ce qui concerne le développement des lésions chez les souris *Ldl-r^{-/-} x Tg APOB100* mâles et femelles. La comparaison des profils lipoprotéiniques entre mâles et femelles n'a pas été effectuée par l'équipe de Hobbs (Fig. I.3.5) (Sanan et al., 1998).

3.2.1.3 Souris transgéniques *CETP-APOB100* humaines

Les souris transgéniques exprimant à la fois la *CETP* et l'*APOB100* humaines constituent également un modèle d'intérêt pour les études portant sur l'athérosclérose et les lipoprotéines (Grass et al., 1995).

En effet, en plus d'exprimer l'*APOB100* humaine (voir points 3.2.1.1. et 3.2.12), ces souris expriment la *CETP* humaine. Pour rappel, il s'agit d'une protéine plasmatique, exprimée chez l'homme, qui permet l'échange d'esters de cholestérol provenant des HDLs avec les triglycérides des VLDLs/IDLs (Grass et al., 1995). Cette enzyme plasmatique est naturellement déficiente chez la souris et on ne détecte pas d'activité *CETP* dans le plasma des souris.

Avec un régime normal, ces souris présentent une activité de la *CETP* trois fois plus importante que chez l'homme. De plus, leur concentration en *APOB100* humaine plasmatique est similaire à celle de personnes normolipidémiques (Grass et al., 1995).

La concentration en cholestérol plasmatique chez les souris doublement transgéniques femelles augmente significativement de 67 % par rapport à des souris non transgéniques. Cet effet n'est cependant pas observé chez les mâles.

La concentration en HDLs plasmatiques diminue significativement chez les souris doublement transgéniques mâles et femelles, par rapport à des souris non transgéniques (Grass et al., 1995).

De manière intéressante, le pourcentage de cholestérol présent au sein des HDLs, LDLs et VLDLs des souris *CETP-APOB100* humaines est respectivement de 30, 65 et 5 %, ce qui est relativement similaire à ce qui est observé chez un individu humain normolipidémique.

Ce modèle se révèle donc intéressant pour l'étude des lipoprotéines, puisque leur distribution relative est comparable à ce qui est observé chez l'homme.

Cependant, à notre connaissance, la distribution des lésions athéroscléroseuses n'a pas été documentée (Grass et al., 1995). Comme le signalent ces auteurs, les souris transgéniques pour la *CETP* ou l'*APOB100* humaines, nourries avec un régime riche en graisses présentent une susceptibilité accrue à l'athérosclérose, mais Grass et al. (1995) n'ont pas suivi l'évolution des lésions dans leur modèle.

3.2.2 Modèles murins ciblés sur la régression des lésions : les souris Reversa

Comme précisé précédemment (voir 2.2.1 Comportement dynamique des macrophages M1 et M2 dans les plaques *in vivo*), les souris *Reversa (Ldl-r^{-/-} ApoB^{100/100} Mttp^{fl/fl} Mx1Cre^{+/+})* sont hypercholestérolémiques, mais de manière réversible. Ce modèle a été mis au point par l'équipe de E. Fisher, en 2011. Ces souris ont été nourries pendant 16 semaines avec un régime riche en lipides (« Western-type diet »). Au bout de ce laps de temps, du pIpC (« polyinosinic-polycytidylic acid ») a été injecté, permettant d'induire l'expression du transgène *Mx1-Cre*, inactivant ainsi le gène *Mttp* de façon conditionnelle dans le foie. La protéine MTTP (« microsomal triglyceride

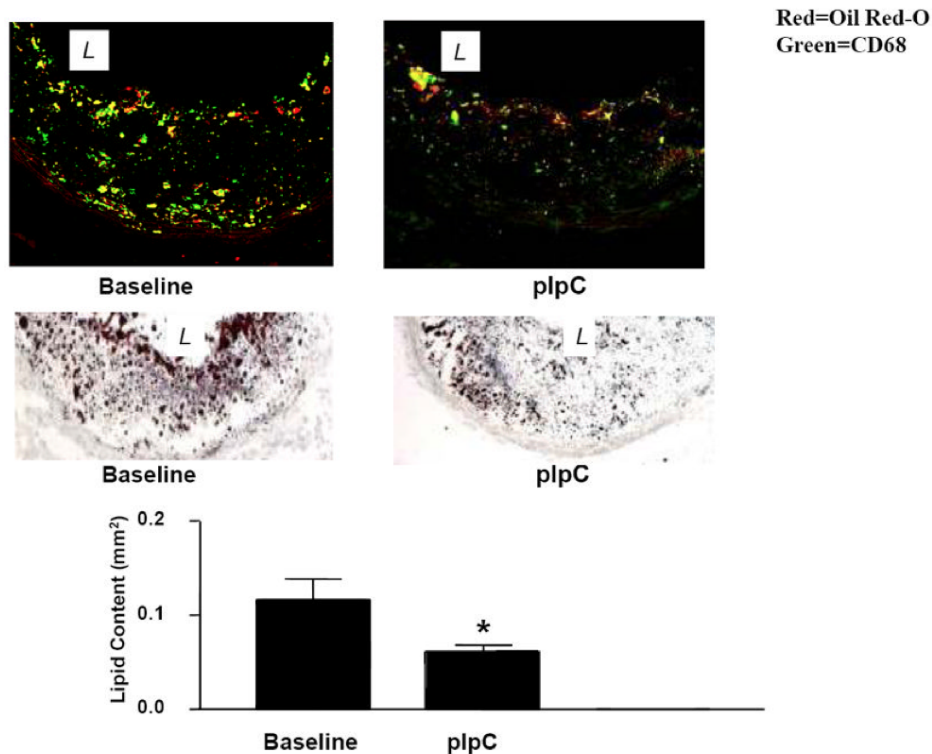


Figure I.3.7. Diminution du contenu en lipides (Oil Red O - Rouge) et en macrophages (cellules CD68+ - Vert) dans les lésions athéroscléreuses de souris Reversa après injection de pIpC et donc après inactivation de *Mtp*.

« Baseline » représente des souris Reversa n'ayant subi aucune injection de pIpC et donc exprimant toujours *Mtp*.

(Feig et al., 2011)

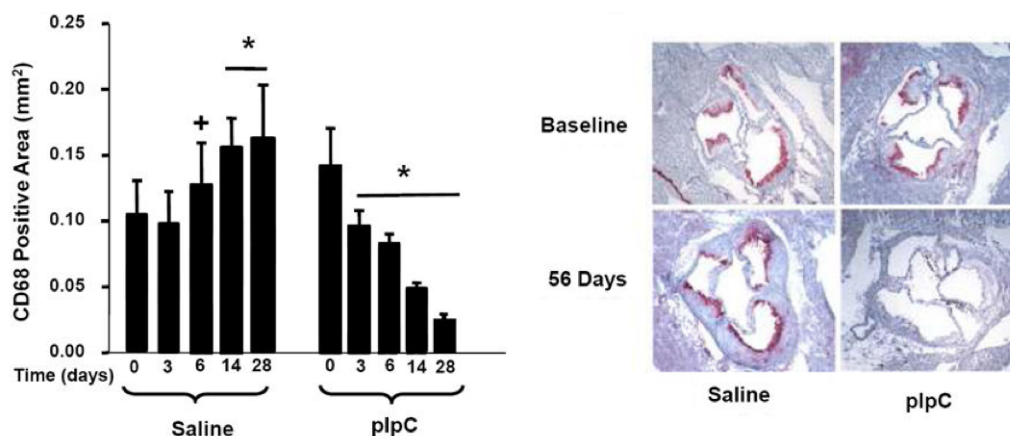


Figure I.3.8. Diminution de la présence de macrophages (cellules CD68+) dans les lésions de souris Reversa traitées avec du pIpC.

(Feig et al., 2011)

transfer protein ») participe à l'assemblage au sein des hépatocytes des lipoprotéines structurées par l'APOB100. L'inactivation du gène *Mttp* a pour conséquence de diminuer les niveaux de VLDLs et LDLs plasmatiques, avec une régression des plaques athéroscléreuses en quelques semaines. En effet, le contenu en lipides dans les lésions diminue de plus de 50 % et ce, en moins de 2 semaines (Fig. I.3.7). La taille des lésions diminue, mais de manière non significative. Mais c'est leur composition qui s'avère la plus modifiée : Feig et al. ont en effet observé une diminution de la présence des cellules CD68⁺ (marqueurs de monocytes et macrophages) dans les lésions et une diminution du contenu en lipides, ainsi qu'une augmentation du taux de collagène (Figs. I.3.7, I.3.8 et I.3.9). Le phénotype des macrophages est, de plus, passé de pro-inflammatoire (M1) à anti-inflammatoire (M2) (Fig. I.3.10) (Chistiakov et al., 2017; Feig et al., 2011a).

3.2.3 Modèles murins ciblés sur le métabolisme des HDLs

L'APOAI est l'apoprotéine principale des HDLs, lipoprotéines participant activement au transport inverse du cholestérol et contribuant donc à limiter la progression de l'athérosclérose. Pour cette raison, plusieurs équipes de recherche ont étudié le rôle de l'APOAI et ses effets en tant que protéine constitutive des HDLs notamment en surexprimant le transgène *APOAI* humaine dans des souris et en croisant ensuite ces dernières avec des souris *ApoE*^{-/-}. Ces souris présentent une concentration en HDLs deux fois supérieure à celle des souris WT. De plus, ces travaux montrent aussi que la surexpression de l'*APOAI* limite la progression du développement des plaques athéroscléreuses et induit donc une réduction de leur taille (Paszty et al., 1994; Plump et al., 1994). Ces effets ont également été observés par Crauwels et al., chez ces souris nourries avec un régime riche en lipides (Crauwels et al., 2003). Plusieurs modèles de souris KO ont également été développés pour étudier les effets de perturbations du métabolisme des HDLs (Fig. I.3.11) (pour des revues, voir (Hoekstra and Van Eck, 2015) et (Lee-Rueckert et al., 2016)).

En plus d'être précieux pour comprendre les mécanismes de l'athérosclérose, les modèles murins permettent également de tester de nouvelles thérapies développées afin d'empêcher ou bien d'inverser le développement des lésions.

3.2.4 Modèle murin d'hypercholestérolémie familiale par xénogreffe d'hépatocytes

L'hypercholestérolémie familiale (HCF) est une maladie autosomale dominante, caractérisée par une incapacité à éliminer les LDLs de la circulation en raison de mutations dans le gène codant pour le LDL-R. Cette maladie est donc caractérisée par une augmentation de la concentration en cholestérol plasmatique total et un développement rapide de l'athérosclérose, associé au développement de maladies cardiovasculaires (Goldstein and Brown, 1974; Hobbs et al., 1992; Hopkins et al., 2011). Les patients hétérozygotes répondent, en général, bien aux traitements médicamenteux actuels, au contraire des patients homozygotes (mutation sur les deux allèles du *LDL-R*), qui développent dès les premières décennies des maladies cardiovasculaires sévères. Ces patients ont donc souvent recours à des méthodes de traitement drastiques telles que l'aphérèse ou la transplantation de foie (Awan et al., 2008; Bissig-Choisat et al., 2015).

Afin de mettre au point des thérapies adaptées pour ces patients, Bissig-Choisat et al. ont développé un modèle HCF tout à fait original. Ils ont transplanté des hépatocytes d'une

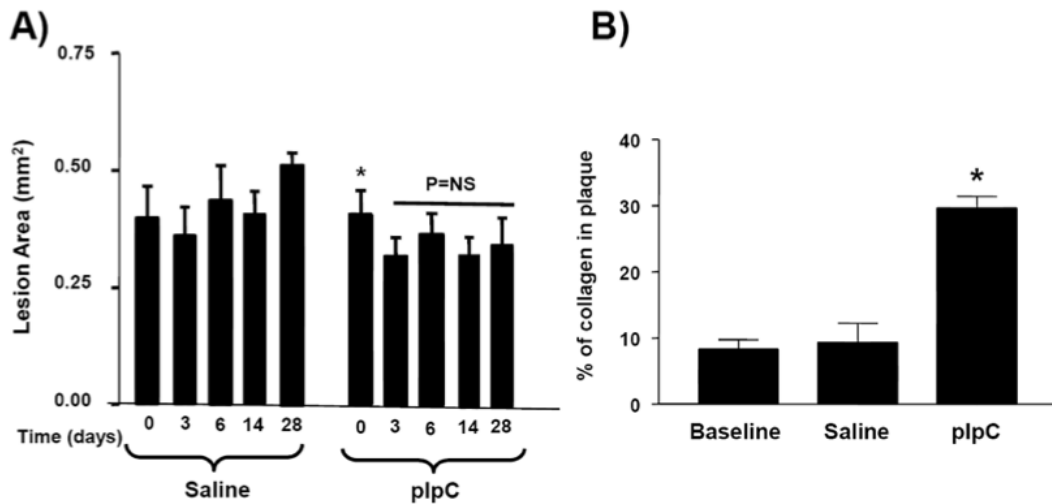


Figure I.3.9. Evolution des lésions athéroscléreuses de souris Reversa, après injection de pIpC.

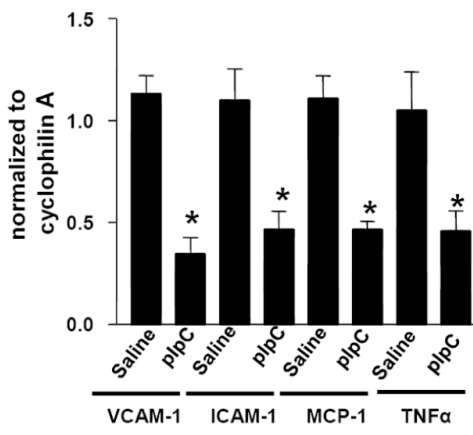
A. Similarité de la surface des lésions athéroscléreuses de souris Reversa, en absence (pIpC) ou non (Saline) de l'expression de *Mttp*.

B. Augmentation du collagène (en %) dans la plaque lorsque le gène *Mttp* est inactivé après injection de pIpC.

« Baseline » représente des souris Reversa n'ayant subi aucune injection de pIpC et donc exprimant toujours *Mttp*.

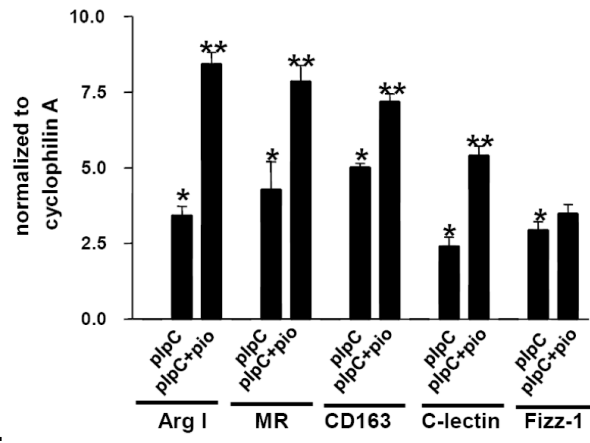
(Feig et al., 2011)

Expression de gènes pro-inflammatoires



A.

Expression des marqueurs M2



B.

Figure I.3.10. Expression de marqueurs inflammatoires (A) et M2 (B) de polarisation dans les macrophages de souris Reversa traitées.

En (A), sont comparées les souris traitées ou non avec le pIpC. En (B), sont comparées les souris traitées avec le pIpC en présence ou non de la pioglitazone (pio), un activateur de PPAR γ . En (B), les valeurs sont exprimées en « fold » par rapport aux valeurs obtenues sans traitement.

(Feig et al., 2011)

ApoA-I knockout

- Plasma HDL-C ↓↓↓
- Adrenal cholesterol ↓; adrenal function ↓
- Ovarian cholesterol ↓; female fertility =
- Atherosclerosis ↑ (LDLr KO on chow); plasma VLDL-C ↑
- Atherosclerosis = (LDLr KO on Western diet); plasma VLDL-C ↓
- Development of skin lesions containing lipid-filled macrophages
- Cholesterol in B and T cells of lymph nodes ↑

PLTP knockout

- Plasma HDL-C ↓↓
- Adrenal function ?
- Female fertility =
- PL and FC-rich lamellar particles ↑ (saturated fat-rich diet)
- Atherosclerosis ↓= (depending on the genetic background, diet and effects on plasma VLDL-C)
- Bone marrow deletion: atherosclerosis ↓↑; plasma VLDL-C ↓

ABCG1 knockout

- Plasma HDL-C =
- Adrenal function ?
- Female fertility =
- Pulmonary lipidosis
- Initial atherosclerosis ↑
- Advanced atherosclerosis ↓
- Similar effects in general KO's and bone marrow deletion

LCAT knockout

- Plasma HDL-C ↓↓↓
- Adrenal cholesterol ↓; adrenal function ↓
- Female fertility =
- Plasma TG ↑ and VLDL-C ↑
- Atherosclerosis =↓↑ (depending on the genetic background, diet and effects on plasma VLDL-C)



ABCA1 knockout

- Plasma HDL-C ↓↓↓
- Adrenal cortex cholesterol esters ↑
- Female fertility ↓; steroid hormones ↓; placenta malformations
- Atherosclerosis =; plasma VLDL-C ↓
- Bone marrow deletion: atherosclerosis ↑, blood leukocytes ↑
- Macrophage/Neutrophil deletion: atherosclerosis =
- Liver deletion: atherosclerosis = (LDLr KO), atherosclerosis ↑ (apoE KO)

SR-BI knockout

- Plasma HDL-C ↑↑
- Plasma VLDL-C ↑
- Adrenal cholesterol ↓; adrenal function ↓
- Female fertility ↓; abnormal embryo development
- Atherosclerosis ↑
- Severe cardiac dysfunction and premature death in apoE KO's
- Bone marrow deletion: initial lesions ↓, advanced lesions ↑

Figure I.3.11. Modèles murins permettant d'étudier les effets de perturbations du métabolisme des HDLs.

Effets de l'inactivation de l'*ApoA1*, de *Pltp* (« phospholipid transfer protein »), d'*Abcg1*, de *Lcat* (« lecithin cholesterol acyltransferase »), d'*Abca1* et de *Sr-bi* sur le métabolisme des HDLs, mais aussi sur la fonction surrénalienne, la fertilité des souris femelles et sur le processus d'athérosclérose.

(C = cholestérol ; PL = phospholipides ; TG = triglycérides ; KO = knockout)
(Hoekstra et al., 2015)

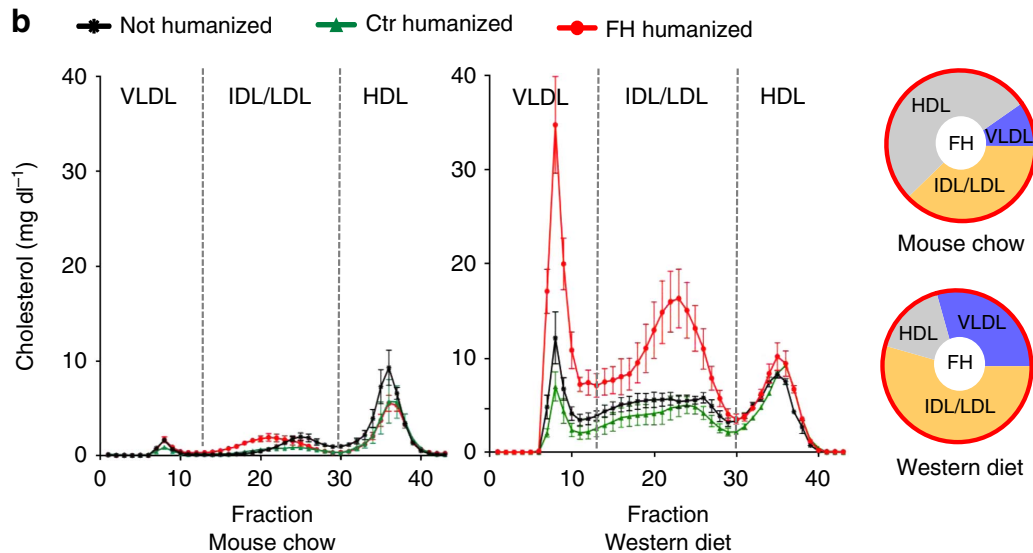


Figure I.3.12. Profils lipoprotéiniques de souris NH (« not humanized »), chimériques Ctr (« Ctr humanized ») et chimériques FH (« FH humanized »), nourries avec un régime normal (« Mouse chow ») (gauche) ou riche en graisses (« Western diet ») (droite). (Bissig-Choisat et al., 2015)

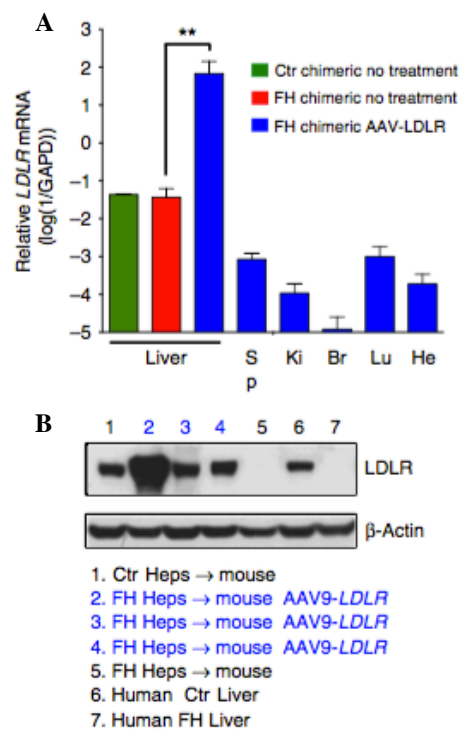


Figure I.3.13. Détection de l'expression du *LDL-R* dans le foie de souris chimériques FH (« FH chimeric ») après thérapie génique (en bleu) (a : RT-qPCR ; b : WB).

A. L'expression du *LDL-R* est observée, au niveau ARNm, dans le foie des souris FH traitées avec le vecteur AAV9-*LDLR*, mais pas dans les organes extra-hépatiques (Sp = spleen/rate, Ki = kidney/rein, Br = brain/cerveau, Lu = lung/poumon, He = heart/cœur).

B. L'expression du *LDL-R* est observée, au niveau protéique, dans le foie des souris FH traitées avec le vecteur AAV9-*LDLR*.

Les contrôles sont des souris chimériques ayant reçu des hépatocytes humains sains (« Ctr chimeric ») et des souris chimériques FH ayant reçu des hépatocytes d'une patiente souffrant d'HCF, non traitées par la thérapie génique.

Adapté de (Bissig-Choisat et al., 2015)

patiente de 7 ans souffrant d'HCF, dans le foie de souris immuno-déficientes FRG (*Fah*^{-/-}, *Rag2*^{-/-}, *Ilr2g*^{-/-}). Il s'agit de souris déficientes pour les cellules B, T et NK, ainsi que pour la « fumaryl acetoacetate hydrolase » (FAH). En absence d'activité de la FAH, des catabolites toxiques de la tyrosine s'accumulent au sein des hépatocytes murins. Ces modifications permettent ainsi une repopulation facilitée du foie de la souris par des hépatocytes humains (*FAH*^{+/+}) (Azuma et al., 2007; Bissig et al., 2007; Bissig-Choisat et al., 2015; Shafritz, 2007).

6 à 8 mois après transplantation, les souris sont nourries avec un régime de type « Western diet », riche en cholestérol et lipides. Après 4 semaines, on observe une accumulation de cholestérol dans les VLDLs et LDLs des souris non-chimériques (non-transplantées ou « not humanized » (NH)), des souris chimériques contrôles (Ctr) (transplantées avec des hépatocytes humains sains) et chimériques HCF (FH) (transplantées avec les hépatocytes de la patiente souffrant d'HCF), mais cette accumulation n'atteignant des niveaux pathologiques que dans les souris FH (47 % d'augmentation avec un régime normal et 84 % d'augmentation avec un régime de type « Western diet », par rapport à des souris NH) (Fig. I.3.12) (Bissig-Choisat et al., 2015).

Une fois le modèle caractérisé, ces auteurs ont tenté de rétablir un métabolisme lipidique normal, au moyen d'une thérapie génique utilisant un vecteur viral AAV (« adeno-associated virus »), portant le gène codant pour le LDL-R humain. 30 jours après injection dans la veine caudale, ils ont observé que les souris présentent une surexpression de l'ARNm du *LDL-R* humain, ainsi qu'une augmentation de la production de la protéine LDL-R humaine dans le foie (Fig. I.3.13). De plus, 4 semaines après injection, la concentration en cholestérol plasmatique total chute de 509 ± 58 à 179 ± 13 mg/dl, taux inférieur à celui des souris Ctr ou NH non-traitées (Fig. I.3.14 A). De même, la concentration en APOB diminue de 84 % et celle d'APOE de 95 %, sans que celle de l'APOAI (HDLs) n'ait été significativement modifiée (Fig. I.3.14 B). Le foie traité des souris FH s'est donc révélé à nouveau capable d'éliminer les lipoprotéines de type non-HDLs de la circulation sanguine (Bissig-Choisat et al., 2015).

3.2.5 Modèles murins exploitant la technique d'édition de génome CRISPR-Cas9

Enfin, pour terminer ces exemples de quelques modèles murins pertinents dans le contexte de l'athérosclérose, il nous fallait bien évidemment évoquer la technique d'édition de génome CRISPR-Cas9 (« clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated ») qui permet de modifier les génomes des cellules animales, rapidement et facilement (Fig. I.3.15). A titre d'exemple, signalons les travaux de Ding et al. (2014) qui ont ciblé le gène *Pcsk9* dans le foie de souris (Ding et al., 2014). Pour rappel, PCSK9 est une sérine protéase exprimée et sécrétée par les hépatocytes et les entérocytes. Elle régule la concentration en LDLs via une augmentation de la dégradation intracellulaire du LDL-R (Fig. I.2.37) (voir 2.1.5.1 Récepteurs aux LDLs natives (LDL-R)) (Banerjee et al., 2016; Duff and Hooper, 2011; Farnier, 2011; Horton et al., 2007). Ding et al. ont donc ciblé le gène *Pcsk9* en injectant un adénovirus possédant un plasmide co-exprimant Cas9 et un ARN guide CRISPR-*Pcsk9* à des souris C57BL/6. Après quelques jours, ils ont observé que le taux de mutagenèse de *Pcsk9* atteignait 50 % dans les hépatocytes. De plus, ils ont observé une diminution de la concentration plasmatique en PCSK9, ainsi qu'une diminution de 35 à 40 % de la concentration plasmatique en cholestérol total, par rapport à des souris contrôles (Fig. I.3.16 A). Ils ont également observé une expression plus importante de la protéine LDL-R au niveau des hépatocytes des souris CRISPR-*Pcsk9* par rapport aux souris

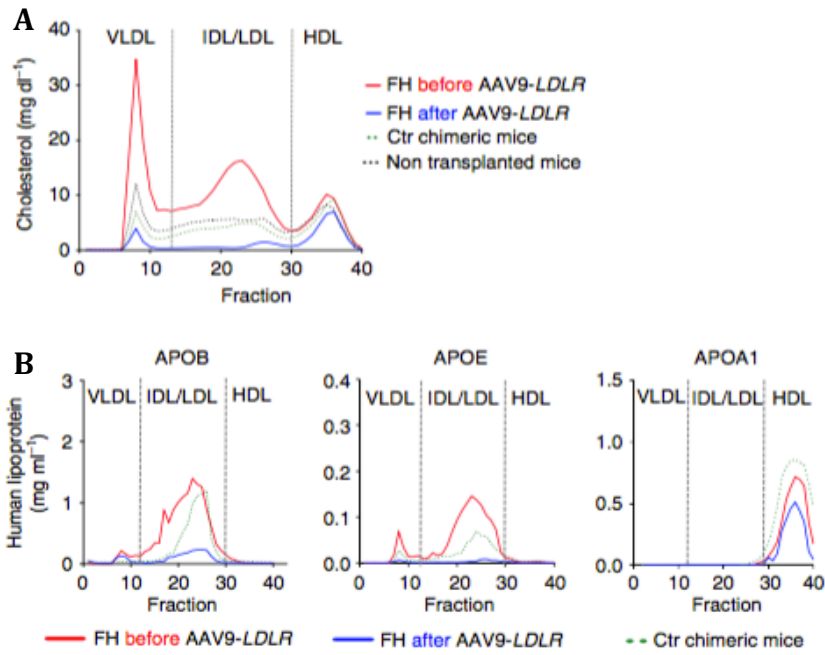


Figure I.3.14. Profils lipoprotéiques de souris chimériques FH avant (rouge) ou après (bleu) thérapie génique.

Les contrôles sont les souris « Ctr chimeric mice », c'est-à-dire transplantées avec des hépatocytes humains sains (points verts) et les souris non transplantées (NH ou « non transplanted mice ») (points noirs).

Adapté de (Bissig-Choisat et al., 2015)

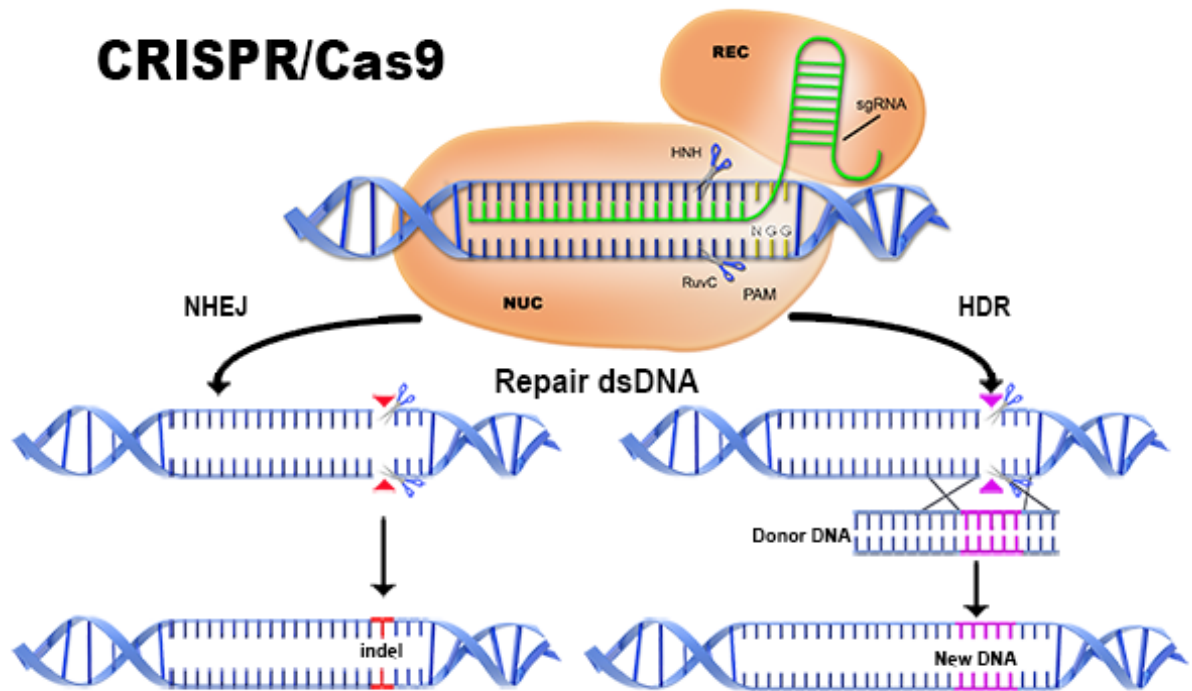


Figure I.3.15. Edition du génome par le système CRISPR-Cas9.

Cas9 est une nucléase associée à un ARN guide (sgRNA) (orange), qui, ensemble, ciblent un site du génome via l'hybridation de l'ARN guide avec une séquence complémentaire d'ADN d'environ 20 nucléotides précédant un motif NGG, lui-même reconnu par Cas9. Le système CRISPR-Cas9 génère ensuite une cassure double brin. Cette cassure peut être réparée par deux types de mécanismes de réparation : par le NHEJ (« non-homologous end joining ») ou par le HDR (« homology-directed repair »). Le mécanisme NHEJ résulte souvent en la création de petites insertions ou délétions, interrompant la fonction du gène. Le mécanisme de réparation HDR utilise, quant à lui, de l'ADN homologue, permettant l'introduction d'ADN donneur avec une séquence désirée dans l'ADN cible.

(<https://www.aati-us.com/instruments/fragment-analyzer/crispr/>)

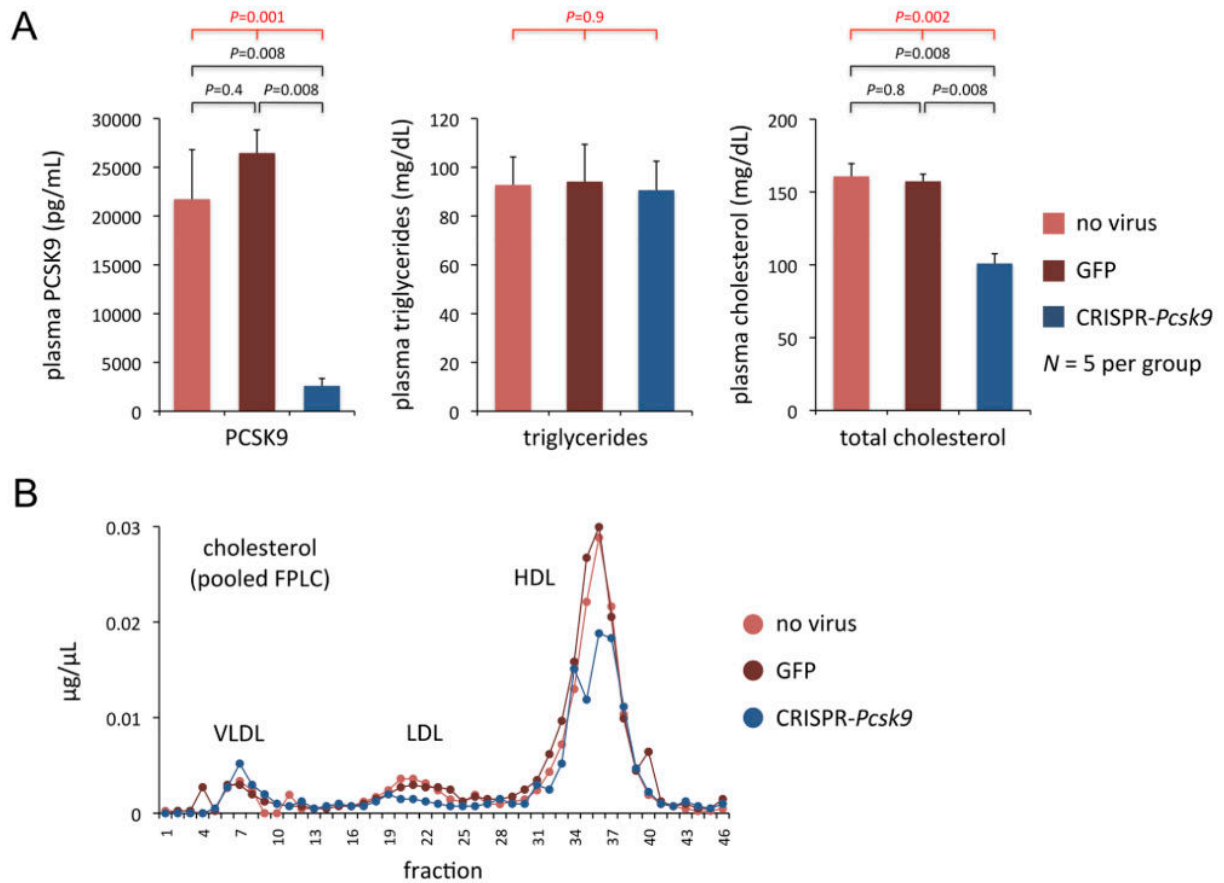


Figure I.3.16. Effets de l'édition du génome par CRISPR-Cas9 chez la souris.

A. Après quelques jours, la concentration plasmatique en PCSK9 et en cholestérol total diminue chez les souris CRISPR-*Pcsk9*, par rapport aux souris contrôles. La concentration plasmatique en triglycérides n'est pas affectée.

B. La concentration plasmatique en LDLs et HDLs diminue dans les souris CRISPR-*Pcsk9*, par rapport aux souris contrôles.

Adapté de (Ding et al., 2014)

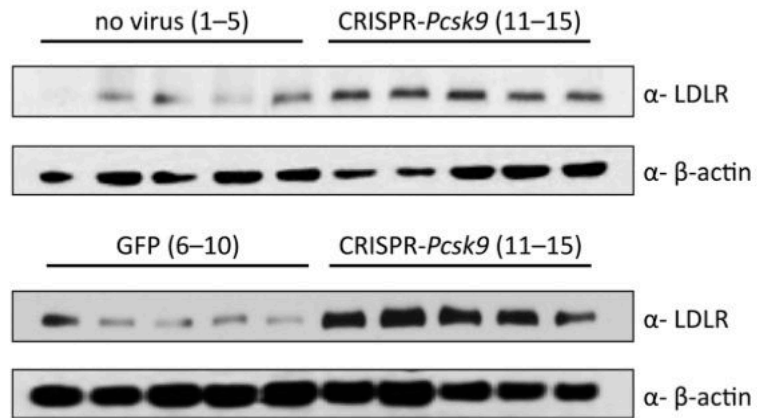


Figure I.3.17. Effets de l'édition du génome par CRISPR-Cas9 chez la souris.

L'expression du LDL-R augmente dans les hépatocytes des souris CRISPR-*Pcsk9*, par rapport aux hépatocytes des souris contrôles.

(n = 5 pour chaque groupe de souris)

Adapté de (Ding et al., 2014)

contrôles, ainsi qu'une diminution des concentrations plasmatiques de LDLs et HDLs (Figs. I.3.16 B et I.3.17) (Ding et al., 2014). Les effets sur le développement des lésions athéroscléreuses n'ont cependant pas été étudiés.

L'utilisation des modèles murins se révèle donc très pertinente, non seulement pour reproduire au mieux l'athérogenèse chez l'homme pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents, mais aussi dans les études concernant le développement de nouvelles thérapies, en particulier pour les patients pour lesquelles les thérapies existantes restent insatisfaisantes.

3.3 Modèle murin utilisé dans ce travail : les souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}

Le modèle de souris choisi pour notre étude est la souris DKO *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}. En effet, P2Y₆ est un récepteur purinergique, notamment exprimé au niveau des cellules endothéliales, des monocytes et des macrophages, mais aussi des cellules musculaires lisses vasculaires. De plus comme il le sera expliqué ci-dessous, l'incubation de macrophages avec de l'UDP, ligand de P2Y₆, induit une surexpression de certains marqueurs pro-inflammatoires.

Ce projet s'est inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de B. Robaye (IRIBHM, Gosselies), qui a une très longue expérience dans le domaine des récepteurs P2X et P2Y (Boeynaems et al., 2005). L'équipe étudie depuis plusieurs années l'implication du récepteur P2Y₆ dans le processus d'athérosclérose (Bar et al., 2008). Ce modèle se révèle intéressant en raison de l'implication de P2Y₆ dans les voies de réponse inflammatoire associées au développement des lésions athéroscléreuses. Puisqu'il a été montré que ces souris DKO développent moins d'athérosclérose que les souris *ApoE*^{-/-}, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'évaluer la possibilité d'un changement de phénotype des macrophages au sein de ces lésions (Garcia et al., 2014; Guns et al., 2010; Stachon et al., 2014).

3.3.1.1. Les récepteurs purinergiques P2Y et le récepteur P2Y₆

En 2002, Di Virgilio et Solini émirent l'hypothèse que les récepteurs purinergiques, P2Y et P2X, sont impliqués dans le processus d'athérosclérose, de par leurs rôles dans la modulation du tonus vasculaire, dans la régulation de la réponse inflammatoire et étant donné leur activité cardiorégulatrice (Di Virgilio and Solini, 2002).

Les récepteurs purinergiques, ou purinocepteurs, sont activés via la liaison des nucléotides extracellulaires tels que l'ATP, l'ADP, l'UTP (uridine triphosphate) et l'UDP. Ces ligands sont reconnus comme des DAMPS par les cellules inflammatoires, menant ainsi à une activation de l'inflammation (voir 1.1.1.2 Macrophages : origine, hétérogénéité et fonctions) (pour des revues, voir (Junger, 2011; Rubartelli and Lotze, 2007)). Les nucléotides extracellulaires exercent diverses actions biologiques telles que la modulation de la réponse inflammatoire, de l'activation de la réponse immunitaire ou la régulation de l'agrégation des plaquettes. Ces nucléotides sont libérés dans l'espace extracellulaire, par des cellules activées, endommagées ou en mort cellulaire, sous l'effet de différents facteurs de stress tels que l'hypoxie, les dommages tissulaires, les infections ou via une stimulation mécanique (Di Virgilio and Solini, 2002; Garcia et al., 2014; Hollopeter et al., 2001; Junger, 2011; Rubartelli and Lotze, 2007; Stachon et al., 2014).

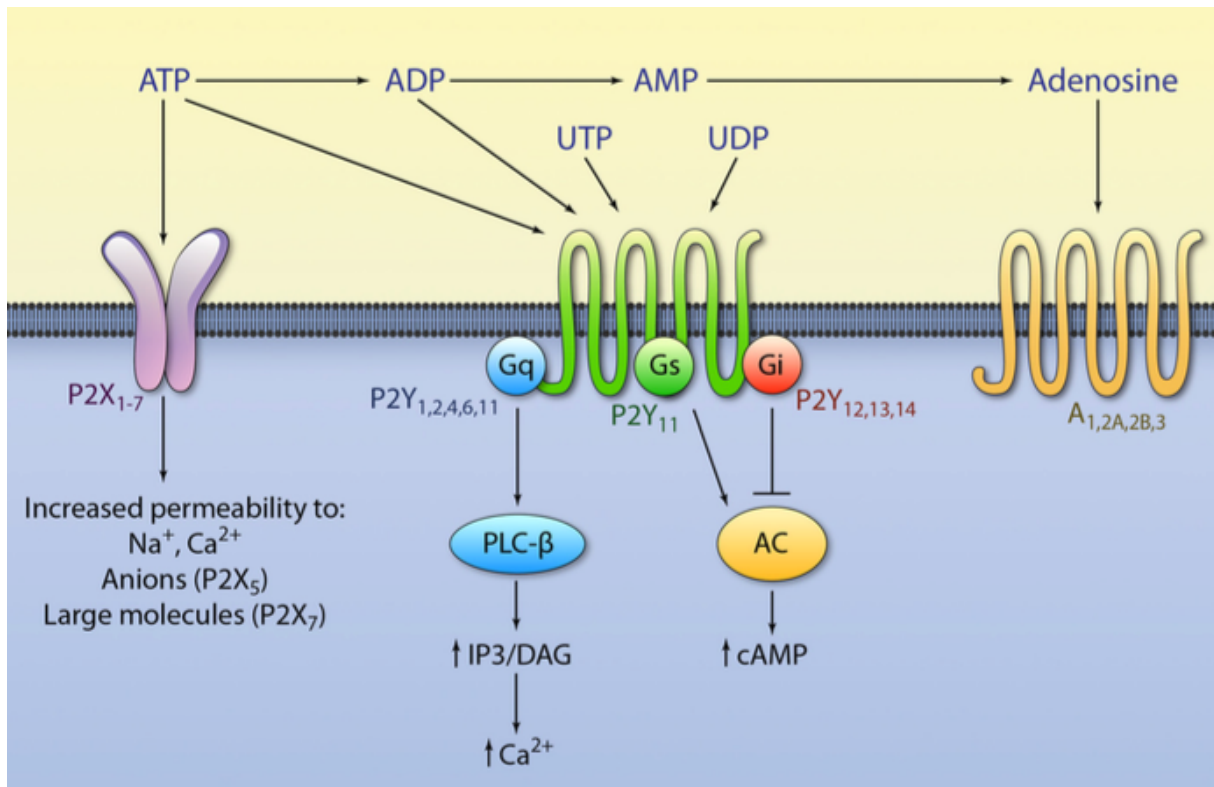


Figure I.3.18. Récepteurs P2X et P2Y.

Les récepteurs P2X sont constitués de deux sous-unités transmembranaires, permettant le passage de cations tels que le Na⁺ et le Ca²⁺, ainsi que d'anions et de grandes molécules.

Les récepteurs P2Y sont, eux, couplés à des protéines G. P2Y_{1,2,4,6} sont couplés à la protéine G_q et une fois, activés, ils permettent l'activation de la phospholipase-C-β (PLC-β) et donc le stockage subséquent de Ca²⁺ intracellulaire via la formation d'inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP₃). P2Y_{12,13,14} sont couplés à la protéine G_i et activés, ils induisent l'inhibition de l'adénylyl cyclase (AC). P2Y₁₁ peut être couplé soit à la protéine G_q, soit à la protéine G_s, ce qui a pour résultat d'augmenter la concentration en Ca²⁺ intracellulaire et en AMPc, respectivement.

(Yang and Liang, 2012)

Les purinocepteurs sont divisés en deux familles : les récepteurs P2X et P2Y, exprimés au niveau de la membrane plasmique (Fig. I.3.18) (Kunapuli and Daniel, 1998; Yang and Liang, 2012).

Les récepteurs P2X consistent en des canaux ioniques, reconnaissant l'ATP. Les récepteurs P2Y se composent de sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G. Les récepteurs P2Y sont divisés en huit sous-types : P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13} et 14. (Fig. I.3.19) (Guns et al., 2010; Junger, 2011; Van Der Giet et al., 2002; von Kugelgen, 2006; Yang and Liang, 2012).

Les travaux de Warny et al. en 2001, Cox et al. en 2005 et Bar et al. en 2008 ont permis de démontrer un rôle du récepteur P2Y₆, exprimé au niveau des monocytes humains (Cox et al., 2005; Warny et al., 2001) et des macrophages murins (Bar et al., 2008), dans la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires. Il a de plus été montré que la stimulation de macrophages J774 avec de l'UDP, ligand exclusif de P2Y₆ (Fig. I.3.20), entraîne une surexpression de l'*iNOS* et de l'*IL-6*, gènes pro-inflammatoires (Guns et al., 2010). Ces résultats corroborent donc ceux de Warny et al. (2001) et Cox et al. (2005), montrant une surexpression de l'*IL-8* lorsque des monocytes humains sont stimulés avec de l'UDP (Cox et al., 2005; Warny et al., 2001). D'autres cytokines ou chémokines telles que CCL1, CCL20, CXCL2 et CXCL5, ainsi que la protéine d'adhérence VCAM-1 sont également sécrétées ou exprimées par les cellules endothéliales et les cellules dendritiques, les monocytes, les éosinophiles et les neutrophiles, de par l'activation du récepteur P2Y₆ (Bar et al., 2008; Ben Yebdri et al., 2009; Ferrari et al., 2000a; Ferrari et al., 2000b; Stachon et al., 2014; Uratsuji et al., 2012).

En plus d'observer la présence de récepteurs P2Y dans les lésions athéroscléreuses, Guns et al. ont pu mettre en évidence une implication de P2Y₆ dans l'athérosclérose. Son expression est augmentée pendant le développement des plaques mais aussi au niveau des macrophages spumeux ou non (Garcia et al., 2014; Guns et al., 2010).

P2Y₆ semble également jouer un rôle dans la relaxation de l'aorte dépendante des cellules endothéliales et dans la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires, en réponse à l'UDP (Bar et al., 2008).

3.3.1.2. Souris *P2y6*^{-/-} et souris *P2y6*^{-/-} x *ApoE*^{-/-}

Afin d'étudier le rôle du P2Y₆ dans des conditions physiopathologiques telles que l'athérosclérose et l'hypertension, une souris déficiente pour *P2y6* a ainsi été créée par l'équipe de B. Robaye en 2008 (Fig. I.3.21) (Bar et al., 2008).

Les souris *P2y6*^{-/-} ont ensuite été croisées avec des souris *ApoE*^{-/-} hyperlipidémiques à l'IRIBHM à Gosselies. Ces souris DKO voient la taille de leurs lésions réduites, comparativement aux souris *ApoE*^{-/-} (résultats non publiés), ce qui est en accord avec les données de Stachon et al. (Stachon et al., 2014). Ces résultats seront discutés dans la partie Discussion de ce travail, en lien avec nos résultats concernant l'étude de l'impact de l'inactivation de *P2y6* sur la polarisation des macrophages dans les lésions athéroscléreuses de souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}.

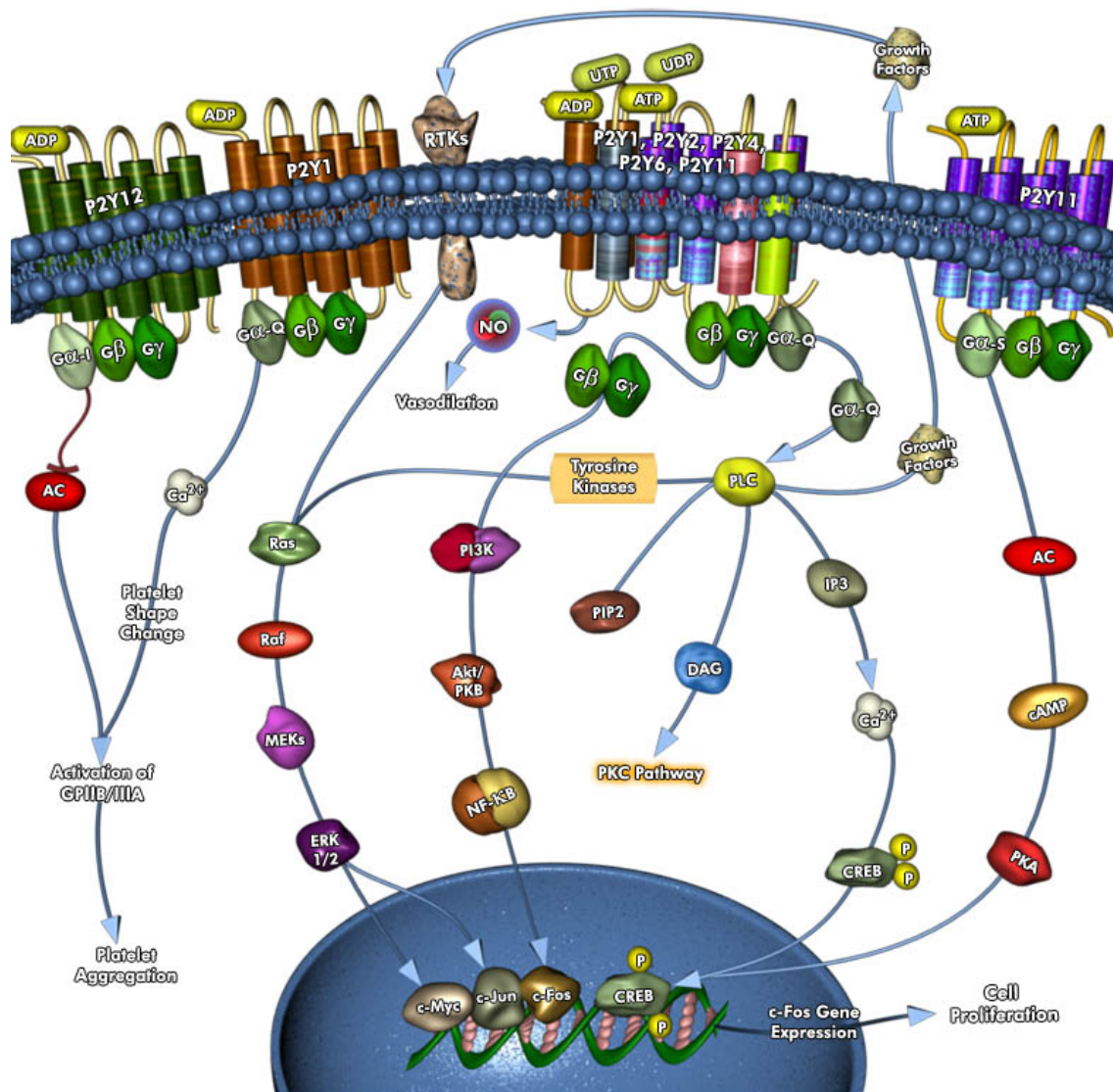


Figure I.3.19. Récepteurs purinergiques P2Y et voies de signalisation associées.

Il existe 8 sous-types de récepteurs purinergiques P2Y : P2Y₁, 2, 4, 6, 11, 12, 13 et 14. Ils sont exprimés de façon ubiquitaire et sont impliqués dans des mécanismes variés tels que la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la cicatrisation tissulaire, l'apoptose ou la neurotransmission (Hou et al., 2000).

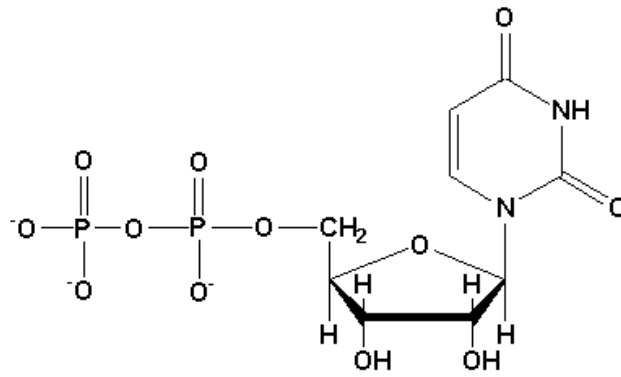
Ils peuvent être activés via un nucléotide extracellulaire ou une combinaison de ces nucléotides : P2Y₁ est activé par l'ADP, P2Y₂ par l'ATP et l'UTP, P2Y₄ par l'UTP, P2Y₆ par l'UDP, P2Y₁₁ par l'ATP, P2Y₁₂ par l'ADP et P2Y₁₄ (non représenté ici) par l'UDP-glucose, -galactose, -acide glucuronique, et -N-acétylglucosamine (Burnstock and Boeynaems, 2014; Cattaneo, 2015; Chambers et al., 2000; Lazarowski and Harden, 2015).

L'activation de P2Y₁₂ inhibe l'action de l'adénylyl cyclase (AC), tandis que P2Y₁ induit la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire (Kellerman, 2002). Ensemble, activés par l'ADP, ils induisent l'agrégation des plaquettes via l'activation de GPIIb/IIa (glycoprotéine-IIb/IIa) qui se lie au fibrinogène (Cattaneo, 2015; Nicholas, 2001). P2Y₁₁ induit à la fois l'activation de PLC (phospholipase-C) et de AC (Kellerman, 2002).

En cas de stress hypoxique ou dans certaines conditions de « shear stress », les cellules endothéliales produisent de l'ATP et de l'UTP qui se lient à P2Y₁, P2Y₂ et parfois P2Y₄, induisant alors la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, mais induisant aussi la production de NO (oxyde nitrique) et donc une vasodilatation (Burnstock, 2002; Burnstock and Dale, 2015).

De plus, comme cité précédemment, les récepteurs P2Y sont impliqués dans la prolifération cellulaire. En effet, le cluster des récepteurs P2Y₁, 2, 4, 6 et 11, au moyen des protéines G, activent PLC, ce qui induit la formation d'inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) à partir de phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate (PIP2). IP3 stimule la libération de Ca²⁺ intracellulaire et DAG active PKC (protéine kinase-C), ce qui a pour conséquence une phosphorylation et donc activation de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire. De plus, les facteurs de croissance (« growth factors ») produits suite à l'activation des récepteurs P2Y, induisent également l'activation des RTKs (récepteurs aux tyrosine kinases), activant ainsi la voie des MAPK qui favorise la prolifération des cellules. De même, la voie PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) est activée via la sous-unité β des protéines G dissociée du cluster P2Y₁, 2, 4, 6, 11, activant ainsi NF-κB. L'activation de P2Y₁₁ par l'ATP induit également la prolifération cellulaire, en activant l'AC et donc en induisant la libération d'AMPc qui active ensuite la protéine kinase-A (PKA). Cette dernière est capable de phosphoryler des protéines telles que CREB (Burnstock and Boeynaems, 2014; Burnstock and Dale, 2015; van der Weyden et al., 2000).

(<https://www.qiagen.com>)



Uridine diphosphate (UDP)

Figure I.3.20. Molécule d'UDP.

(<http://oregonstate.edu/dept/biochem/hhmi/hhmiclasses/bb450/winter2002/molex/udp.htm>)

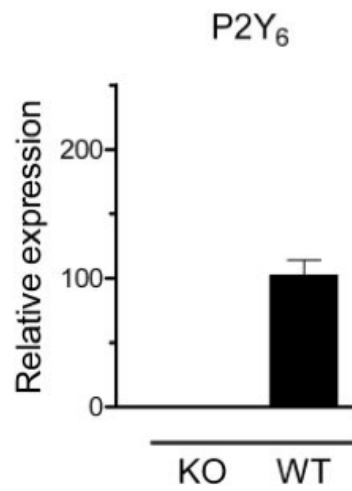


Figure I.3.21. Expression du récepteur $P2Y_6$, au niveau ARNm, dans les crosses aortiques de souris WT et souris KO pour $P2Y_6$.

Adapté de (Bar et al., 2008)

Objectifs de travail

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ce projet de thèse s'est intéressé à l'importance de la polarisation des macrophages dans le contexte pathologique de l'athérosclérose et à l'influence de l'oxydation des LDLs sur cette polarisation.

Le premier objectif de ce travail a été **d'étudier l'effet des LDLs oxydées ou non sur la polarisation des macrophages *in vitro***. Pour ce faire, nous avons commencé par mettre au point un modèle de polarisation des macrophages murins de la lignée RAW 264.7. Cette lignée a été utilisée en raison de sa facilité de culture, mais aussi eu égard à la capacité de ces cellules de se différencier en cellules spumeuses lorsqu'elles sont incubées en présence de LDLs oxydées (Calay et al., 2010).

Les résultats, obtenus avec la lignée de macrophages RAW 264.7, ont été validés avec des macrophages dérivés de cellules de moelle osseuse de souris C57BL/6 (ou BMDMs, « bone-marrow derived macrophages »).

Afin d'attester la polarisation des macrophages, différents marqueurs ont été utilisés. Ainsi, pour la polarisation M1 (macrophages pro-inflammatoires), les marqueurs utilisés ont été principalement l'*iNOS* et l'*Il-6*. L'*arginase-2 (Arg2)* et le *Tnf α* ont également servi de marqueurs M1 supplémentaires. Dans le cas de la polarisation M2, ce sont les marqueurs *arginase-1 (Arg1)* et *Mrc1* (ou *Cd206*) qui ont été choisis, ainsi que l'*IL-10*. Enfin, nous avons étudié la polarisation dite « Mox » puisque l'étude de Kadl et al., en 2010, a montré que ce phénotype représenterait 30 % de la population de macrophages présents dans les lésions athérosclérotiques de souris *Ldl-r^{-/-}* (Kadl et al., 2010). Les marqueurs « Mox » utilisés ont été la *hème oxygénase-1 (Ho-1)* et la *sulfirédoxine-1 (Srxn1)*.

Une fois les protocoles de polarisation mis au point, les macrophages, polarisés ou non, ont été stimulés avec des LDLs natives, oxydées au CuSO_4 (Ox-LDLs) ou oxydées avec la myéloperoxydase (MpOx-LDLs ou Mox-LDLs). Les LDLs natives, directement isolées du plasma de sujets sains, sont ensuite oxydées. Nous avons choisi deux modes d'oxydation :

- l'oxydation avec le sulfate de cuivre, qui est le plus décrit dans la littérature, tout en sachant que les concentrations en CuSO_4 utilisées ne sont pas physiologiques puisqu'elles dépassent de 300 à 3000 fois celles détectées *in vivo* (0,03 μM) (Ziouzenkova et al., 1998). La composition et les propriétés physico-chimiques des LDLs oxydées au cuivre *in vitro* (concentration utilisée en URBC : 10 μM) sont également sensiblement différentes de celles retrouvées dans les LDLs oxydées *in vivo*.

- l'oxydation avec le système $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$. Parmi les différents systèmes enzymatiques décrits dans la littérature comme étant susceptibles d'oxyder les LDLs *in vivo* (xanthine oxydase, NADPH oxydase, lipoxygénase,...), c'est la myéloperoxydase qui a été choisie. Calay et al. avaient déjà montré que les MpOx-LDLs présentaient une capacité supérieure à celle des Ox-LDLs à induire la formation de cellules spumeuses (Calay et al., 2010). De plus, on détecte la présence de chlorotyrosine, produit spécifique dû à l'activité de la MPO, au niveau des lésions athérosclérotiques (Daugherty et al., 1994; Hazen and Heinecke, 1997).

Nous avons donc pu comparer l'effet de LDLs natives ou oxydées de façon chimique ou enzymatique sur la polarisation des macrophages. Celle-ci a été déterminée au niveau

ARNm (RT-qPCR), protéique (ELISA, FACS ou WB) et par mesure de la charge en gouttelettes lipidiques internalisées par les macrophages (marquage avec le Bodipy®, et quantification avec le BD Pathway 855).

Nous avons voulu ensuite **déterminer le phénotype des macrophages au niveau des lésions athéroscléreuses en modèles murins**. Dans ce but, grâce à une collaboration avec le laboratoire de B. Robaye (IRIBHM, ULB, Gosselies), nous avons comparé les lésions de souris *ApoE*^{-/-}, modèle fréquemment utilisé dans la littérature, et de souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}. En effet, l'équipe de Robaye, ainsi que Stachon et al., ont observé une diminution des plaques athéroscléreuses lorsque *P2y6* est invalidé dans le modèle murin *ApoE*^{-/-} (Stachon et al., 2014). Nous avons donc pu déterminer les proportions relatives de macrophages M1 et M2 au niveau des lésions dans les deux modèles pour voir s'il y avait une différence, et si oui, quelle pourrait être sa signification dans le contexte de l'athérosclérose.

Enfin, nous avons abordé la question de la polarisation des macrophages en modèle humain, dans une étude préliminaire. Vu la difficulté d'étudier les macrophages et vu l'hypothèse que les monocytes pourraient déjà être engagés dans le processus de polarisation dans la circulation, nous nous sommes intéressés aux monocytes circulants, dans un modèle plus complexe. Nous avons sélectionné des patients dialysés, car ils présentent un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, souvent associé à un processus d'athérogenèse accéléré (Savage et al., 1998). Nous les avons comparé avec des sujets sains d'un âge comparable, l'hypothèse étant que chez les patients dialysés, les monocytes pourraient déjà être orientés « M1 » ou « M2 ». Nous avons donc déterminé les différentes sous-classes de monocytes au moyen de l'expression différentielle de CD14 et CD16, les monocytes « M1 » ont été détectés au moyen des marqueurs CD86 et CCR2, tandis que les « M2 » l'ont été au moyen de la combinaison des marqueurs CD206 (MRC1), CXCR3 et CD163 (Fadini et al., 2013a; Fadini et al., 2013b; Fadini et al., 2014). De plus, **nous avons voulu savoir s'il était possible d'établir des corrélations entre les phénotypes des monocytes et les concentrations en Mox-LDLs**, des produits de l'oxydation des LDLs avec la myéloperoxydase, de l'APOAI et l'APOB, de l'état inflammatoire (CRP, IL-8) et de la concentration en M-CSF mesurées dans le plasma de ces patients.

L'ensemble de ces études a donc pour but d'identifier des facteurs capables de moduler la polarisation des macrophages et dans le cas des Mox-LDLs, de déterminer comment elles peuvent moduler leurs fonctions.

Résultats

III. RESULTATS

Au cours de ces dernières années, la polarisation des macrophages présents dans les lésions athéroscléreuses est devenue un sujet central dans de nombreuses études portant sur le processus d'athérogenèse et dans la recherche de traitements afin d'induire une régression des athéromes. En effet, pour rappel, il a été montré dans le modèle murin *ApoE*^{-/-} que les lésions précoces se caractérisent par une prédominance de macrophages M2, tandis que les lésions avancées présentent une prédominance de macrophages M1 (Khallou-Laschet et al., 2010). Chez l'humain, les macrophages M1 représenteraient le phénotype prédominant dans les régions périphériques des lésions, susceptibles de se rompre, tandis que les macrophages M2 sont prédominants surtout au niveau de l'adventice sous l'athérome (Stoger et al., 2012). Les raisons de ces changements dans l'équilibre entre les phénotypes M1 et M2, pendant l'évolution des lésions ou en fonction de leur distribution tissulaire dans la paroi artérielle affectée, et les facteurs du microenvironnement impliqués, ne sont pas encore bien identifiés à l'heure actuelle. C'est dans ce contexte que s'intègre notre travail.

Les résultats seront présentés en trois parties.

Dans la **première partie** de notre étude, nous avons décidé de mettre au point un nouveau modèle de polarisation des macrophages dans une lignée de cellules faciles à cultiver et capables de former des cellules spumeuses en présence de LDLs oxydées : les macrophages RAW 264.7. Une fois les protocoles de polarisation établis, nous avons étudié l'effet des LDLs oxydées sur la polarisation des macrophages et sur les macrophages polarisés. Ces résultats, sont présentés dans l'article publié qui suit, complétés avec des données obtenues sur un troisième phénotype, les macrophages « Mox » (voir 3.1.2 Etablissement du phénotype Mox dans la lignée de cellules RAW 264.7).

Une fois notre étude *in vitro* réalisée, nous avons voulu étudier le rôle de la polarisation des macrophages dans un modèle *in vivo* de souris hyperlipidémiques. Nous avons donc entrepris les démarches pour nous procurer le modèle de souris DKO *Ldl-r x Apobec*, un modèle de souris développant spontanément des lésions athéroscléreuses, avec des profils de lipoprotéines plus proches de la situation humaine (Powell-Braxton et al., 1998) (voir Point 3.2.1.1. de l'Introduction). Cependant, au vu des difficultés pour l'acquérir et grâce à l'opportunité d'une collaboration avec le laboratoire de B. Robaye (IRIBHM, ULB, Gosselies), nous nous sommes tournés vers un modèle alternatif de souris DKO présentant des lésions plus limitées, le modèle murin *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}. L'objectif a donc été de vérifier si le récepteur purinergique P2Y₆ pouvait influencer la polarisation des macrophages dans les lésions. Ces résultats (non publiés) seront décrits dans la **deuxième partie** de ce chapitre.

Le modèle murin présentant néanmoins des limites, nous nous sommes enfin tournés dans la **troisième partie** vers le modèle humain, plus complexe, afin d'étudier l'importance de la polarisation dans l'athérogenèse. Cependant, nous avons décidé d'étudier la polarisation plus en amont, à savoir, au niveau des monocytes circulants. En effet, nous avons émis l'hypothèse que les monocytes seraient déjà « pré-polarisés », conditionnant ainsi le phénotype des macrophages dans les lésions athéroscléreuses. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons travaillé sur une cohorte de patients dialysés, vu qu'ils présentent un risque élevé de développer des problèmes cardiovasculaires,

mais aussi des taux élevés de Mox-LDLs dans la circulation (Delporte et al., 2013). Ces résultats sont présentés dans un article en préparation.

3.1 EFFET COMPARATIF DES LDLs OXYDEES SUR LA POLARISATION DE MACROPHAGES MURINS.

3.1.1 Article publié dans le journal « Mediators of Inflammation »

L'article intitulé « *Myeloperoxidase-oxidized LDLs enhance an anti-inflammatory M2 and antioxidant phenotype in murine macrophages* » regroupe les résultats obtenus après avoir mis au point le protocole de polarisation M1 et M2 dans les macrophages RAW 264.7 et étudié l'effet des LDLs oxydées au sulfate de cuivre ou à la myéloperoxydase sur le phénotype de ces macrophages. Ces résultats ont été validés avec les cellules issues de la moelle osseuse de souris C57BL/6, différenciées en macrophages (BMDMs).

Les matériels et les méthodes qui s'y rapportent, les résultats obtenus et la discussion sont présentés dans l'article.

Signalons qu'en Annexe 2, sont résumés les résultats de tests de cytotoxicité qui ont permis de sélectionner la concentration en LPS utilisée dans l'article pour polariser les macrophages RAW 267.4 en cellules M1, tandis que l'Annexe 1 décrit les méthodes complémentaires utilisées.

Les Annexes 3 et 4 décrivent, quant à elles, les méthodes de caractérisation des Mox-LDLs tandis que l'Annexe 5 (observation au microscope confocal des gouttelettes lipidiques marquées avec la sonde BODIPY 493/503) est complémentaire aux résultats portant sur l'internalisation des LDLs natives et oxydées des figures 6 et 7 de l'article.

Research Article

Myeloperoxidase-Oxidized LDLs Enhance an Anti-Inflammatory M2 and Antioxidant Phenotype in Murine Macrophages

**Valérie Pireaux,¹ Aude Sauvage,¹ Benoît Bihin,²
 Martine Van Steenbrugge,¹ Alexandre Rousseau,³ Pierre Van Antwerpen,⁴
 Karim Zouaoui Boudjeltia,³ and Martine Raes¹**

¹URBC-Narilis, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

²UMBD, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

³Laboratory of Experimental Medicine (ULB 222 Unit), Université Libre de Bruxelles, CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale, Montigny-Le-Tilleul, Belgium

⁴Therapeutic Chemistry, ULB (Campus de la Plaine) CP205/05, boulevard du Triomphe, Brussels, Belgium

Correspondence should be addressed to Valérie Pireaux; valerie.pireaux@unamur.be

Received 25 April 2016; Revised 28 July 2016; Accepted 2 August 2016

Academic Editor: Michal A. Rahat

Copyright © 2016 Valérie Pireaux et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Macrophages and oxidized LDLs play a key role in atherogenesis but their heterogeneity has been neglected up to now. Macrophages are prone to polarization and subsets of polarized macrophages have been described in atheromas. LDLs can be oxidized not only chemically by copper (Ox-LDLs) but also enzymatically by myeloperoxidase (MpOx-LDLs) resulting in oxidized LDLs poor in lipid peroxides. The effects of physiologically relevant myeloperoxidase-oxidized LDLs on macrophage polarization or on polarized macrophages remain largely unknown. In this study, the effects of LDLs on macrophage polarization were investigated by monitoring the expression of M1 and M2 genes following stimulation with native LDLs, Ox-LDLs, or MpOx-LDLs in RAW 264.7 cells. Except for *MRC1*, which is induced only by Ox-LDLs, MpOx-LDLs induced an overexpression of most of the selected marker genes at the mRNA level. MpOx-LDLs also modulate marker gene expression in polarized macrophages favoring notably anti-inflammatory *Arg1* expression in M2 cells and also in the other phenotypes. Noteworthy, MpOx-LDLs were the most efficient to accumulate lipids intracellularly in (un)polarized macrophages whatever the phenotype. These data were largely confirmed in murine bone marrow-derived macrophages. Our data suggest that MpOx-LDLs were the most efficient to accumulate within cells and to enhance an anti-inflammatory and antioxidant phenotype in M2 cells and also in the other macrophage phenotypes.

1. Introduction

Cardiovascular diseases, the major cause of deaths in western societies and throughout the world, are mainly due to atherosclerosis, a chronic inflammatory disease affecting mainly medium and large arteries (WHO, fact sheets of 2016). Local blood flow perturbations or injuries lead to an increased permeability of the endothelial layer, favoring lipoprotein infiltration in the intima, where they get oxidized [1–4]. The oxidized lipoproteins are atherogenic. They activate endothelial cells increasing their chemokine (e.g., MCP-1) and cytokine (e.g., IL-6) secretion, leading to the recruitment of monocytes, which will differentiate into macrophages within the intima [3, 5–7]. However,

most of the studies have focused on copper-oxidized LDLs (Ox-LDLs), while more relevant forms of oxidized LDLs have been neglected. Calay and coworkers showed that myeloperoxidase-oxidized LDLs (MpOx-LDLs) activate different signaling cascades in macrophages compared to Ox-LDLs [8]. Macrophages become foam cells following internalization of these oxidized LDLs through scavenger receptors. Noteworthy, higher intracellular accumulation levels are observed with MpOx-LDLs [8–10].

Macrophages are not homogeneous. Different signals in the cellular environment functionally activate macrophages, modulating their phenotypes as an adaptive response. Classically activated M1 or proinflammatory macrophages are mainly involved in acute host defense owing to their

microbicidal activity. Exerting cytotoxic and antiproliferative activities by the production of ROS (reactive oxygen species), RNS (reactive nitrogen species), and proinflammatory cytokines (e.g., Interleukin-6), they contribute to tissue destruction and tumor resistance [11–13]. This phenotype can be induced *in vitro* by interferon- γ (IFN- γ) and/or by bacterial stimuli (e.g., LPS), and, over the last years, the combination of LPS and IFN- γ has become the standard for inducing “classically” polarized M1 cells in both murine and human macrophages from different sources [11, 14–19]. On the contrary, anti-inflammatory M2 macrophages resolve inflammation by the production of anti-inflammatory mediators [7, 12]. They not only are involved in matrix remodelling, angiogenesis, and tissue repair but also contribute to tumor promotion [12, 13, 20]. These alternatively activated M2 macrophages can be induced *in vitro* by Interleukin-4 (IL-4) and Interleukin-13 (IL-13) [18].

Another more recently described phenotype (MOX) is induced *in vitro* by oxidized phospholipids and characterized by high levels of expression of genes regulated by Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (e.g., *heme oxygenase-1* and *sulfiredoxin-1*) [18, 21–23]. Although less documented, this phenotype, relevant in the context of oxidative stress and probably of atherosclerosis, has been described to represent up to 30% of the macrophages present in advanced atherosclerotic lesions, at least in LDL-R^{-/-} mice [22].

Despite many recent studies focusing on macrophage polarization, in particular in relation with several chronic diseases, the mechanisms as well as the pathophysiological significance of macrophage polarization in atheroma remain unclear.

In this study, we investigated the effect of native or modified LDLs not only on macrophage polarization but also on polarized macrophages and on foam cell formation. We compared in particular the effects of copper-oxidized and myeloperoxidase-oxidized LDLs. To do so, we first validated the use of the RAW 264.7 murine macrophage-like cell line, which is often used to produce foam cells [24, 25], as a robust and reproducible model for studying macrophage polarization into proinflammatory M1 (also named M(LPS + IFN- γ) according to the “Nomenclature and Experimental Guidelines” about macrophage activation and polarization [26]) and anti-inflammatory M2 (also named M(IL-4 + IL-13)) macrophages [26].

The results on RAW cells were validated using murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs).

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Cell Treatments. The murine RAW 264.7 macrophage cell line, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), was grown in DHG-L1 medium (Dulbecco’s modified Eagle’s medium + high glucose (4,5 g/L) + NaHCO₃ (1,5 g/L)) (SAFC Global, Lenexa, KS, USA) + 10% HIS (heat-inactivated fetal serum) (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells were seeded and treated in 6-well plates (750 000 cells/well) (Corning-Costar, Lowell, MA, USA).

RAW 264.7 cells were polarized towards M1 macrophages by adding LPS (10 ng/mL) (from *Escherichia coli* (serotype 0111:B4), obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) in the presence of IFN- γ (20 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or towards M2 cells via the addition of IL-4 combined with IL-13 (20 ng/mL both) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for 18 h. After polarization, media were removed. Then unpolarized (M0 macrophages) and polarized macrophages were incubated for 24 h with RPMI (Ctl) (RPMI-1640 culture medium (glutamine-free) from Lonza, Basel, Switzerland), native LDLs (Nat-LDLs), CuSO₄-oxidized LDLs (Ox-LDLs), or myeloperoxidase-oxidized LDLs (MpOx-LDLs) at 100 μ g/mL. RAW 264.7 macrophages were also incubated in the presence of IFN- γ only (20 ng/mL) as a control.

BMDMs (bone marrow-derived macrophages) were obtained from femurs and tibias of 6-to-8-week-old C57BL/6 mice. Mice were euthanized by 1-minute exposure to CO₂ followed by cervical dislocation. Once the bone marrow was collected by flushing, cells were incubated for 7 days with DMEM (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated low-endotoxin serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% of penicillin/streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 10% of L929 conditioned media. They were cultured in cell culture Petri dishes (Greiner Bioscience, Frickenhausen, Germany) and were seeded at a density of 500 000 cells/well in 6-well plates (Greiner Bioscience, Frickenhausen, Germany) for further analyses. Then BMDMs were polarized and/or stimulated with LDLs with the same protocol as for RAW 264.7 (protocol adapted from [27, 28]).

Mice were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the Ethics Committee of the University of Namur. This committee approved all the work planned on animals.

Murine L-929 fibroblasts were obtained from the ATCC and incubated for 6 days with DMEM plus 10% of heat-inactivated low-endotoxin serum in order to produce conditioned medium needed to differentiate murine monocytes into macrophages (BMDMs). L929 conditioned medium is a major source of M-CSF, GM-CSF, and other factors, which stimulate the differentiation and growth of bone marrow cells into macrophages [29].

2.2. LDL Preparation and Oxidation. Native LDLs (Nat-LDLs) were obtained by sequential density gradient ultracentrifugation from plasma of healthy blood donors. They were prepared, oxidized, and characterized as previously described by Calay et al. [8]. The concentration of Nat-LDLs in PBS was adjusted to 1 mg/mL before incubation with 10 μ M copper sulfate for 24 hours at 37°C. Oxidation was stopped by the addition of 25 μ M butylated hydroxytoluene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubation on ice for 1 hour. MpOx-LDLs were generated by mixing 8 μ L of HCl 1 M (final concentration: 4 μ M) (Merck, Billerica, MA, USA), 50 μ L of recombinant human MPO (rhMPO) 86 U/mL (final relative activity: 2.6 U/mg LDL), 1600 μ g of LDLs diluted in PBS, and 40 μ L of 50 mM H₂O₂ (final concentration: 1 mM) (Merck, Billerica, MA, USA). The volume was adjusted to

2 mL with PBS containing 1 g/L of EDTA (Merck, Billerica, MA, USA) at pH 6.5. rhMPO was provided by the Laboratory of Experimental Medicine (ULB 222 Unit, CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale, Belgium). The oxidation reaction for the generation of MpOx-LDLs was carried out at 37°C for 5 minutes and stopped by incubation on ice to inhibit the MPO enzymatic activity. Nat-LDLs, Ox-LDLs, and MpOx-LDLs were desalted against RPMI-1640 without glutamine (Lonza, Belgium) by using PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). LDLs were sterile-filtered (0.2 µm), stored in the dark at 4°C, and used within 4 days in order to prevent further oxidation. The LDL concentration was determined by the Lowry method and LDLs were used at a final concentration of 100 µg/mL.

2.3. RNA Extraction and Quantitative Real-Time RT-PCR. Total RNA, from M0, M1, and M2 macrophages, was extracted according to the manufacturer's protocol using RNeasy Mini Kit (RAW 264.7) or RNeasy Micro Kit (BMDMs) (Qiagen, Hilden, GE). cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit and according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Forward and reverse primers for *TBP*, *HO-1*, *Srxn1*, *Arg1*, *MRC1*, *Mgl2*, *YMI*, *iNOS*, *IL-6*, *Arg2*, and *TNF-α* (Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, IA, USA)) were designed using the Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Real-time RT-qPCR was performed using FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). The amplification process starts with a denaturation step at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and then annealing and extension at 65°C for 1 minute, using the 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The gene encoding the Tata-Box Protein (TBP) was selected as a housekeeping gene to normalize data.

2.4. Flow Cytometry. M0, M1, and M2 macrophages were detached with EDTA (Merck, Billerica, MA, USA) (15 minutes at RT) and washed with PBS. After washing, cells were stained with anti-Fc monoclonal antibody (dilution 200x) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) for 20 minutes at 4°C and then incubated with primary anti-MRC1 monoclonal antibody (dilution 10x) (Abcam, Cambridge, UK) and secondary anti-IgG-Alexa-488 antibody (dilution 100x) (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) both for 60 minutes at 4°C. Finally, they were fixed with PFA 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 20 minutes at 4°C. Cells incubated with only the primary or secondary antibodies were used as negative controls.

2.5. Western Blotting. After removing the medium, cells were washed in PBS, scraped, and lysed in 30 µL of lysis buffer (10 mM Tris (Merck, Billerica, MA, USA), 100 mM NaCl (Merck, Billerica, MA, USA), 10% glycerol (Merck, Billerica, MA, USA), 1% Nonidet P-40 Substitute (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,1% sodium dodecyl sulfate

(MP Biochemicals, Solon, OH, USA), 0,5% sodium deoxycholate (Merck, Billerica, MA, USA)) containing a proteinase inhibitor "Complete" cocktail (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitors (25 mM Na₃VO₄, 250 mM 4-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 250 mM β-glycerophosphate (VWR, Radnor, PA, USA), and 125 mM NaF (Merck, Billerica, MA, USA) at a 1/25 dilution in H₂O) for 30 minutes at 4°C. Lysates were then centrifuged at 15 700 rcf for 10 minutes (Eppendorf Microcentrifuge 5415R). Protein concentration was determined using the Pierce 660 protein assay and 15 µg (RAW 264.7 cells) or 5 µg (BMDMs) of proteins was loaded on 4–20% SDS-PAGE gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (0,45 µm) (Millipore, Billerica, MA, USA) for 2 hours at 70 V. Primary antibodies are mouse anti-HO-1 (heme oxygenase-1) monoclonal antibody (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), rabbit anti-sulfiredoxin polyclonal antibody (Proteintech, Chicago, IL, USA), and rabbit anti-TBP polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) (dilution 1000x). Secondary antibodies are either IRDye 800CW goat anti-mouse antibodies or IRDye 680 goat anti-rabbit antibodies (LI-COR, Lincoln, NE, USA) (dilution 10000x). Quantitative analysis of fluorescence intensity was performed using the Odyssey Classic Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

2.6. ELISA Assay. Supernatants were harvested. They were then centrifuged at 15 700 rcf at 4°C and pellets were discarded. Mouse IL-6, IL-12, TNF-α, and IL-10 ELISA assays were performed following manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.7. Analysis of the Number and Size of Lipid Droplets. Cells seeded in 96-well plates were fixed with PFA 4% for 10 minutes at RT. After washing with PBS, they were permeabilized with PBS-Triton 1% for 5 minutes at RT, washed with PBS-BSA 2%, and incubated with BODIPY 493/503 (dilution: 1/40) (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) for 2 hours in the dark at RT. They were finally incubated with Phalloidin-Alexa 555 (dilution: 1/50) (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) and Hoechst FluoroPure grade (dilution: 1/1000) (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) for 30 minutes in the dark at RT and analyzed using the BD Pathway 855, with the AttoVision software and BD-IDE software (lens: 20x) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.8. Cholesterol Quantitation. Cells were seeded in 6-well plates at a density of 1 · 10⁶ cells/well, polarized for 18 hours, and incubated or not with LDLs for 24 hours. After this incubation, cholesterol was extracted from cells by adding 200 µL of chloroform : isopropanol : IGEPAL CA-630 (7 : 11 : 0.1) in a microhomogenizer. The solution was then centrifuged at 13 000 ×g for 10 minutes in order to remove insoluble material. The organic phase was transferred in a new tube, air-dried at 50°C to remove chloroform, and put under vacuum for 30 minutes to remove any residual organic solvent. The

dried lipids were dissolved with 220 μL of the cholesterol assay buffer and were vortexed until the lipid solution was homogeneous. Cholesterol was finally quantified following the manufacturer's instructions by using reaction mixes containing the cholesterol assay buffer, probe, enzyme mix, and/or cholesterol esterase. The absorbance was measured at 570 nm (Cholesterol Quantitation Kit MAK043) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and results were expressed as $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of free, esterified, or total cholesterol following the manufacturer's instructions.

2.9. Phagocytosis Assay. Cells were seeded in 12-well plates at a density of $5 \cdot 10^5$ cells/well and were polarized for 18 hours. They were then incubated or not with LDLs (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and fluorescent beads (dilution: 1/133) for 24 hours. Phagocytosis of fluorescent beads was measured by flow cytometry, using the FACS BD Verse (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The phagocytosis assay of fluorescent beads was performed following manufacturer's instructions (Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC) Item number 500290) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

2.10. Statistical Analysis. R (version 3.0.3; the R Foundation for Statistical Computing) was used for statistical analysis. As RT-qPCR data presents highly heterogeneous variances, statistical analyses were performed on log-transformed data and, in order to facilitate interpretation, untransformed data are shown (Figures 4(a), 4(b2), 5, and 7(b), and S1C, and S1D in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8249476>).

Before measuring the mean comparisons, homoscedasticity was assessed with Bartlett's test.

When homoscedasticity could be assumed (p value > 0.05), we performed one-way (Figures 1, 2, 3, 6, 7(a), S1A, S1B, S2A, S3A, and S4) or two-way ANOVA according to the experimental design. *Post hoc* pairwise mean comparisons were then performed with Tukey's method. Following two-way ANOVA, pairwise comparisons were performed among marginal means if there was no statistically significant interaction and among cell means otherwise (Figures 4(a) and S5: except *MRC1*, Figures 4(b) and 5(a): *Arg1* and *IL-6*, and Figures 5(b) and S6).

When homoscedasticity could not be assumed (p value < 0.05), we performed Kruskal-Wallis rank-sum test followed by pairwise comparisons on main effects using Wilcoxon rank-sum test (Figures 4(a) and S5: *MRC1*, Figure 5(a): except for *Arg1* and *IL-6*, and Figures 7(b), S1C, S1D, S2B, and S3B).

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean.

3. Results

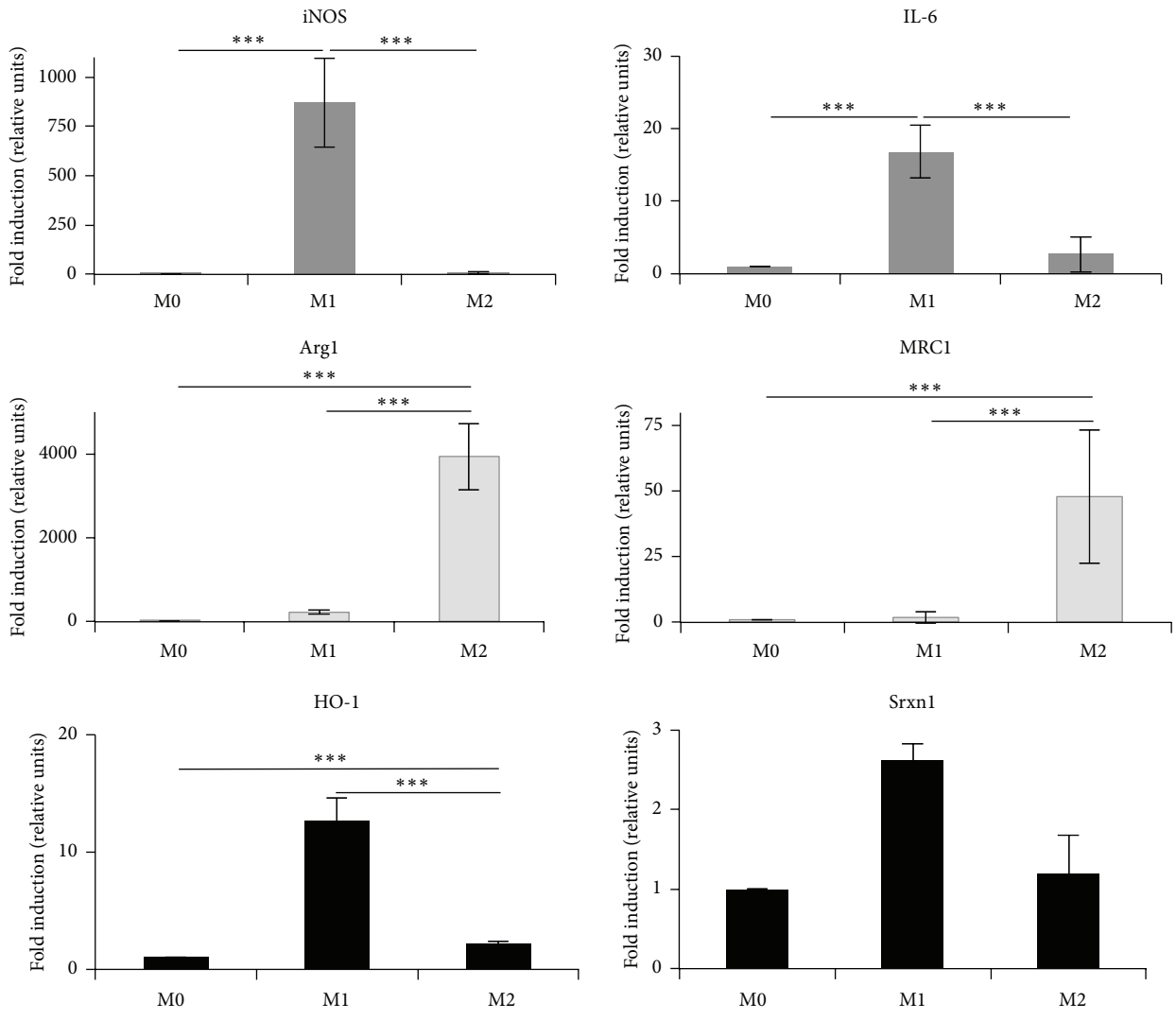
3.1. RAW 264.7 Macrophages Can Be Polarized into M1 and M2 Macrophages. Unpolarized RAW 264.7 macrophages (M0) were polarized into M1 and M2 macrophages using LPS and IFN- γ for the M1 phenotype and IL-4 and IL-13 for the M2 phenotype [14, 19, 22]. We confirmed the respective phenotypes by measuring the expression of marker genes

[30–33] both at the mRNA level and at the protein level (Figures 1, S1A, S2A, and S3A (see Supplementary materials)). At the mRNA level, M1 macrophages overexpressed proinflammatory genes, such as *inducible Nitric Oxide Synthase* and *Interleukin-6* (Figure 1(a)) as well as *Arg2* and *TNF- α* (Figure S2A), while M0 and M2 macrophages did not. Contrary to M0 and M1 macrophages, M2 macrophages overexpressed anti-inflammatory genes, such as *arginase-1* and *mannose receptor-C1 (MRC1)* (Figure 1(a)) as well as *Mgl2* (macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2) and *YMI* (beta-N-acetylhexosaminidase, also known as *Chil3*, chitinase-like protein 3) (Figure S1A). In M1 cells, we also observed an overexpression of *heme oxygenase-1 (HO-1)* and *sulfiredoxin-1 (Srxn1)*. The latter are driven by *Nrf2* and considered as markers of oxidative stress as well as of the so-called MOX macrophages, a less documented phenotype [22] (Figure 1(a)). Increased expression of some marker genes was confirmed at the protein level, respectively, by ELISA, for secreted IL-6 (Figure 1(b1)), and by flow cytometry analysis, for *MRC1* (Figure 1(b2)). We also checked, by ELISA, the expression of IL-10, generally considered as an anti-inflammatory cytokine (M2 marker), which was higher in M2 macrophages, and the expression of both proinflammatory cytokines IL-12 and *TNF- α* (M1 markers), which was higher in M1 macrophages (Figure S3A). Western blot analysis confirmed that *HO-1* abundance was higher in M1 macrophages, while no clear difference in abundance was observed for *Srxn1* (Figure 1(b3)). IFN- γ alone induced to some extent the secretion of *TNF- α* but was unable to polarize the cells into M1 cells (data not shown).

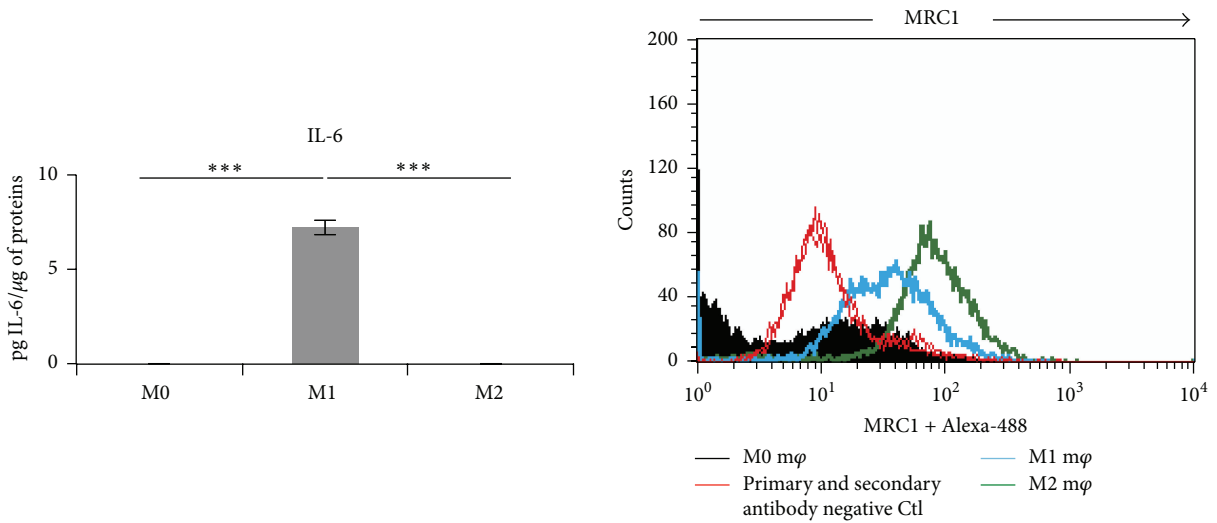
The same protocols of polarization were applied to bone marrow-derived macrophages (BMDMs) obtained from the differentiation of bone marrow cells collected from femurs and tibias of 6-to-8-week-old C57BL/6 mice (Figures 2 and S1B). We observed the same trend when considering the expression of M1 and M2 markers (especially *arginase-1*, *Mgl2*, and *YMI*) in M1 and M2 macrophages, respectively (Figures 2(a) and S1B). The redox-sensitive genes, *HO-1* and *Srxn1*, were also overexpressed in M1 macrophages.

In summary, these results show that the RAW 264.7 cells can easily be polarized into M1 or M2 macrophages, displaying marker gene expression patterns consistent with those observed in polarized BMDMs. Fold inductions are generally higher in BMDMs and especially in M1 BMDMs (Figure 2(a)).

3.2. Myeloperoxidase-Oxidized LDLs Are the Most Efficient in Modulating Polarization Gene Marker Expression. Using the validated RAW 264.7 macrophage model, we evaluated the potential of LDLs to polarize macrophages. Unpolarized macrophages were stimulated with native LDLs (Nat-LDLs), copper sulfate-oxidized LDLs (Ox-LDLs), and myeloperoxidase-oxidized LDLs (MpOx-LDLs) and the expression of M1 and M2 marker genes was determined at the mRNA (Figure 3(a)) and protein levels (Figures 3(b)). While copper sulfate oxidation alters both the protein and lipid moieties, myeloperoxidase oxidizes mainly Apo-B100, generating low levels of lipid hydroperoxides [34–36].



(a)



(b1)

(b2)

FIGURE 1: Continued.

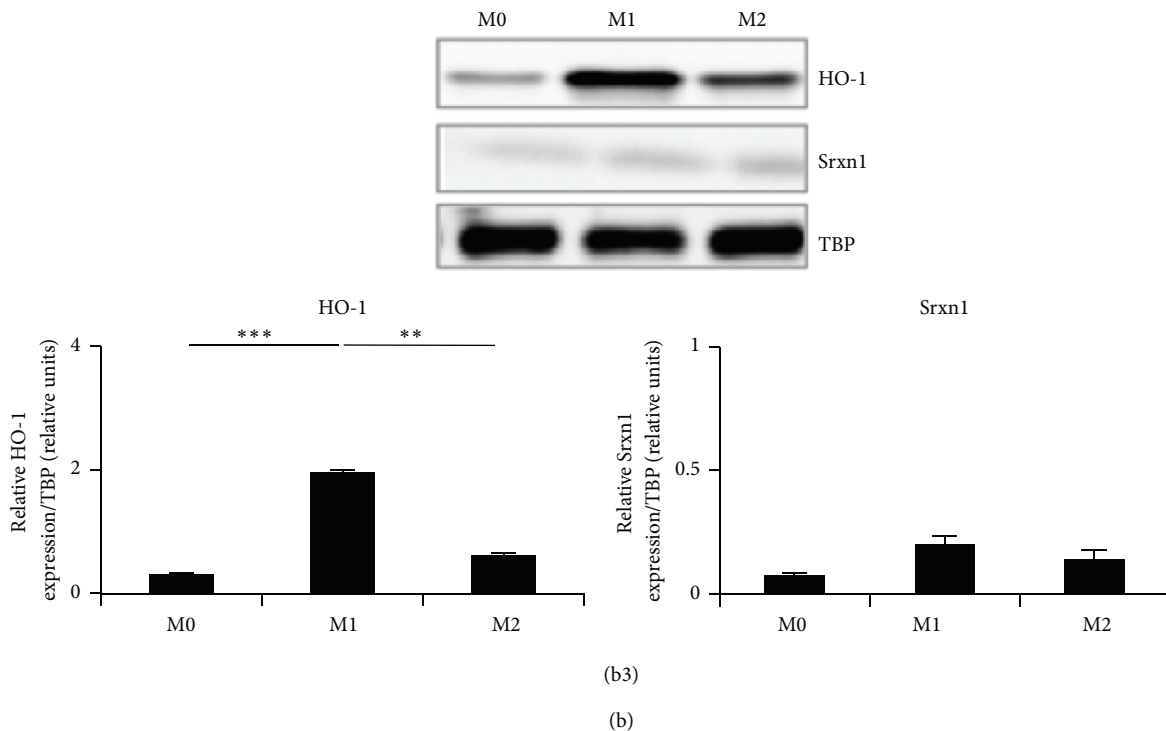


FIGURE 1: Characterization of RAW 264.7 M0, M1 (LPS + IFN- γ), and M2 (IL-4 + IL-13) polarized macrophages. Cells were polarized as described in Materials and Methods. (a) Expression of polarization marker genes at the mRNA level (RT-qPCR), in M0, M1, and M2 macrophages. The expression of *iNOS* and *IL-6* as M1 markers, *Arg1* and *MRC1* as M2 markers, and *HO-1* and *Srxn1* as MOX redox-sensitive markers was analyzed by RT-qPCR. Data were normalized with *TBP* used as housekeeping gene and expressed as mean fold induction relatively to M0 cells \pm SD ($n = 3$). (b) Expression of polarization markers at the protein level in M0, M1, and M2 macrophages. (b1) Production of secreted IL-6 (M1 marker) in cell culture supernatants assessed by ELISA. Data are expressed relatively per μ g of protein per well as mean \pm SD ($n = 3$). (b2) Surface expression of *MRC1* (M2 marker) analyzed by flow cytometry in M0, M1, and M2 macrophages (m ϕ). GMF (geometric mean of the fluorescence intensity) values are reported in arbitrary units: Δ GMF_{M2-M0}, 65.57 and Δ GMF_{M1-M0}, 28.9. The data presented are representative of 3 independent experiments. (b3) Expression of *HO-1* and *Srxn1* assessed by Western blotting in M0, M1, and M2 macrophages. Data are normalized with *TBP* used as loading control and expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Results are representative of 3 independent experiments. ANOVA 1: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

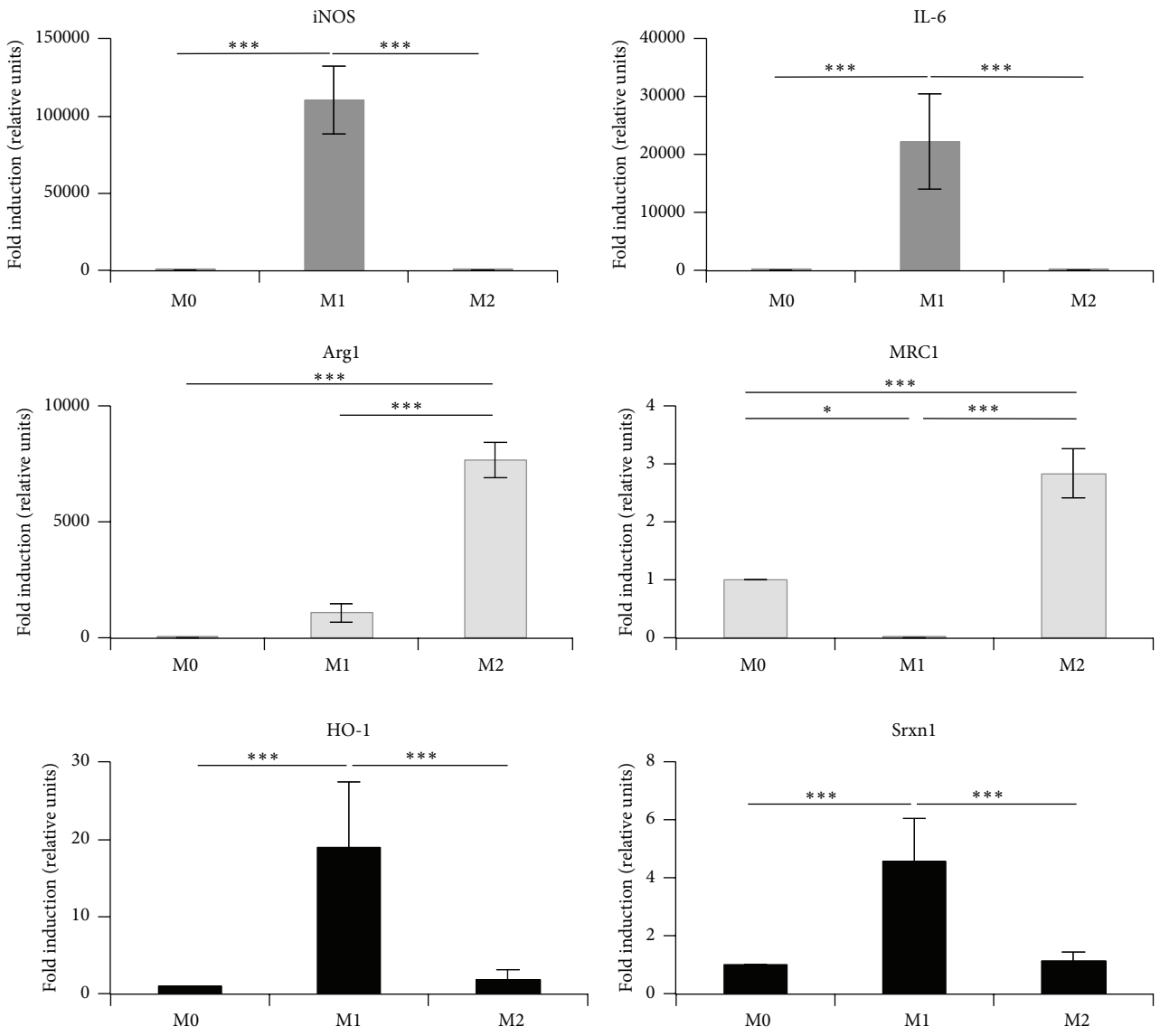
First, we assessed the mRNA abundance of the selected marker genes and observed that native LDLs have no marked effect on macrophage polarization. Ox-LDLs mainly induced an increased expression of *MRC1*, a M2 marker gene ($p < 0.001$) [32]. MpOx-LDLs were the most potent to induce the expression of all the selected marker genes (*iNOS*, *Arg1*, and *MRC1*: $p < 0.05$; *IL-6*, *HO-1*, and *Srxn1*: $p < 0.001$) (Figure 3(a)).

While the M1 markers *iNOS* and *IL-6* and the M2 marker *Arg1* were only induced following MpOx-LDLs treatment, both Ox-LDLs- and MpOx-LDLs-treated cells overexpressed the M2 marker *MRC1* (Figure 3(a)). However, the fold induction at the mRNA level for *iNOS*, *Arg1*, and *MRC1* remained significantly lower compared to polarized M1 and M2 macrophages (Figures 1(a) and 3(a)). At the protein level (Figure 3(b2)), *MRC1* abundance was higher in the presence of both Ox-LDLs and MpOx-LDLs, but in the presence of MpOx-LDLs a majority of cells clearly expressed higher levels of *MRC1*, compared to Ox-LDLs-treated cells. The effect of LDLs was also tested on the secretion of various cytokines. In contrast to the mRNA data, *IL-6* abundance was higher in the presence of Ox-LDLs ($p < 0.001$) (Figure 3(b1)), while

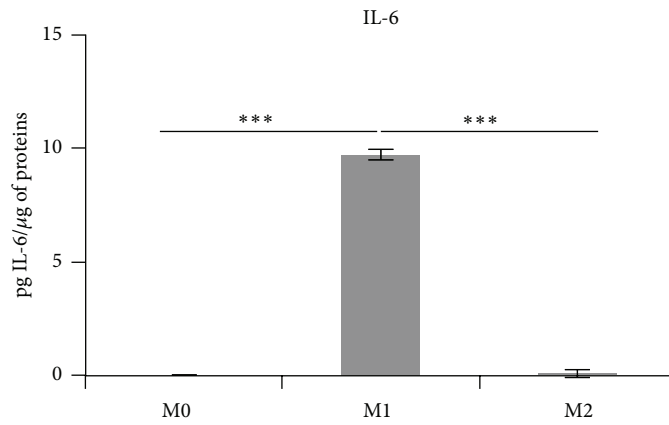
no significant effect was observed for *IL-10*, *IL-12*, and *TNF- α* whatever the LDLs used as compared to Ctl cells (Figure S4). *HO-1* and *Srxn1* expressions increased at the protein level in unpolarized cells treated with both Ox-LDLs (*HO-1*: $p < 0.01$) and MpOx-LDLs (*HO-1* and *Srxn1*: $p < 0.001$) but more effectively with the latter (Figure 3(b3)). Overall, these data suggest that MpOx-LDLs by themselves tend to favor an intermediate phenotype slightly inducing the expression of some M2 markers and antioxidant enzymes.

3.3. Ox-LDLs and MpOx-LDLs Differentially Modulate the Phenotype of Polarized Macrophages. We next investigated the possible influence of LDLs on polarized macrophages. M1 and M2 RAW 264.7 cells (Figures 4, S1C, S2B, S3B, and S5) and BMDMs (Figures 5 and S1D) were stimulated with native LDLs, Ox-LDLs, and MpOx-LDLs. Incubation in RPMI medium devoid of LDLs was also performed and the level of expression of the polarization markers in M0 RPMI incubated cells was used as the reference condition.

First, our data show that, in particular for M1 and M2 cells, marker gene overexpression is maintained compared



(a)



(b)

FIGURE 2: Continued.

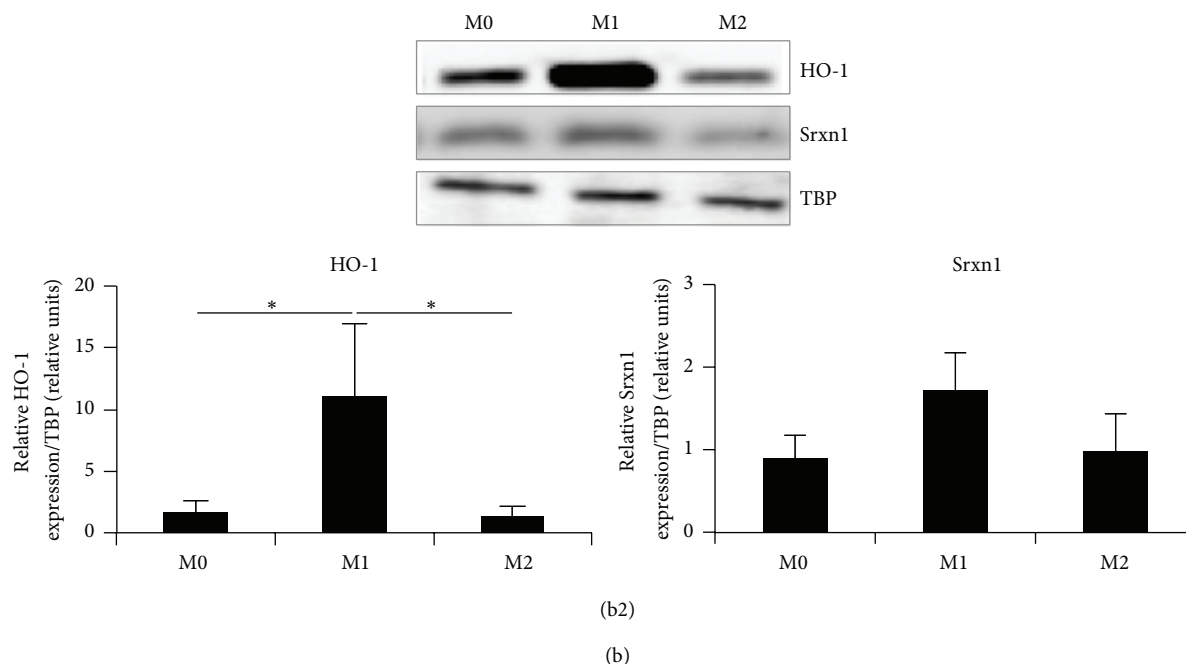


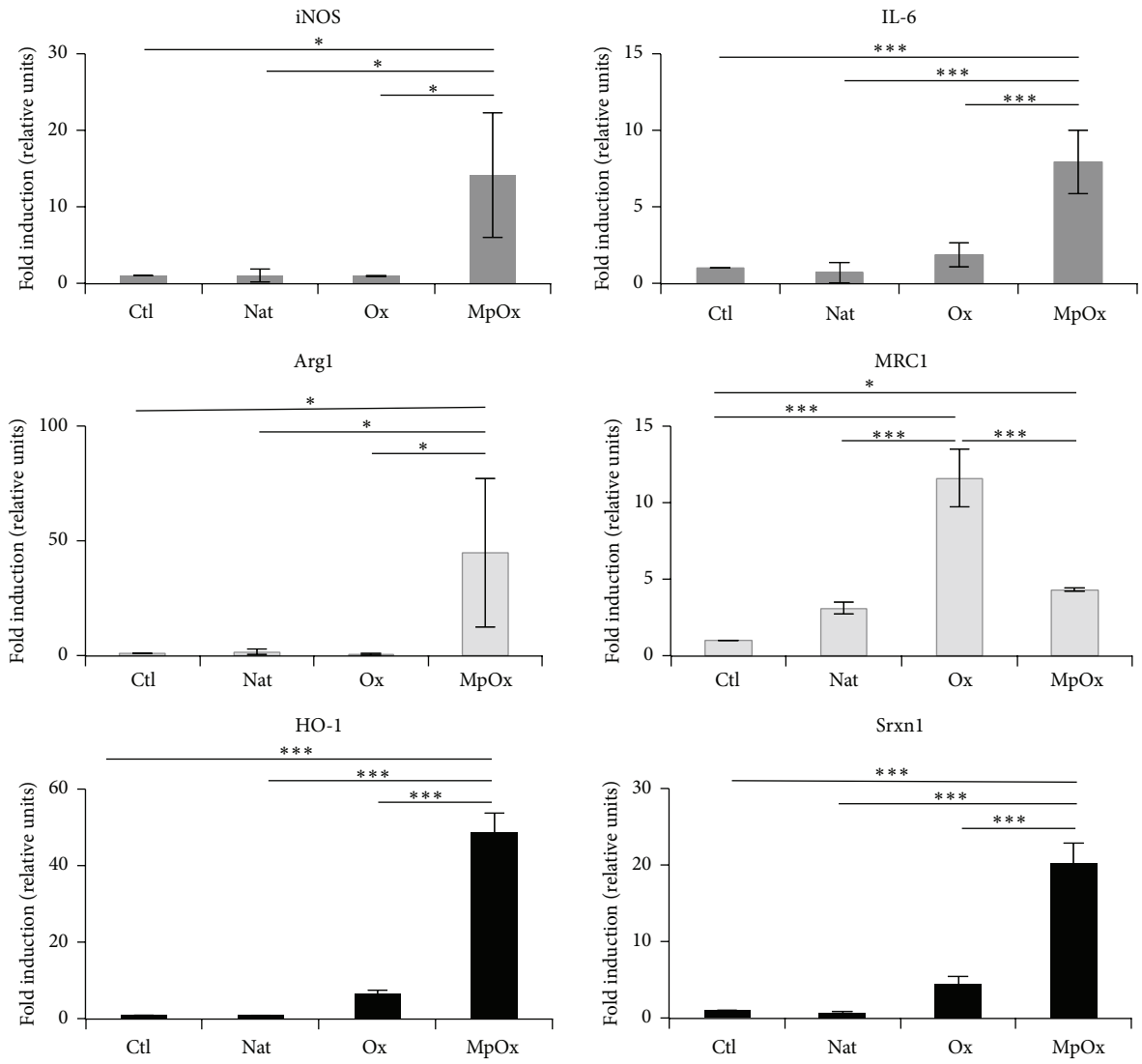
FIGURE 2: Characterization of M0, M1, and M2 polarized BMDMs. (a) Expression of polarization marker genes at the mRNA level (RT-qPCR) in M0, M1, and M2 macrophages. The expression of marker genes was analyzed as described in Figure 1 and the data were expressed as mean fold induction relatively to M0 cells \pm SD ($n = 3$). (b) Expression of polarization markers at the protein level in M0, M1, and M2 macrophages. (b1) Production of secreted IL-6 (M1 marker) in cell culture supernatants assessed by ELISA. Data are expressed relatively per μ g of protein per well as mean \pm SD ($n = 3$). (b2) Expression of HO-1 and Srxn1 assessed by Western blotting in M0, M1, and M2 macrophages. Data are normalized with TBP used as loading control and expressed as mean \pm SD ($n = 4$). Results are representative of 4 independent experiments. ANOVA 1: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

to M0 cells whatever the treatment. However, LDLs, and in particular MpOx-LDLs, seem to exert some modulatory effects. As there is no interaction between variables, we were able to look at the main effects for M1 and for M2 cells. Regarding the proinflammatory markers, we can conclude that *iNOS* expression in M1 cells seemed to be affected by MpOx-LDLs, especially in RAW 264.7 cells, but not by Ox-LDLs (RAW 264.7: MpOx-LDLs versus RPMI $p < 0.001$, Ox-LDLs versus RPMI $p > 0.05$; BMDMs: $p > 0.05$), while *IL-6* mRNA abundance was in general decreased in the presence of LDLs (RAW 264.7: Nat-LDLs versus RPMI $p < 0.05$, Ox-LDLs versus RPMI $p < 0.05$, and MpOx-LDLs versus RPMI $p > 0.05$; BMDMs: Nat-LDLs versus RPMI $p < 0.001$, Ox-LDLs versus RPMI $p < 0.001$, and MpOx-LDLs versus RPMI $p < 0.001$) (Figures 4(a) and 5(a)), although this difference was not confirmed at the protein level (Figures 4(b) and 5(b)). Interestingly, we observed the same effects, as for *IL-6*, with *TNF- α* at the mRNA level (Nat-LDLs versus RPMI $p < 0.05$, Ox-LDLs versus RPMI $p < 0.05$, and MpOx-LDLs versus RPMI $p < 0.01$) (Figure S2B). The mRNA expression of *Arg2* was maintained in M1 macrophages whatever the treatment (native or modified LDLs versus RPMI $p > 0.05$) (Figure S2B). At the protein level, the abundance of IL-6, IL-12, and *TNF- α* was maintained in M1 RAW 264.7 cells whatever the treatment ($p > 0.05$) (Figures 4(b1) and S3B). As well as for M1 cells, we looked for the main effects on M2 cells. The expression of *Arg1*, an anti-inflammatory gene and M2 marker, appears to be reinforced both in RAW 264.7

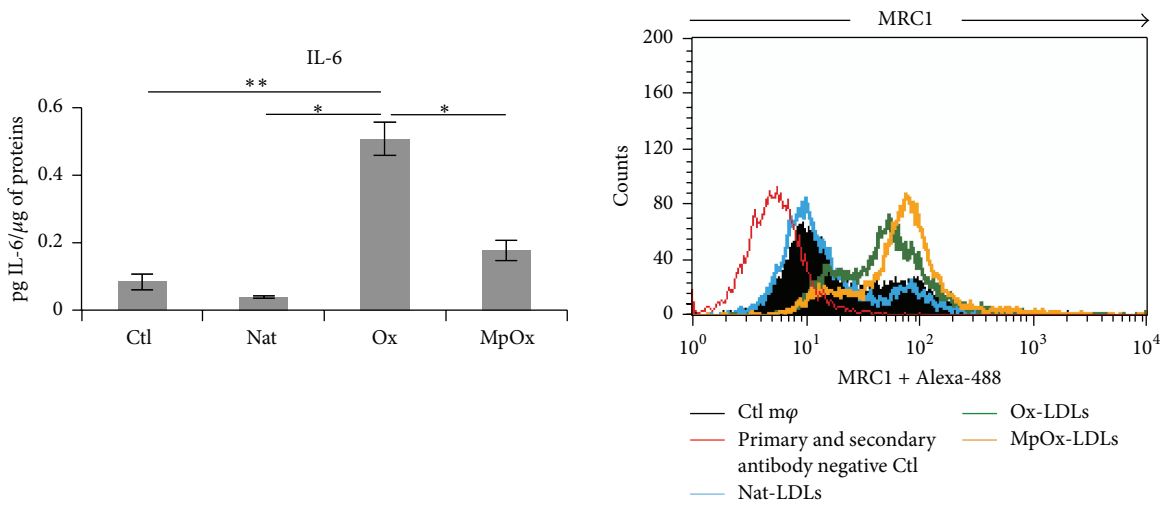
(Figure 4(a)) and in bone marrow-derived (Figure 5(a)) M2 macrophages incubated with MpOx-LDLs ($p < 0.001$) but not in the presence of Ox-LDLs ($p > 0.05$) (Figures 4(a) and 5(a)). When compared to results of *Arg1* expression, the effects of MpOx-LDLs on *MRC1* expression in M2 cells were similar in BMDMs but were less clear in RAW 264.7 cells ($p > 0.05$). Furthermore, when zooming Figure 4(a) (in Figure S5), we observed that MpOx-LDLs also slightly induced *Arg1* ($p < 0.001$) and *MRC1* ($p > 0.05$, with similar patterns between replicates; except in M0: $p < 0.05$) in M0 and M1 macrophages.

At the protein level (Figure S3B), we also observed that MpOx-LDLs induce an increased secretion of IL-10 in M0 cells (MpOx-LDLs versus RPMI $p < 0.01$). In M1 cells, there seems to be a similar trend, but the effect is not significant ($p > 0.05$) probably because of the prevalent proinflammatory effect of LPS. Interestingly, in IFN- γ -treated macrophages, we also observed a significant induction of IL-10 (data not shown), confirming the anti-inflammatory properties of MpOx-LDLs. The expression of IL-10 was maintained in M2 macrophages whatever the treatment ($p > 0.05$). There were no major noticeable effects for IL-12 or *TNF- α* whatever the treatment.

In bone marrow-derived macrophages, it has to be mentioned that M0 macrophages, possibly due to the presence of M-CSF in the differentiation medium, expressed *MRC1* at both the mRNA level (Figure 5(a)) and at protein level (data not shown) [29, 37, 38]. By looking at the main effects for the



(a)



(b1)

(b2)

FIGURE 3: Continued.

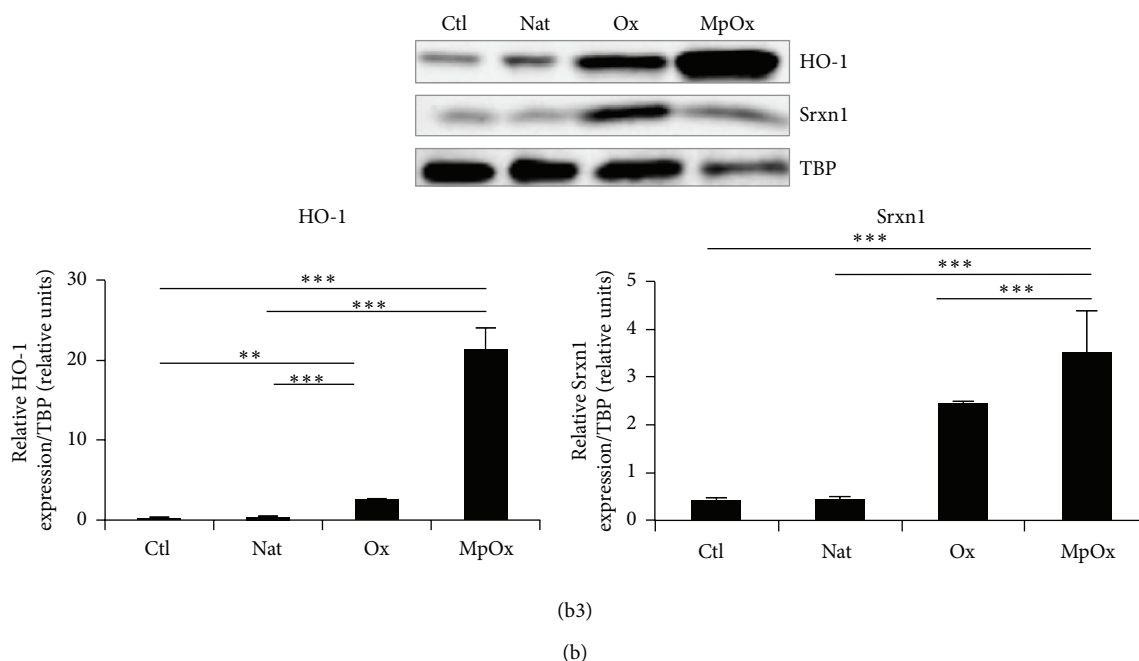


FIGURE 3: Comparative effects of LDLs on marker gene expression in unpolarized RAW 264.7 M0 macrophages. M0 macrophages were treated for 24 hours in the presence of medium alone (Ctl), native LDLs (Nat), Ox-LDLs (Ox), or MpOx-LDLs (MpOx) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a) Expression of polarization marker genes at the mRNA level (RT-qPCR). The expression of marker genes was analyzed by RT-qPCR as in Figure 1. Data are normalized with TBP used as housekeeping gene and expressed as mean fold induction relatively to Ctl cells \pm SD ($n = 3$). (b) Expression of polarization markers at the protein level (FACS, ELISA, and WB) in Ctl and Nat-LDLs-, Ox-LDLs-, and MpOx-LDLs-treated M0 macrophages. (b1). Production of secreted IL-6 (M1 marker) in cell culture supernatants assessed by ELISA. Data are expressed relatively per μg of protein per well as mean \pm SD ($n = 3$). (b2) Surface expression of MRC1 (M2 marker) analyzed by flow cytometry in Ctl and treated macrophages (mp). GMF values are reported in arbitrary units: $\Delta\text{GMF}_{\text{Nat-CTL}}$, 0; $\Delta\text{GMF}_{\text{Ox-CTL}}$, 20.75; and $\Delta\text{GMF}_{\text{MpOx-CTL}}$, 33.82. The data presented are representative of 3 independent experiments. (b3) Expression of HO-1 and Sr xn1 assessed by Western blotting in Ctl and Nat-LDLs-, Ox-LDLs-, and MpOx-LDLs-treated macrophages. Data are normalized with TBP used as loading control and expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Results are representative of 3 independent experiments. ANOVA 1: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$.

following conditions because there is no interaction between variables, we can conclude that *MRC1* expression is low in M1 cells (RAW 264.7: $p < 0.001$; BMDMs: $p < 0.001$) but is maintained in M2 cells (RAW 264.7: $p < 0.001$; BMDMs: $p > 0.05$) with no significant effect of any kind of LDLs (Figure 5(a)).

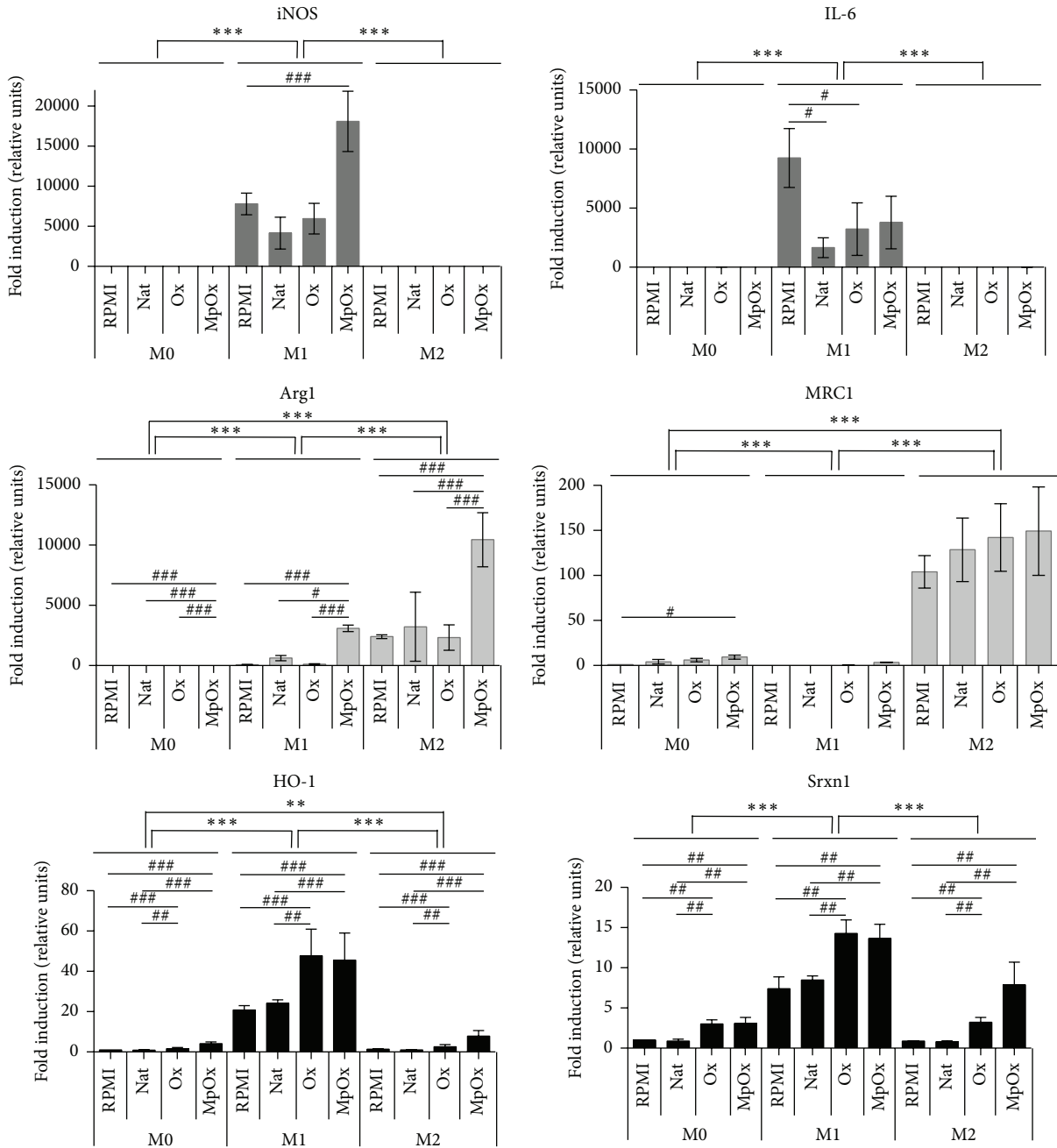
The expression of two other M2 markers, *Mgl2* and *YMI*, was evaluated in M0, M1, and M2 macrophages incubated with oxidized LDLs or not (Figures S1C and S1D). However, only *YMI* expression in RAW 264.7 cells was increased by MpOx-LDLs whatever the phenotype ($p < 0.05$ in M1 and M2 cells) (Figure S1C). The effects of MpOx-LDLs on *YMI* expression were less clear in BMDMs (Figure S1D).

Regarding the *Nrf2* driven genes, so-called MOX gene markers, our data clearly show that they are less specific. Comparing the main effects between the different phenotypes, we can come to the conclusion that M1 cells (RAW 264.7 and BMDMs) clearly strongly overexpress *HO-1* (RAW 264.7: $p < 0.001$; BMDMs: $p < 0.001$), probably due to the presence of LPS [39–41]. This overexpression is, however, reinforced in the presence of oxidized LDLs (in those conditions, RAW 264.7: $p < 0.001$; BMDMs: Ox-LDLs versus RPMI $p > 0.05$, MpOx-LDLs versus RPMI $p < 0.05$). It has to be mentioned that we also observe a slight induction

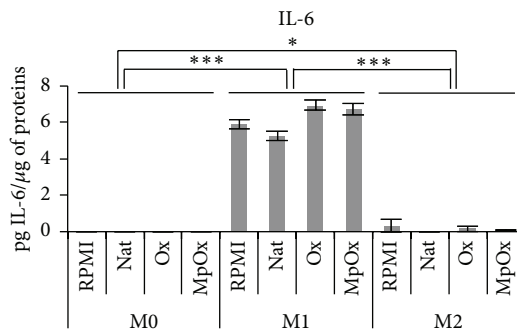
of *HO-1* in M0 and M2 cells treated with oxidized LDLs, known to activate *Nrf2*, compared to RPMI medium and native LDLs (in M0 and M2 cells treated either with Ox-LDLs (RAW 264.7 cells: $p < 0.001$; BMDMs: $p > 0.05$ (M0), $p < 0.05$ (M2)) or with MpOx-LDLs (RAW 264.7: $p < 0.001$; BMDMs: $p < 0.05$)), which was confirmed at the protein level (Figure 4(b2) for RAW 264.7 cells and Figure 5(b2) for BMDMs).

We observed partially the same trend for *Srxn1* at least in RAW 264.7 polarized macrophages at the mRNA level ($p < 0.01$) (Figure 4(a)). In (un)polarized BMDMs, the effects of (un)modified LDLs on *Srxn1* expression were less clear (Figures 5(a) and 5(b2)).

Finally, we wanted to check to what extent LDLs were able to modulate the phagocytosis potential of (un)polarized macrophages (Figure S6). M1 cells seemed slightly more efficient (nonsignificant) to internalize beads, which is in agreement with their functions. It has to be mentioned that *Fc γ R3*, one of the potential receptors for the IgG coated latex beads, is overexpressed in M1 macrophages, compared to M0 and M2 RAW 264.7 macrophages (data not shown) [42, 43]. However, we were unable to demonstrate any effect of LDLs on this process whatever the macrophage source or phenotype. A similar trend, although less pronounced, was observed in BMDMs (Figure S6B).



(a)



(b1)

FIGURE 4: Continued.

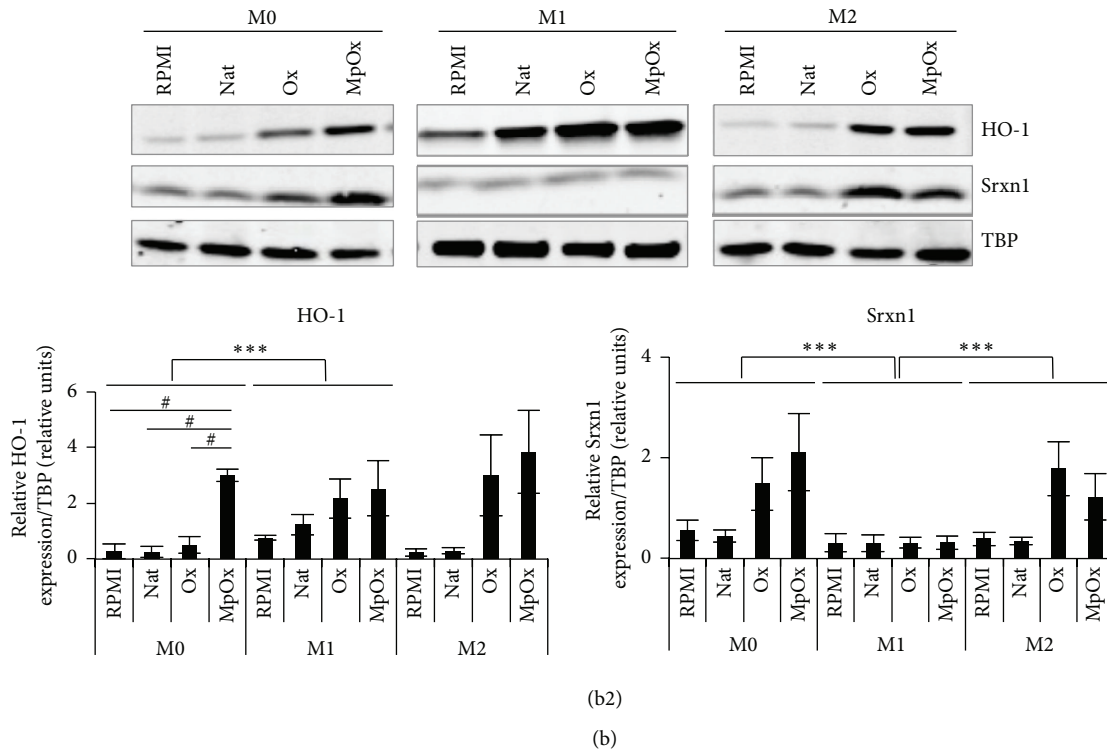


FIGURE 4: Comparative effects of LDLs on (un)polarized RAW 264.7 macrophages. M0, M1, and M2 macrophages were stimulated in the presence or absence (RPMI control) of Nat-LDLs, Ox-LDLs, and MpOx-LDLs for 24 hours (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a) Expression of polarization marker genes at the mRNA level (RT-qPCR). The expression of marker genes was analyzed by RT-qPCR as described in Figure 1. Data are normalized with TBP used as housekeeping gene and expressed as mean fold induction relatively to M0 cells in RPMI \pm SD ($n = 6$). Data for *MRC1* were analyzed by a Kruskal-Wallis ANOVA on ranks. Zoomed data for *Arg1* and *MRC1* are presented in Figure S5. (b) Expression of polarization marker genes at the protein level (ELISA; WB). (b1) Production of secreted IL-6 (M1 marker) in cell culture supernatants assessed by ELISA. Data are expressed relatively per μg of protein per well as mean \pm SD ($n = 3$). (b2) Expression of HO-1 and Srxn1 assessed by Western blotting. Data are normalized with TBP used as loading control and expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Results are representative of 3 independent experiments. ANOVA 2: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$.

3.4. Comparative Effects of (Un)Modified LDLs on the Differentiation of Polarized Macrophages into Foam Cells. Macrophage differentiation into foam cells was evaluated by measuring the number and the size of these lipid droplets per cell in RAW 264.7 cells (Figure 6) and in BMDMs (Figure 7(a)). MpOx-LDLs were the most efficient to induce lipid accumulation in M0 and M2 macrophages when compared to native LDLs and Ox-LDLs. M1 cells, contrary to the other phenotypes, engulfed not only oxidized but also native LDLs, probably due to their oxidative metabolism. The mean surface areas of lipid droplets within these cells were consistent with the data presented in Figures 6 and 7(a) (data not shown). Similar results were obtained on RAW 264.7 cells (Figure 6) and on BMDMs (Figure 7(a)).

We also evaluated the intracellular cholesterol content. In BMDMs (Figure 7(b)), the intracellular content of cholesterol increased in the presence of oxidized LDLs, which is in agreement with the data on lipid droplets (Figure 7(a)), with MpOx-LDLs being the most efficient to contribute to the increase of intracellular cholesterol.

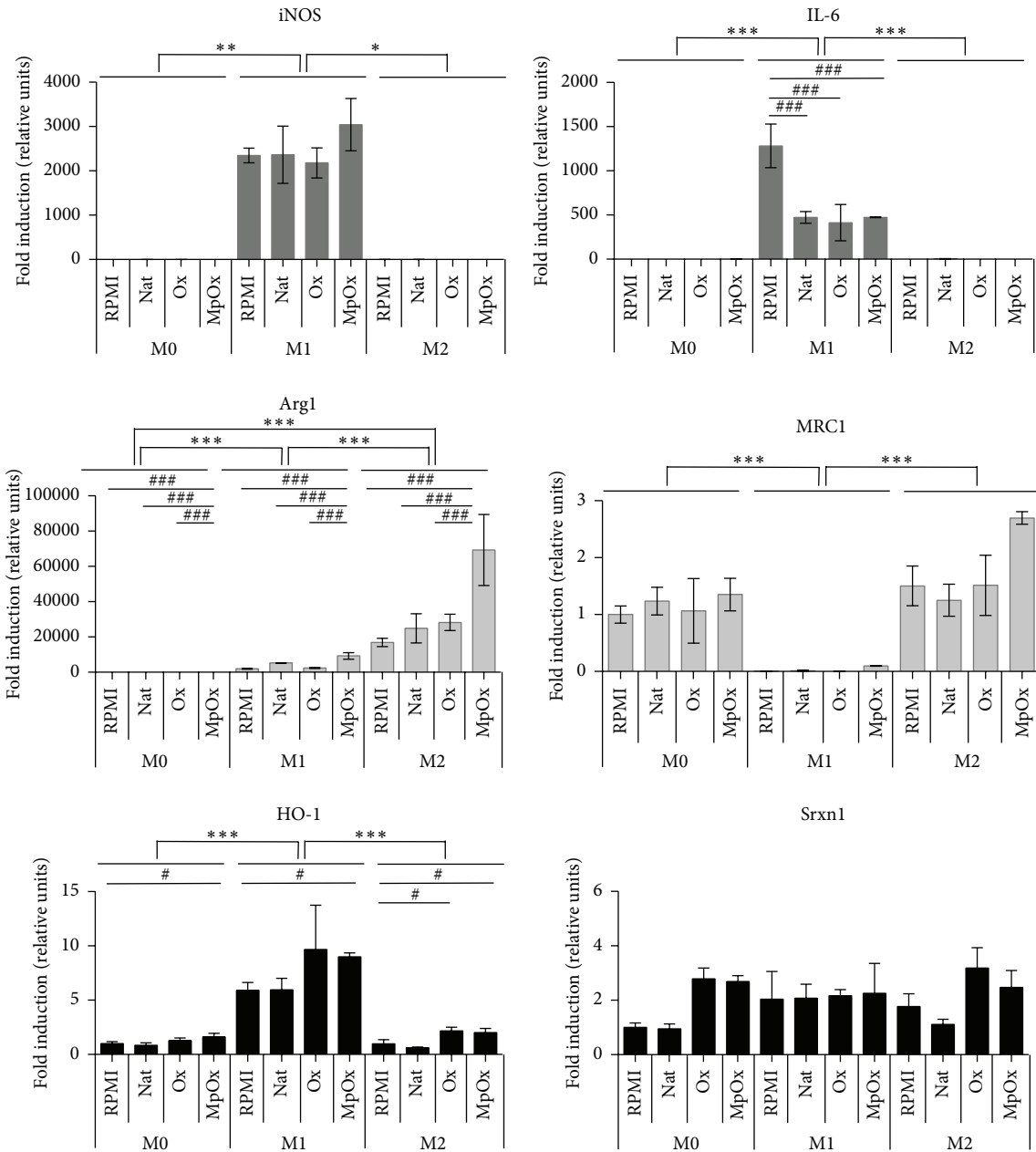
However, in RAW 264.7 macrophages, no significant differences were observed. This discrepancy could be explained by a high basal content of cholesterol (8-fold compared to

BMDMs). Because of this high basal content, small variations in intracellular cholesterol, after endocytosis, would be difficult to assess due to a lack of sensitivity of the assay (data not shown).

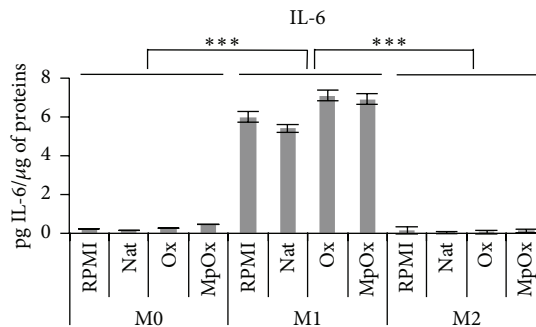
4. Discussion

In the present study, we showed that RAW 264.7 macrophages, commonly used as a model in studies related to atherosclerosis and prone to differentiate into foam cells [8, 44–46], can be polarized towards M1 and M2 phenotypes. Furthermore, we showed that MpOx-LDLs were the most efficient to interfere with macrophage polarization and enhance an anti-inflammatory and antioxidant phenotype.

Macrophages, and more specifically foam cells, are considered as key players in the initiation and the evolution of atherosclerotic lesions, by building up the lesion and taking part in the amplification of the inflammatory response (e.g., production of proinflammatory cytokines and growth factors) [5, 47]. However, macrophages are heterogeneous and it is only recently that the polarization of macrophages has been considered in this context not only in murine models [22, 30] but also in human lesions [48, 49]. The



(a)



(b)

FIGURE 5: Continued.

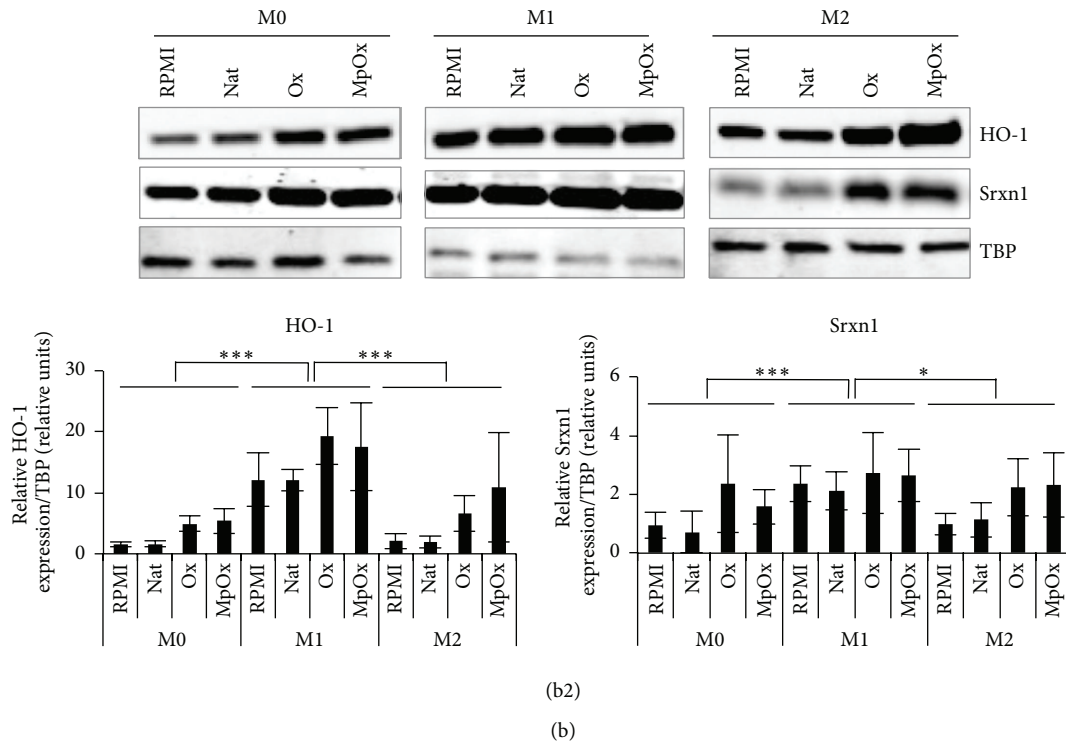


FIGURE 5: Comparative effects of LDLs on (un)polarized BMDMs. M0, M1, and M2 macrophages were stimulated in the presence or absence (RPMI control) of Nat-LDLs, Ox-LDLs, and MpOx-LDLs for 24 hours (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a) Expression of polarization marker genes at the mRNA level (RT-qPCR). The expression of marker genes was analyzed by RT-qPCR as described in the preceding figures. Data are normalized with TBP used as housekeeping gene and expressed as mean fold induction relatively to M0 cells in RPMI \pm SD ($n = 5$). Data were analyzed by a Kruskal-Wallis ANOVA on ranks (except for *Arg1* and *IL-6*: two-way ANOVA test). (b) Expression of polarization markers at the protein level (ELISA; WB). (b1) Production of secreted IL-6 (M1 marker) in cell culture supernatants assessed by ELISA. Data are expressed relatively per μg of protein per well as mean \pm SD ($n = 3$). (b2) Expression of HO-1 and Srnx1 assessed by Western blotting. Data are normalized with TBP used as loading control and expressed as mean \pm SD ($n = 4$). Results are representative of 4 independent experiments. ANOVA 2: * $\#p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $\#\#p < 0.001$.

significance of macrophage polarization in atherogenesis and the identity of the major microenvironmental factors present in the lesion that drive macrophage polarization, as the lesion evolves, remain, however, largely unknown [7, 49–51].

Macrophage polarization has been mainly characterized *in vitro* using different models. Khallou-Laschet and coworkers obtained polarized macrophages from bone marrow-derived cells of 6-to-10-week-old C57BL/6 or ApoE^{-/-} mice [30]. Lopez-Castej3n et al. polarized peritoneal macrophages isolated from C57BL/6 mice [31, 52]. Human circulating monocytes isolated from healthy human donors and differentiated into macrophages by adding M-CSF to the culture medium were polarized into M1 and M2 cells [32, 53]. Human macrophages differentiated from monocytic THP-1 cells (see, for instance, [54]) or derived from induced pluripotent stem cells have also been polarized [19].

Macrophage activation and polarization are complex phenomena giving rise to confusing descriptors in the literature. Recently, a group of macrophage biologists proposed “Nomenclature and Experimental Guidelines” for a consensus macrophage activation/polarization nomenclature. In this paper, we maintained the classical M1 and M2 nomenclature, considering that it can be translated by M(LPS + IFN- γ) and M(IL-4 + IL-13) macrophages, respectively [26].

In this study, RAW 264.7 cells and BMDMs were polarized into M1 macrophages, after 18 hours of stimulation with LPS and IFN- γ , while the M2 phenotype was obtained with IL-4 and IL-13, using well-described protocols [22], except for the LPS concentration, which was reduced to 10 ng/mL to limit cytotoxicity (data not shown). IFN- γ alone, compared to the LPS + IFN- γ cocktail, was unable to polarize RAW 264.7 cells into M1 cells, with TNF- α being the only M1 marker gene slightly induced, with increased production of secreted TNF- α , which is in agreement with the data of our group on THP-1 derived macrophages [54].

Polarization was assessed by monitoring the expression of several specific marker genes mainly at the mRNA level and also at the protein level for some markers. *iNOS*, *IL-6*, *Arg2*, *TNF- α* , and *IL-12* were chosen as proinflammatory M1 markers, *Arg1*, *MRC1*, *Mgl2*, *YMI*, and *IL-10* were chosen as M2 markers, and *HO-1* and *Srxn1* were chosen as MOX and redox-sensitive markers [30–33], although we are aware that, whatever the model used, M1 and M2 cells represent two extremes of a spectrum of macrophage functions.

Our results in RAW 264.7 macrophages were consistent with data obtained with murine bone marrow-derived macrophages from the study of Khallou-Laschet et al. in 2010 [30] and with BMDMs characterized in this study

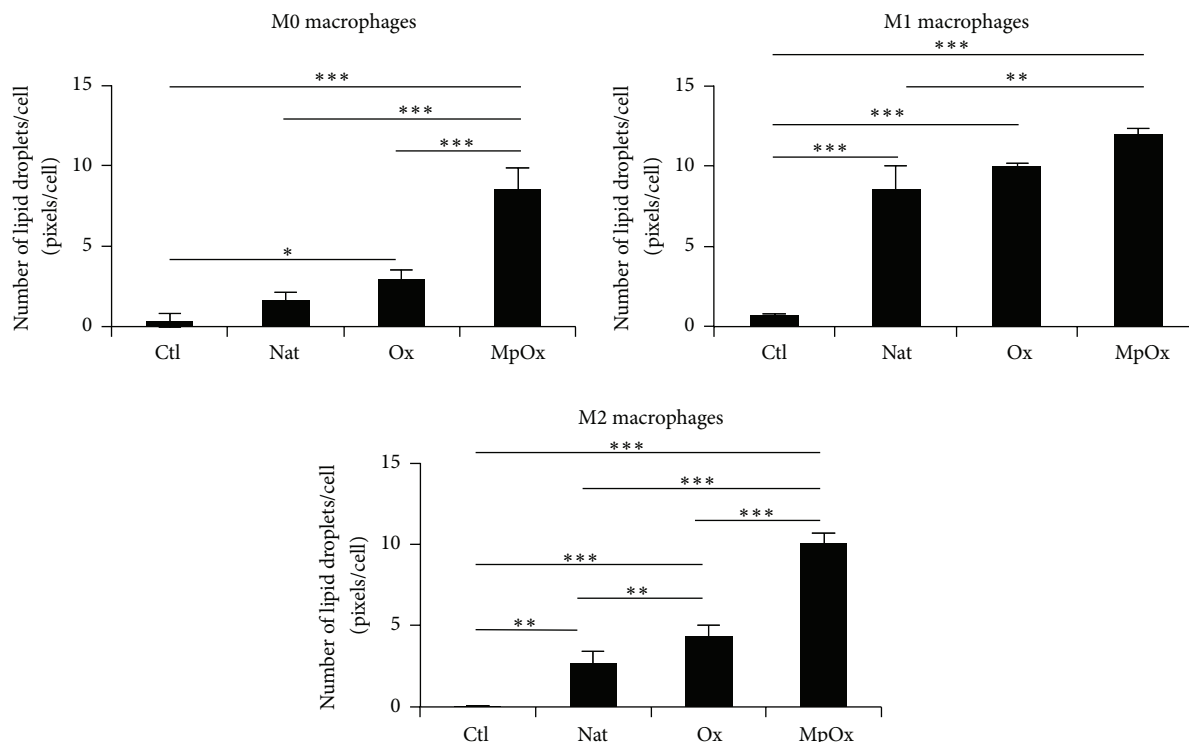


FIGURE 6: Comparative effects of LDLs on (un)polarized RAW 264.7 macrophages to induce foam cells. M0, M1, and M2 macrophages were incubated in the presence or absence of Nat-LDLs, Ox-LDLs, and MpOx-LDLs (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours. The number of lipid droplets was estimated using a High Content Imager, as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). ANOVA 1: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$.

(Figure 2). Indeed, as Khallou-Laschet et al., we observed an overexpression of not only *iNOS* and *IL-6* but also *Arg2*, *TNF- α* , and *IL-12* in M1 macrophages. M2 cells overexpressed *Arg1* and *MRC1* as well as *Mgl2*, *YMI*, and *IL-10*, often considered as canonical M2 markers, at least in mice (for *Arg1*, *Mgl2*, and *YMI*) [30, 55].

In addition to avoiding bone marrow or elicited peritoneal macrophage isolation from mice and being useful and convenient in studies related to atherosclerosis, the RAW 264.7 polarized macrophages could also be used in the context of other chronic inflammatory diseases including cancer, particularly to dissect signaling mechanisms or design coculture models.

Once this model of polarized macrophages was validated, we investigated the effects of native LDLs or oxidized LDLs on macrophage polarization, since LDLs play a major role in atherogenesis and in particular oxidized LDLs [56, 57]. The latter accumulating in the lesion could contribute to changes into the macrophage microenvironment modulating their phenotypes and functions. Within the lesion, oxidized LDLs are recognized by scavenger receptors (e.g., CD36, SR-A1, and LOX-1), mainly expressed by macrophages, leading to the internalization of modified LDLs. Scavenger receptors, contrary to the native LDL receptors, are not regulated by intracellular cholesterol, contributing to unregulated lipid loading, leading to foam cells [5, 58]. But how oxidized LDLs interfere with macrophage polarization remains largely unexplored. By the way, most of the available data is focused

on copper-oxidized LDLs, oxidized at both the protein and lipid moieties and particularly enriched in lipid hydroperoxides. Hirose et al. (2011) evaluated the effects of Ox-LDLs on human polarized macrophages, using microarrays, but after 6 hours of incubation, which clearly affects the expression profiles differentially in M0, M1, and M2 cells but remains short for assessing polarizing effects, requiring periods of time of at least 18 hours. It has to be mentioned that only copper-oxidized LDLs were evaluated and gene expression was assessed exclusively at the mRNA level [32]. Isa et al. (2011) also assessed the impact of Ox-LDLs on human polarized macrophages. They determined that M2 macrophages are more sensitive to the lipotoxicity induced by Ox-LDLs, as compared to M0 macrophages and to monocytes. Anew, in the latter study, only copper-oxidized LDLs were evaluated and only M0 and M2 macrophages were taken into account [59]. van Tits et al. (2011) have shown that Ox-LDLs enhance proinflammatory responses stimulated by LPS in human M2 macrophages, which is in agreement with our data showing proinflammatory effects of Ox-LDLs. They hypothesized that this phenotypic switch could play a role in atherogenesis, but, again in this study, only copper-oxidized LDLs were used [51]. However, other oxidized forms of LDLs, probably more relevant, have been described, such as myeloperoxidase-oxidized LDLs [60, 61]. The latter display specific modifications of Apo-B100 and their lipid hydroperoxide content remains low [36]. Calay et al. already showed that Ox-LDLs and MpOx-LDLs induce

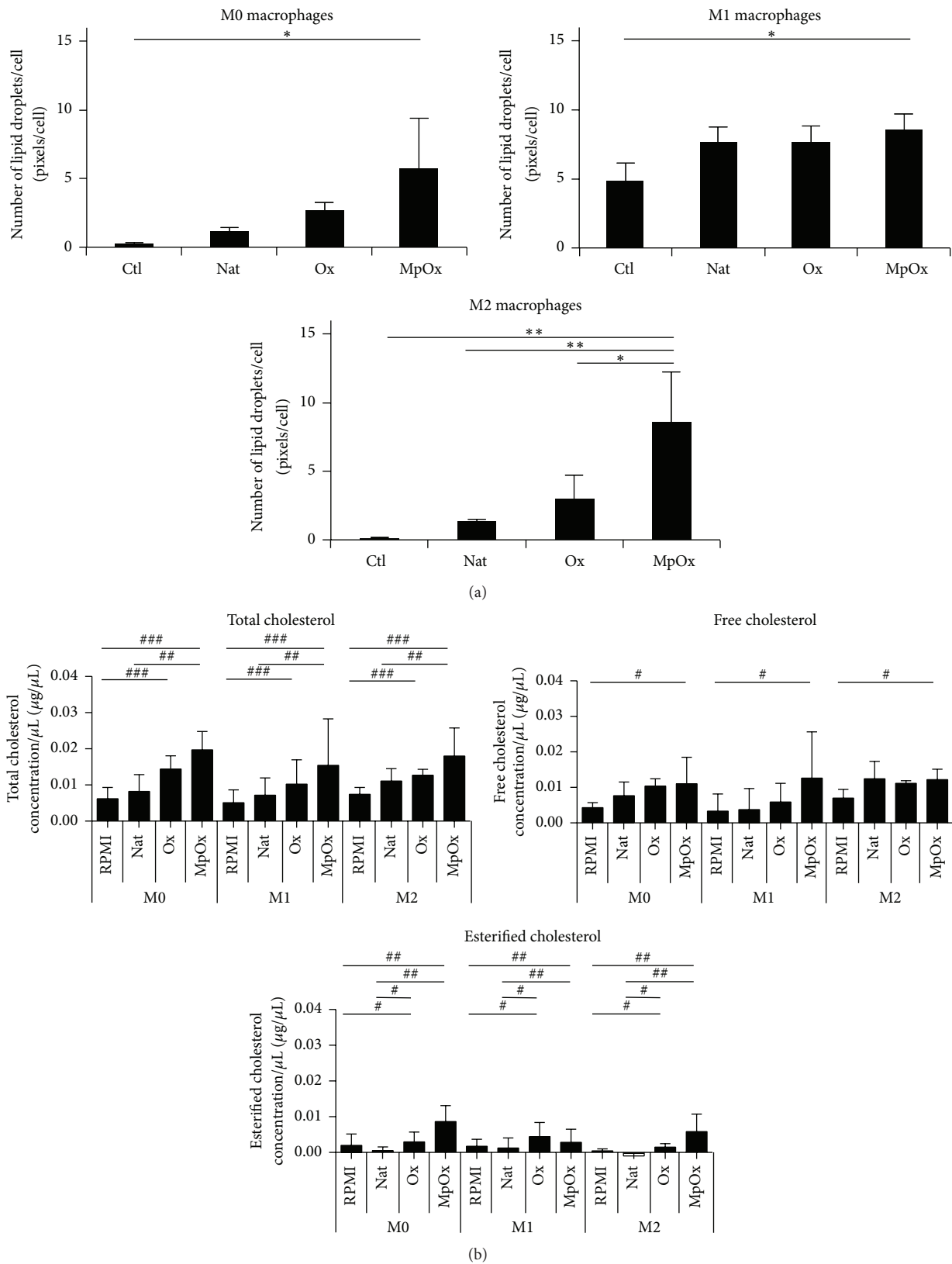


FIGURE 7: Comparative effects of LDLs on (un)polarized BMDMs to induce foam cells. (a) M0, M1, and M2 macrophages were incubated in the presence or absence of Nat-LDLs, Ox-LDLs, and MpOx-LDLs (100 µg/mL) for 24 hours. The number of lipid droplets was estimated using a High Content Imager, as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean ± SD ($n = 4$). ANOVA 1: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$. (b) Intracellular cholesterol content in M0, M1, and M2 macrophages incubated in the presence or absence of Nat-LDLs, Ox-LDLs, and MpOx-LDLs for 24 hours. The intracellular cholesterol was measured by a colorimetric assay (absorbance: 570 nm). Data are expressed as µg/µL of free, esterified, and total cholesterol (mean ± SD ($n = 3$)). Data were analyzed by a Kruskal-Wallis ANOVA on ranks. ANOVA 1: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

different responses in RAW 264.7 unpolarized macrophages, with MpOx-LDLs being the most potent in activating Nrf2 and in lipid loading [8]. That is why we wanted to pursue this comparative study on Ox-LDLs and MpOx-LDLs but taking into account the macrophage phenotype.

In this study, we first wondered whether oxidized LDLs could by themselves polarize macrophages, given the paucity of available data. From our data, we can conclude that oxidized LDLs do not lead to a defined polarized phenotype. However, the expression of several marker genes is affected in particular by MpOx-LDLs which favor the expression of not only both redox-sensitive and M2 marker genes but also M1 marker genes. Calay et al. have already shown that MpOx-LDLs more efficiently activate Nrf2, at least in M0 cells, but further studies will be required to unravel more in detail the signaling pathways activated by different kinds of oxidized LDLs in macrophages [8, 62]. Our data suggest that qualitative differences in LDL composition in the atheroma could modulate macrophage polarization and play a role in the evolution of the lesion. Khallou-Laschet and coworkers showed that M2 macrophages were predominant in early atherosclerotic lesions of ApoE KO mice, while M1 macrophages were the predominant phenotype in advanced lesions. It remains unclear whether M2 macrophages are progressively replaced by M1 cells or whether there is a phenotypic switch [30]. However, data from Davis recently showed that *in vitro* macrophages could be able to repolarize by themselves in response to changes in the microenvironment (e.g., cytokines) in the context of an infection with *Cryptococcus neoformans* [63]. It will be worthwhile in the future to confirm the phenotypic distribution of macrophages in atheromas taking into account the M1 and M2 cells in lesions using alternative murine models closer to the human situation.

We then evaluated the effects of LDLs on polarized macrophages, focusing on marker gene expression. Regarding M1 cells, we observe no major effect of LDLs, whether oxidized or not, neither on the expression of *iNOS* (mRNA) (except for an increased *iNOS* expression in M1 cells in the presence of MpOx-LDLs) nor on the expression of IL-6 (protein). However, in RAW 264.7 M0 cells, MpOx-LDLs, contrary to Ox-LDLs, seemed to induce an overexpression of *Arg1*, *MRC1* (mRNA), and IL-10 (protein) well described as M2 markers and anti-inflammatory genes [64]. In M1 macrophages, *Arg1* was significantly overexpressed in the presence of MpOx-LDLs. The M2 phenotype is generally maintained (Nat-LDLs and Ox-LDLs) or even reinforced (MpOx-LDLs) regarding *MRC1*, *Arg1*, and *YMI* expression and IL-10 secretion, with some variations between RAW 264.7 cells and BMDMs. Interestingly, oxidized LDLs also favor the expression of the protective antioxidant enzymes HO-1 and Srxn1 not only in M1 cells but also in M0 and M2 cells, in particular for MpOx-LDLs in RAW 264.7 cells. When comparing quantitatively RAW 264.7 macrophages and BMDMs, the response in BMDMs was less pronounced. We cannot exclude the fact that BMDMs would have already initiated M2 polarization due to the presence of M-CSF in the macrophage-differentiation conditioned medium.

Polarized macrophages (RAW 264.7 or BMDMs) also showed an important ability to become foam cells when incubated with oxidized LDLs (Figures 6 and 7). Our data suggest that M1 and M2 macrophages have a high potential to engulf lipids, in particular when they are stimulated with MpOx-LDLs. Surprisingly, in addition to taking up oxidized LDLs, M1 macrophages also engulf native LDLs (Figure 6). This phenomenon could be explained by their likely exacerbated oxidative metabolism activated by LPS. As a consequence, this could lead to oxidation of Nat-LDLs during the 24-hour incubation, allowing their intracellular accumulation [12, 15]. While the cholesterol content increased in BMDMs incubated with LDLs (Figure 7(b)), this could not be demonstrated in RAW 264.7 cells.

Our data show that the number (and size) of lipid droplets is higher in macrophages incubated with MpOx-LDLs whatever the phenotype in both RAW 264.7 cells and BMDMs. Figure 7(b) shows that, in BMDMs, total cholesterol is also comparable in MpOx-LDLs-treated BMDMs whatever the phenotype. These data suggest that the uptake of MpOx-LDLs by itself is not sufficient to explain the changes in gene expression. One possible hypothesis that could explain our data (at least in part) could be the presence of different combinations of miRNAs. Polarized macrophages display different miRNA profiles ([65, 66] both on human monocyte-derived macrophages). Oxidized LDLs also affect miRNA profiles [62]. But, to our knowledge, there are no data comparing miRNA expression profiles in macrophages taking into account both the macrophage phenotype and different LDL oxidation protocols. But one can imagine that some of the anti-inflammatory and antioxidant effects induced by MpOx-LDLs we observe could be explained by different miRNA combinations resulting from the polarization process and varying according to the type of LDLs used (Nat-LDLs, Ox-LDLs, or MpOx-LDLs).

Altogether these data suggest that MpOx-LDLs are rather anti-inflammatory, in particular by favoring the overexpression of *Arg1*, and protective, inducing antioxidant enzymes such as HO-1 and Srxn1, while the effects are less clear for Ox-LDLs. Our data are original, since we could not find any study comparing the effects of Ox-LDLs and MpOx-LDLs on polarized macrophages. LDLs, oxidized or not, did not affect the phagocytosis potential whatever the phenotype in both RAW 264.7 cells and BMDMs.

5. Conclusion

In conclusion, an easy-to-set up and easy-to-use model of polarized RAW 264.7 has been described and used in this study to better distinguish the effects of copper-oxidized and myeloperoxidase-oxidized LDLs on polarized macrophages. Our data suggest that MpOx-LDLs are the most effective in modulating marker gene expression in unpolarized cells and in inducing an anti-inflammatory and anti-oxidant phenotype compared to Ox-LDLs and finally seem also to be the most efficiently cleaned up by the macrophages whatever their phenotype, which is in agreement with the data of Calay et al. (2010) [8] on murine M0 cells and the data of van Tits

et al. (2011) on human M1 and M2 cells [51]. Further studies will be needed in order to determine the specific roles of those macrophages in atherosclerosis (genesis, progression, and regression), taking into account different forms of more relevant oxidized LDLs.

Abbreviations

Arg1:	Arginase-1
Arg2:	Arginase-2
BMDMs:	Bone marrow-derived macrophages
CD36:	Cluster of differentiation 36
DMPC:	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
GM-CSF:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HO-1:	Heme oxygenase-1
IL-4:	Interleukin-4
IL-6:	Interleukin-6
IL-10:	Interleukin-10
IL-12:	Interleukin-12
IL-13:	Interleukin-13
iNOS:	Inducible Nitric Oxide Synthase
LDL-R:	Low-density lipoprotein receptor
LPS:	Lipopolysaccharide
M-CSF:	Macrophage colony-stimulating factor
Nat-LDLs:	Native low-density lipoproteins
M1:	Proinflammatory macrophages or “classically” activated macrophages
M2:	Anti-inflammatory macrophages or “alternatively” activated macrophages
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein-1
Mgl2:	Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2
MOX:	Oxidized phospholipid-induced macrophages
MpOx-LDLs:	Myeloperoxidase-oxidized low-density lipoproteins
MPO:	Myeloperoxidase
MRC1:	Mannose receptor type-C1
Nrf2:	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
Ox-LDLs:	Copper sulfate-oxidized low-density lipoproteins
OxPAPC:	Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphorylcholine
PFA:	Paraformaldehyde

ROS:	Reactive oxygen species
RNS:	Reactive nitrogen species
SR-A1:	Scavenger receptor type A1
Srxn1:	Sulfiredoxin-1
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
WHO:	World Health Organization
YM1:	Beta-N-acetylhexosaminidase, also known as Chil3, chitinase-like protein 3.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Authors’ Contributions

Valérie Pireaux was in charge of the experimental work (with the technical help of Martine Van Steenbrugge) and of the writing of the manuscript. Aude Sauvage supported Valérie Pireaux for the analyses of samples with the high content BD Pathway 855 Imager and for the preparation of oxidized LDLs. Benoît Bihin helped Valérie Pireaux in R programming and in the statistical analyses (two-way ANOVA). Alexandre Rousseau isolated the LDLs. The experimental work was supervised by Martine Raes and Karim Zouaoui Boudjeltia and the writing of the manuscript was supervised by Martine Raes, Karim Zouaoui Boudjeltia, and Pierre Van Antwerpen.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Pierrick Uzureau for his critical proofreading of the manuscript and Dr. Christophe Lelubre for advising on the statistical analyses. This study was in part supported by FSR funding of the University of Namur (UNamur), Belgium, and by FRIA grant and by the FRS-FNRS (Brussels, Belgium) (2.5008.11) for the acquisition of the BD Pathway 855 Imager of the Morphologic platform of the UNamur.

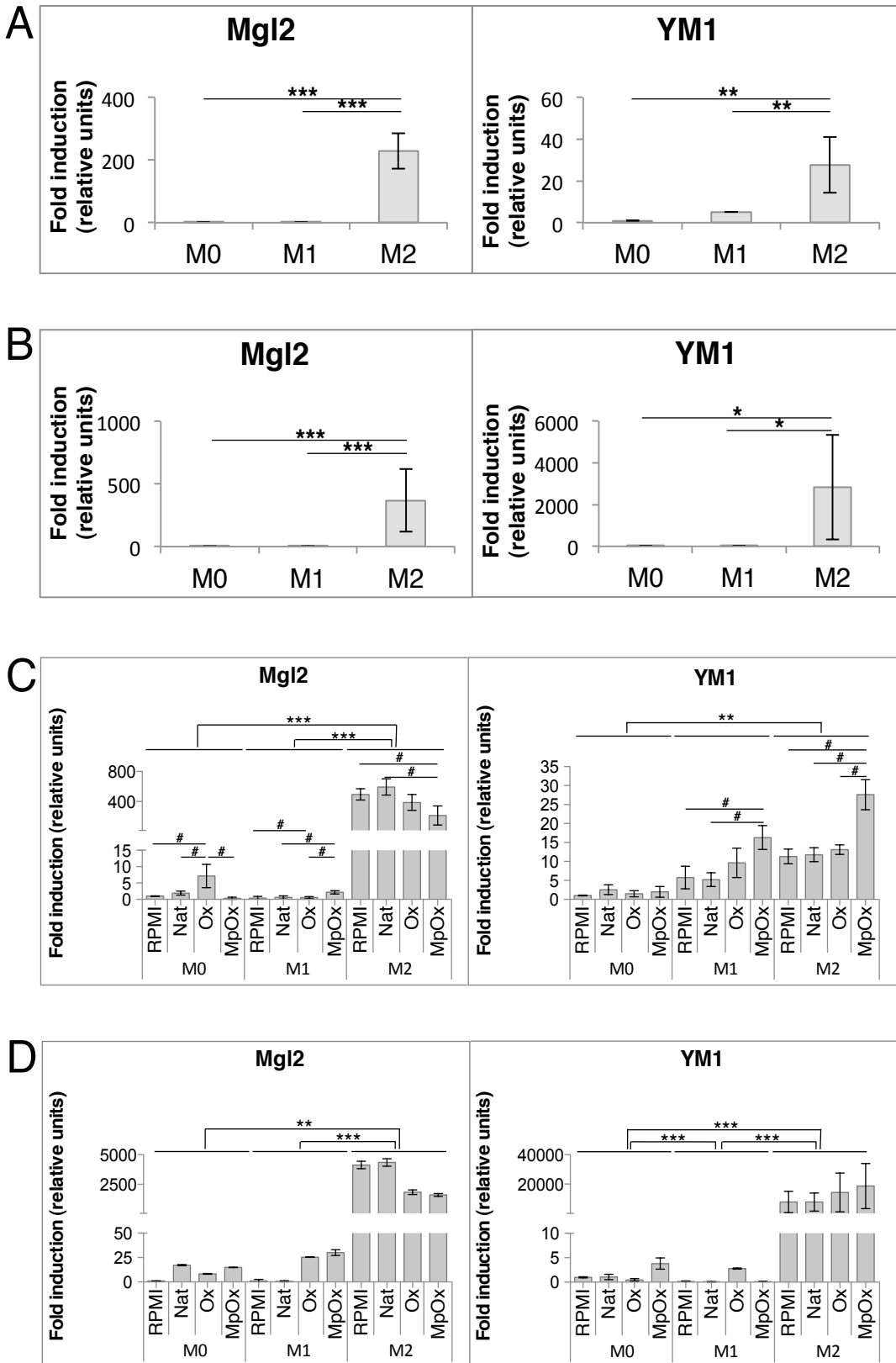
References

- [1] P. Aukrust, B. Halvorsen, A. Yndestad et al., “Chemokines and cardiovascular risk,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, no. 11, pp. 1909–1919, 2008.
- [2] A. J. Lusis, “Atherosclerosis,” *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 233–241, 2000.
- [3] J. Sanz and Z. A. Fayad, “Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease,” *Nature*, vol. 451, no. 7181, pp. 953–957, 2008.
- [4] K. J. Woollard and F. Geissmann, “Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions,” *Nature Reviews Cardiology*, vol. 7, no. 2, pp. 77–86, 2010.
- [5] P. Libby, “Inflammation in atherosclerosis,” *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 868–874, 2002.
- [6] P. Webb, “Alternative macrophage activation and the regulation of metabolism,” *F1000 Biology Reports*, vol. 1, article 2, p. 3, 2009.
- [7] I. M. J. Wolfs, M. M. P. C. Donners, and M. P. J. de Winther, “Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 106, no. 5, pp. 763–771, 2011.

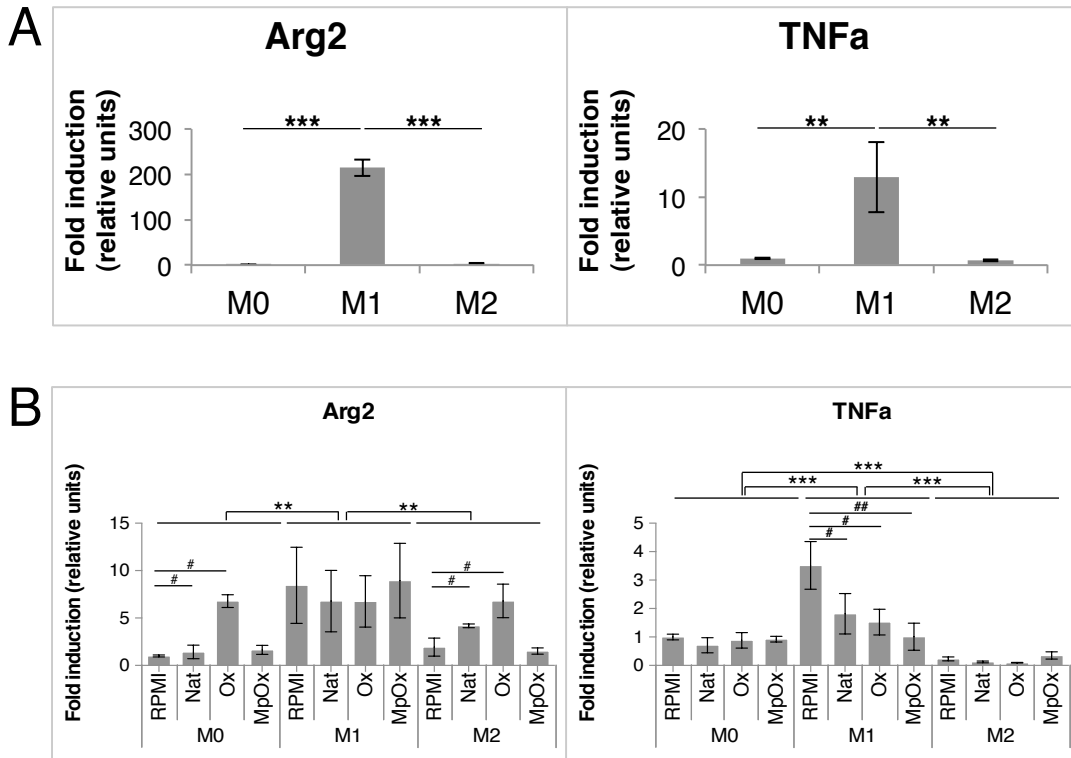
- [8] D. Calay, A. Rousseau, L. Mattart et al., "Copper and myeloperoxidase-modified LDLs activate Nrf2 through different pathways of ROS production in macrophages," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 13, no. 10, pp. 1491–1502, 2010.
- [9] C. K. Glass and J. L. Witztum, "Atherosclerosis: the road ahead," *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 503–516, 2001.
- [10] C. J. Pepine, "Why vascular biology matters," *American Journal of Cardiology*, vol. 88, no. 8, pp. 5K–9K, 2001.
- [11] A. Mantovani, A. Sica, and M. Locati, "Macrophage polarization comes of age," *Immunity*, vol. 23, no. 4, pp. 344–346, 2005.
- [12] J. A. Van Genderachter, K. Movahedi, G. Hassanzadeh Ghassabeh et al., "Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion," *Immunobiology*, vol. 211, no. 6–8, pp. 487–501, 2006.
- [13] Y.-C. Liu, X.-B. Zou, Y.-F. Chai, and Y.-M. Yao, "Macrophage polarization in inflammatory diseases," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 10, no. 5, pp. 520–529, 2014.
- [14] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, 2004.
- [15] A. Mantovani, A. Sica, and M. Locati, "New vistas on macrophage differentiation and activation," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 1, pp. 14–16, 2007.
- [16] D. M. Mosser, "The many faces of macrophage activation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 73, no. 2, pp. 209–212, 2003.
- [17] D. M. Mosser and J. P. Edwards, "Exploring the full spectrum of macrophage activation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969, 2008.
- [18] A. C. Labonte, A.-C. Tosello-Trampont, and Y. S. Hahn, "The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases," *Molecules and Cells*, vol. 37, no. 4, pp. 275–285, 2014.
- [19] K. L. Spiller, E. A. Wrona, S. Romero-Torres et al., "Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization," *Experimental Cell Research*, 2015.
- [20] S. K. Biswas, M. Chittiezath, I. N. Shalova, and J.-Y. Lim, "Macrophage polarization and plasticity in health and disease," *Immunologic Research*, vol. 53, no. 1–3, pp. 11–24, 2012.
- [21] G. Chinetti-Gbaguidi and B. Staels, "Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 22, no. 5, pp. 365–372, 2011.
- [22] A. Kadl, A. K. Meher, P. R. Sharma et al., "Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2," *Circulation Research*, vol. 107, no. 6, pp. 737–746, 2010.
- [23] S. Adamson and N. Leitinger, "Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 22, no. 5, pp. 335–342, 2011.
- [24] S. Akiba, Y. Yoneda, S. Ohno, M. Nemoto, and T. Sato, "Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification," *Journal of Lipid Research*, vol. 44, no. 9, pp. 1676–1685, 2003.
- [25] S. B. Joseph, A. Castrillo, B. A. Laffitte, D. J. Mangelsdorf, and P. Tontonoz, "Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors," *Nature Medicine*, vol. 9, no. 2, pp. 213–219, 2003.
- [26] P. J. Murray, J. E. Allen, S. K. Biswas et al., "Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines," *Immunity*, vol. 41, no. 1, pp. 14–20, 2014.
- [27] W. Ying, P. S. Cheruku, F. W. Bazer, S. H. Safe, and B. Zhou, "Investigation of macrophage polarization using bone marrow derived macrophages," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 76, Article ID e50323, 2013.
- [28] B. K. Davis, "Evaluation of classical, alternative, and regulatory functions of bone marrow-derived macrophages," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1032, pp. 79–89, 2013.
- [29] M. A. P. Oliveira, G. M. A. C. Lima, M. T. Shio, P. J. M. Leenen, and I. A. Abrahamsohn, "Immature macrophages derived from mouse bone marrow produce large amounts of IL-12p40 after LPS stimulation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 74, no. 5, pp. 857–867, 2003.
- [30] J. Khallou-Laschet, A. Varthaman, G. Fornasa et al., "Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 1, Article ID e8852, 2010.
- [31] G. Lopez-Castejón, A. Baroja-Mazo, and P. Pelegrín, "Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 18, pp. 3095–3107, 2011.
- [32] K. Hirose, K. Iwabuchi, K. Shimada et al., "Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages," *Lipids in Health and Disease*, vol. 10, article 1, pp. 1–18, 2011.
- [33] Y. van Kooyk, J. M. Ibarregui, and S. J. van Vliet, "Novel insights into the immunomodulatory role of the dendritic cell and macrophage-expressed C-type lectin MGL," *Immunobiology*, vol. 220, no. 2, pp. 185–192, 2015.
- [34] C. M. Spickett, A. Jerlich, O. M. Panasenkov et al., "The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids," *Acta Biochimica Polonica*, vol. 47, no. 4, pp. 889–899, 2000.
- [35] J. W. Heinecke, "Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis," *American Journal of Cardiology*, vol. 91, no. 3, pp. 12A–16A, 2003.
- [36] K. Z. Boudjeltia, I. Legssyer, P. Van Antwerpen et al., "Triggering of inflammatory response by myeloperoxidase-oxidized LDL," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 84, no. 5, pp. 805–812, 2006.
- [37] M. Jaguin, N. Houlbert, O. Fardel, and V. Lecureur, "Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin," *Cellular Immunology*, vol. 281, no. 1, pp. 51–61, 2013.
- [38] D. Y. S. Vogel, J. E. Glim, A. W. D. Stavenhagen et al., "Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared," *Immunobiology*, vol. 219, no. 9, pp. 695–703, 2014.
- [39] S. A. Rushworth, X.-L. Chen, N. Mackman, R. M. Ogborne, and M. A. O'Connell, "Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C," *Journal of Immunology*, vol. 175, no. 7, pp. 4408–4415, 2005.
- [40] T. Ashino, R. Yamanaka, M. Yamamoto et al., "Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by heme oxygenase-1 induction in macrophages," *Molecular Immunology*, vol. 45, no. 7, pp. 2106–2115, 2008.
- [41] A.-M. Kuhn, N. Tzieply, M. V. Schmidt et al., "Antioxidant signaling via Nrf2 counteracts lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses in foam cell macrophages," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 50, no. 10, pp. 1382–1391, 2011.
- [42] M. Guillemins, P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad, and B. N. Lambrecht, "The function of Fcγ receptors in dendritic cells and

- macrophages,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 2, pp. 94–108, 2014.
- [43] L. Lefèvre, G. Lugo-Villarino, E. Meunier et al., “The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGIRR contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*,” *Immunity*, vol. 38, no. 5, pp. 1038–1049, 2013.
- [44] M. M. Al Gadban, K. J. Smith, F. Soodavar et al., “Differential trafficking of oxidized LDL and oxidized LDL immune complexes in macrophages: impact on oxidative stress,” *PLoS ONE*, vol. 5, no. 9, Article ID e12534, pp. 1–10, 2010.
- [45] Y. Xu, J. Wang, Y. Bao et al., “Identification of two antagonists of the scavenger receptor CD36 using a high-throughput screening model,” *Analytical Biochemistry*, vol. 400, no. 2, pp. 207–212, 2010.
- [46] K.-J. Min, H. J. Um, K.-H. Cho, and T. K. Kwon, “Curcumin inhibits oxLDL-induced CD36 expression and foam cell formation through the inhibition of p38 MAPK phosphorylation,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 58, pp. 77–85, 2013.
- [47] I. M. Fenyó and A. V. Gafencu, “The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis,” *Immunobiology*, vol. 218, no. 11, pp. 1376–1384, 2013.
- [48] M. A. Bouhrel, B. Derudas, E. Rigamonti et al., “PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties,” *Cell Metabolism*, vol. 6, no. 2, pp. 137–143, 2007.
- [49] N. Leitinger and I. G. Schulman, “Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 33, no. 6, pp. 1120–1126, 2013.
- [50] C. Marathe, M. N. Bradley, C. Hong et al., “The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 43, pp. 32197–32206, 2006.
- [51] L. J. H. van Tits, R. Stienstra, P. L. van Lent, M. G. Netea, L. A. B. Joosten, and A. F. H. Stalenhoef, “Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2,” *Atherosclerosis*, vol. 214, no. 2, pp. 345–349, 2011.
- [52] P. Pelegrin, C. Barroso-Gutierrez, and A. Surprenant, “P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1 β in mouse macrophage,” *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 11, pp. 7147–7157, 2008.
- [53] F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani, “Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression,” *The Journal of Immunology*, vol. 177, no. 10, pp. 7303–7311, 2006.
- [54] M. Genin, F. Clement, A. Fattaccioli, M. Raes, and C. Michiels, “M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide,” *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, article 577, 2015.
- [55] G. Raes, R. Van Den Bergh, P. De Baetselier et al., “Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells,” *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 11, pp. 6561–6562, 2005.
- [56] X.-H. Yu, Y.-C. Fu, D.-W. Zhang, K. Yin, and C.-K. Tang, “Foam cells in atherosclerosis,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 424, pp. 245–252, 2013.
- [57] A. Pirillo, G. D. Norata, and A. L. Catapano, “LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, Article ID 152786, 12 pages, 2013.
- [58] J. Canton, D. Neculai, and S. Grinstein, “Scavenger receptors in homeostasis and immunity,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 13, no. 9, pp. 621–634, 2013.
- [59] S. A. Isa, J. S. Ruffino, M. Ahluwalia, A. W. Thomas, K. Morris, and R. Webb, “M2 macrophages exhibit higher sensitivity to oxLDL-induced lipotoxicity than other monocyte/macrophage subtypes,” *Lipids in Health and Disease*, vol. 10, article 229, 2011.
- [60] D. Lau and S. Baldus, “Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 111, no. 1, pp. 16–26, 2006.
- [61] N. Moguevsky, K. Zouaoui Boudjeltia, S. Babar et al., “Monoclonal antibodies against LDL progressively oxidized by myeloperoxidase react with ApoB-100 protein moiety and human atherosclerotic lesions,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 323, no. 4, pp. 1223–1228, 2004.
- [62] E. Zhang and Y. Wu, “MicroRNAs: important modulators of oxLDL-mediated signaling in atherosclerosis,” *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, vol. 20, no. 3, pp. 215–227, 2013.
- [63] M. J. Davis, T. M. Tsang, Y. Qiu et al., “Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection,” *mBio*, vol. 4, no. 3, Article ID e00264-13, 2013.
- [64] J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, M. M. Mentink-Kane et al., “Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis,” *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 4, Article ID e1000371, 2009.
- [65] V. Cobos Jiménez, E. J. Bradley, A. M. Willemsen, A. H. C. van Kampen, F. Baas, and N. A. Kootstra, “Next-generation sequencing of microRNAs uncovers expression signatures in polarized macrophages,” *Physiological Genomics*, vol. 46, no. 3, pp. 91–103, 2014.
- [66] J. W. Graff, A. M. Dickson, G. Clay, A. P. McCaffrey, and M. E. Wilson, “Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 26, pp. 21816–21825, 2012.

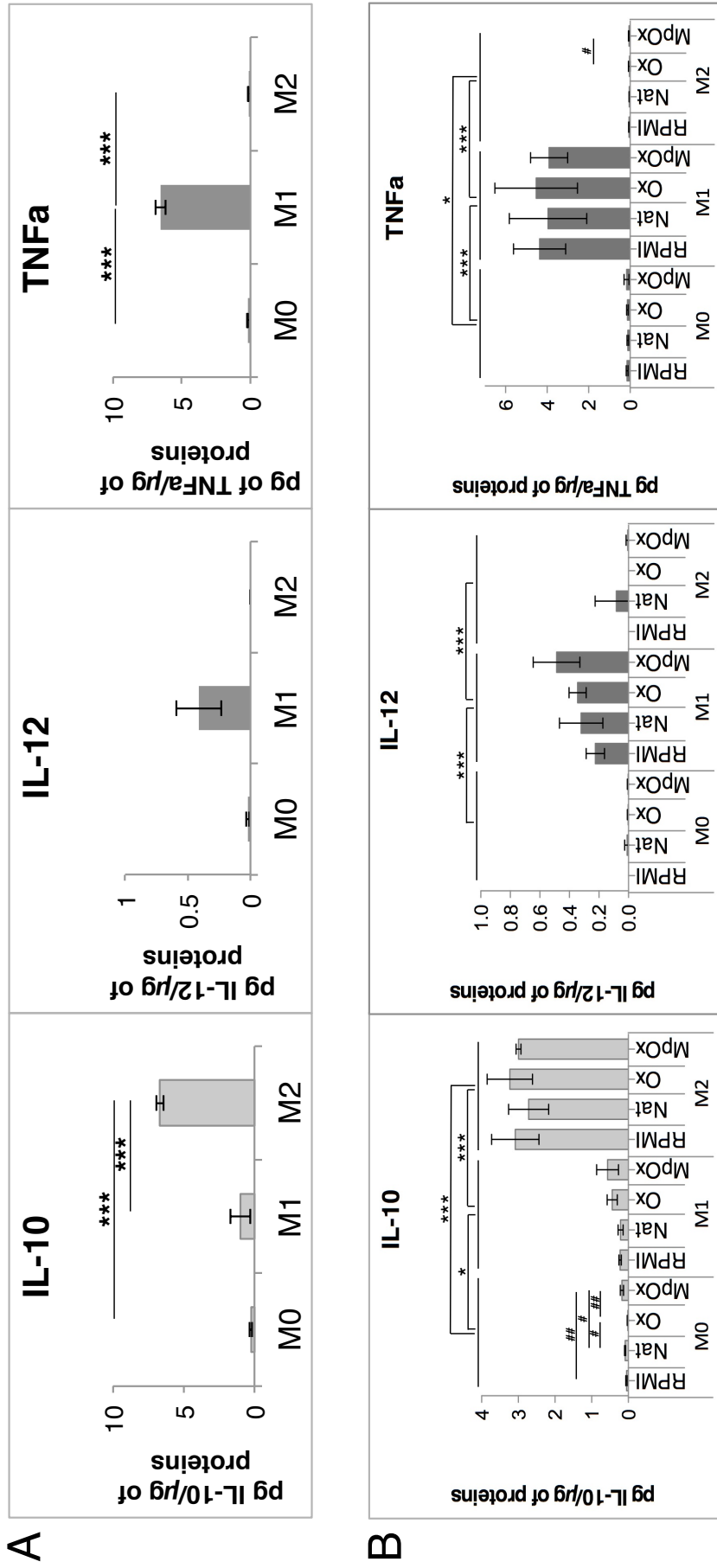
Supplementary data
Figure S1



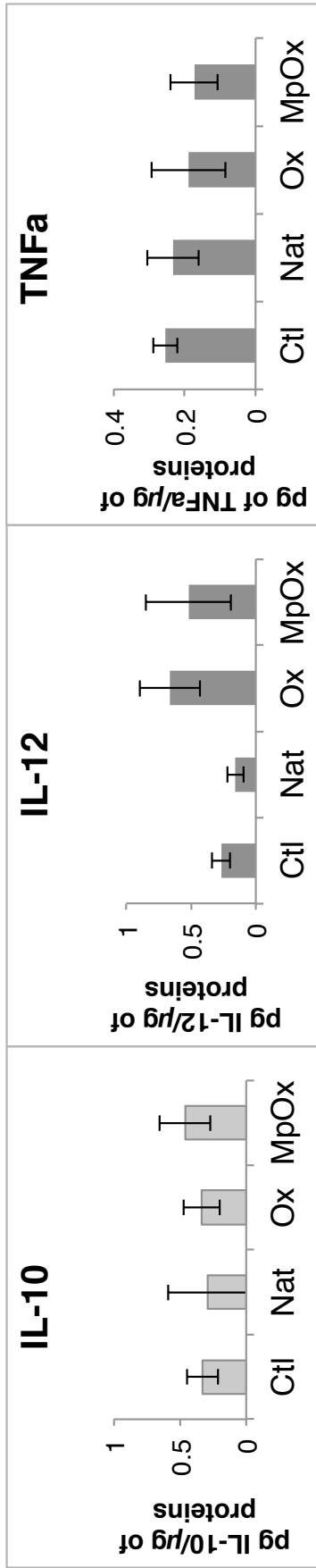
Supplementary data
Figure S2



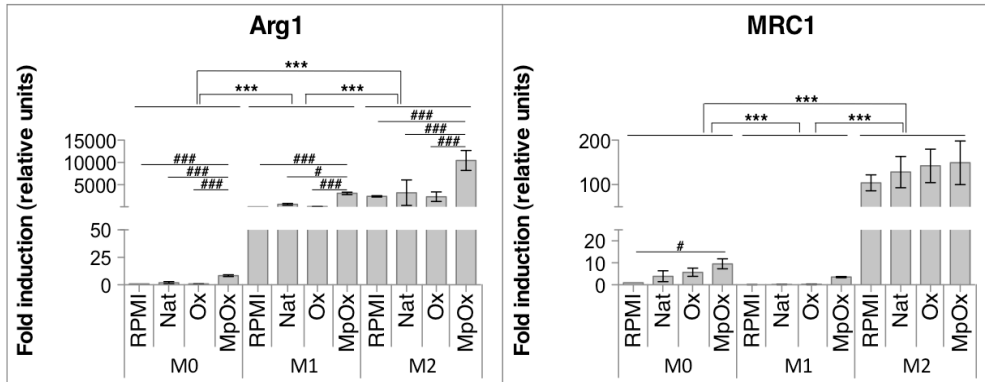
Supplementary data
Figure S3



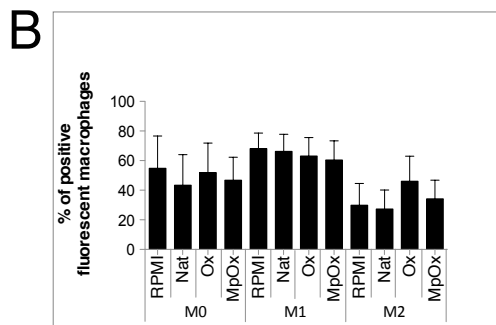
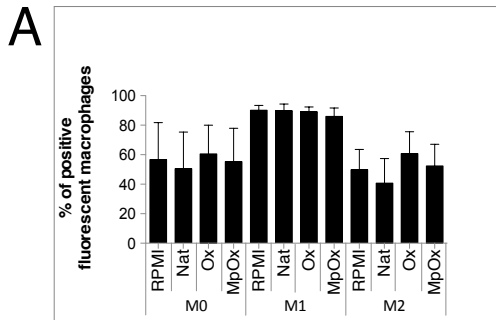
Supplementary data
Figure S4



Supplementary data
Figure S5



Supplementary data
Figure S6



Supplementary data

Supplementary Figure Legends

Figure S1. Expression of M2 polarization marker genes (*Mgl2* and *YMI*) at the mRNA level (RT-qPCR), in M0, M1 and M2 macrophages, in the absence (A-B) or in the presence of LDLs for 24 hours (100 µg/ml) (C-D), in RAW 264.7 cells (A and C) and in BMDMs (B and D). (A-B)

The expression of the M2 marker genes was analyzed by RT-qPCR as described in figure 1. Data is expressed as mean fold induction relatively to M0 cells ± SD (n = 6 in RAW 264.7 (A); n = 5 in BMDMs (B)). ANOVA 1: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

(C-D) Comparative effects of LDLs on (un)polarized RAW 264.7 macrophages and BMDMs. M0, M1 and M2 macrophages were stimulated in the presence or not (RPMI control) of Nat-LDLs, Ox-LDLs, MpOx-LDLs for 24 hours (100 µg/ml). The expression of polarization marker genes was assessed at the mRNA level (RT-qPCR) in RAW 264.7 cells (C) and BMDMs (D). Data for *Mgl2* and *YMI* was analyzed by a Kruskal-Wallis ANOVA on ranks. Data was normalized with TBP used as housekeeping gene and expressed as mean fold induction relatively to M0 control cells (RPMI) ± SD (n = 6 in RAW 264.7 (C); n = 5 in BMDMs (D)). ANOVA 2: *#, p < 0.05; **, ## p < 0.01; ***, ### p < 0.001.

Figure S2. Expression of M1 polarization marker genes (*Arg2* and *TNFα*) at the mRNA level (RT-qPCR), in M0, M1 and M2 macrophages, in the absence (A) or in the presence of LDLs for 24 hours (100 µg/ml) (B) in RAW 264.7 cells. (A)

The expression of M1 polarization marker genes was assessed at the mRNA level (RT-qPCR). Data is expressed as mean fold induction relatively to M0 cells ± SD (n = 6). ANOVA 1: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

(B) Comparative effects of LDLs on (un)polarized RAW 264.7 macrophages. M0, M1 and M2 macrophages were stimulated in the presence or not (RPMI control) of Nat-LDLs, Ox-LDLs, MpOx-LDLs for 24 hours (100 µg/ml). Data for *Arg2* and *TNFα* was analyzed by a Kruskal-Wallis ANOVA on ranks. Data was normalized with TBP used as housekeeping gene and expressed as mean fold induction relatively to M0 control cells (RPMI) ± SD (n = 6). ANOVA 2: *, # p < 0.05; **, ## p < 0.01; ***, ### p < 0.001.

Figure S3. Secretion of cytokines by RAW 264.7 M0, M1 and M2 polarized macrophages in the absence (A) or in the presence of LDLs for 24 hours (100 µg/ml) (B). (A) Secreted IL-10 (M2 marker) as well as IL-12 and TNF α (M1 markers) were assessed by ELISA. (B) Comparative effects of LDLs on (un)polarized RAW 264.7 macrophages. M0, M1, and M2 macrophages were stimulated in the presence or not (RPMI control) of Nat-LDLs, Ox-LDLs, MpOx-LDLs for 24 hours (100 µg/ml). IL-10, IL-12 and TNF α cytokines were assessed in the cell culture supernatants by ELISA. Data is expressed relatively per µg protein per well as mean \pm SD (n = 3). (A) ANOVA 1, (B) ANOVA 2: *, # p < 0.05; **, ## p < 0.01; ***, ### p < 0.001.

Figure S4. Comparative effects of LDLs on the secretion of M1 (IL-12 and TNF α) and M2 (IL-10) cytokines by unpolarized RAW 264.7 M0 macrophages. M0 macrophages were treated for 24 hours in the presence of medium alone (Ctl), Native-LDLs (Nat), Ox-LDLs (Ox) or MpOx-LDLs (MpOx) (100 µg/ml). Cytokines were assessed in the supernatants by ELISA. Data is expressed relatively per µg protein per well as mean \pm SD (n = 3). ANOVA 1: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Figure S5. Comparative effects of LDLs on the expression of M2 marker genes (*Arg1* and *MRC1*) in RAW 264.7 (un)polarized macrophages. Zoomed data for *Arg1* and *MRC1* from Fig. 4A.

Macrophages were treated for 24 hours in the presence of medium alone (RPMI control), Native-LDLs (Nat), Ox-LDLs (Ox) or MpOx-LDLs (MpOx) (100 µg/ml) and the expression of polarization marker genes was monitored at the mRNA level (RT-qPCR), with *Arg1* and *MRC1* as M2 markers. Data was normalized with TBP used as housekeeping gene and expressed as mean fold induction relatively to M0 control cells (RPMI) \pm SD (n = 6). ANOVA 2: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Figure S6. Impact of native or oxidized LDLs on the phagocytosis of fluorescent beads by (un)polarized RAW264.7 cells (A) and BMDMs (B). M0, M1 and M2 macrophages were incubated in the presence or not of Nat-, Ox- and MpOx-LDLs and fluorescent beads (dilution: 1/133) for 24 hours. The percentage of positive fluorescent cells was evaluated using flow cytometry (FACS BD Verse). Data is expressed as mean \pm SD (n = 3). ANOVA 2: *, # p < 0.05; **, ## p < 0.01; ***, ### p < 0.001.

3.1.2 Etablissement du phénotype « Mox » dans la lignée RAW 264.7 et effets des LDLs oxydées

En plus des phénotypes M1 et M2, nous nous sommes également intéressés à un troisième phénotype, les macrophages « Mox », décrits par l'équipe de Leitinger en 2010 (Kadl et al., 2010). Au premier abord, ce phénotype nous a semblé intéressant, puisqu'il représenterait 30 % des macrophages présents dans les lésions athéroscléreuse avancées de souris *Ldl-r^{-/-}*, tout en soulignant que ce modèle est loin d'être le modèle murin le plus pertinent. Il serait caractérisé par une surexpression de gènes sous le contrôle de NRF2, tels que la *hème oxygénase* et la *sulfirédoxine-1* (Kadl et al., 2010). Nous avons donc décidé de mettre également au point un protocole de polarisation « Mox » dans les cellules de la lignée RAW 264.7 et les BMDMs en stimulant des macrophages M0 avec des phospholipides oxydés (40 µg/ml d'OxPAPC). Suite à l'incubation avec l'OxPAPC, nous avons observé que ces macrophages sur-expriment en effet les gènes marqueurs décrits par Kadl et al., *Ho-1* et *Srxn1*, au niveau ARNm et au niveau protéique (Fig. III.1 pour les cellules RAW 264.7). Les BMDMs « Mox » surexpriment également la *Srxn1*, les résultats étant moins probants pour la *Ho-1* (Fig. III.2). Cependant, nous avons également décidé de vérifier l'expression de ces marqueurs antioxydants dans les macrophages M0, M1 et M2 et avons observé une surexpression de ces gènes dans les macrophages M1 (surexpression d'*Ho-1* aux niveaux ARNm et protéique dans les macrophages RAW 264.7 (Fig. III.1) et surexpression d'*Ho-1* et *Srxn1* aux niveaux ARNm et protéique dans les BMDMs) (Fig. III.2). Les macrophages « Mox » n'expriment pas, quant à eux, les marqueurs géniques M1 et M2, que ce soit aux niveaux ARNm ou protéique. En parallèle, ces cellules « Mox » ont été stimulées avec des LDLs oxydées ou non (100 µg/ml), pendant 24 heures. Nous avons pu observer une augmentation de l'expression de *Ho-1* et *Srxn1* (aux niveaux ARNm et /ou protéique) quand les macrophages « Mox » sont stimulés avec les Ox-LDLs et les MpOx-LDLs (Figs. III.3 et III.4). Comme montré dans l'article, c'est également le cas pour les macrophages M1 et M2, qui comme les macrophages « Mox », développent une réponse protectrice face aux modifications de l'équilibre redox dans la cellule, suite à l'internalisation des LDLs oxydées. De plus, tout comme pour les macrophages M0 ou M2, les MpOx-LDLs sont les plus internalisées par les macrophages « Mox » ((Pireaux et al., 2016), Fig. III.5). Ces résultats ont été confirmés avec les BMDMs (Figs. III.2, III.4 et III.5 B). Dans chacun des modèles, les expériences, avec le phénotype « Mox », ont été réalisées trois fois de manière indépendante.

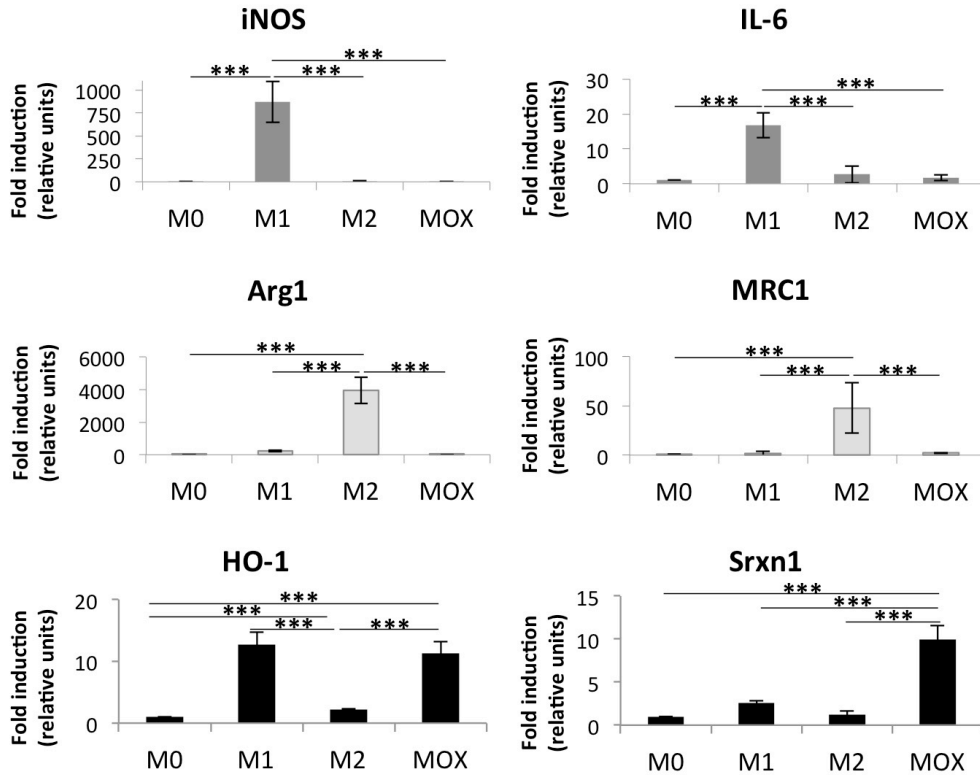
Au terme de ces expériences, nous nous sommes questionnés sur la robustesse de ce phénotype. En effet, les gènes marqueurs choisis sont également surexprimés dans les macrophages pro-inflammatoires M1, avec ou sans stimulation avec des LDLs. De plus, à notre connaissance, ce phénotype, décrit par l'équipe de Leitinger en modèle souris uniquement, reste peu étudié.

Les résultats obtenus sur ce phénotype n'ont donc pas été introduits dans l'article publié dans « Mediators of Inflammation » (Pireaux et al., 2016), mais ont été présentés dans cette thèse, après l'article, afin de compléter notre set de données sur la polarisation de macrophages RAW 264.7 et BMDMs en culture.

3.1.3 Expression des récepteurs « scavenger » dans les macrophages M1 et M2

Pour rappel, au cours du mémoire de master BBMC, l'impact de la polarisation M1 et M2 sur l'expression de plusieurs récepteurs « scavenger » avait déjà été étudié (Annexe 6).

A



B

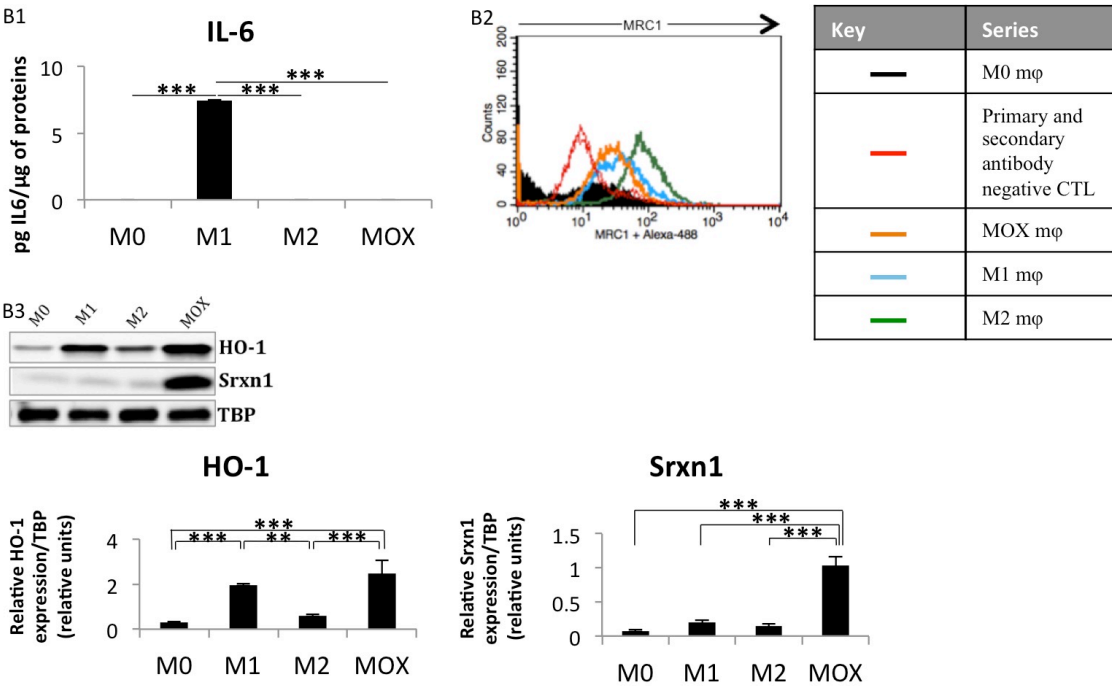
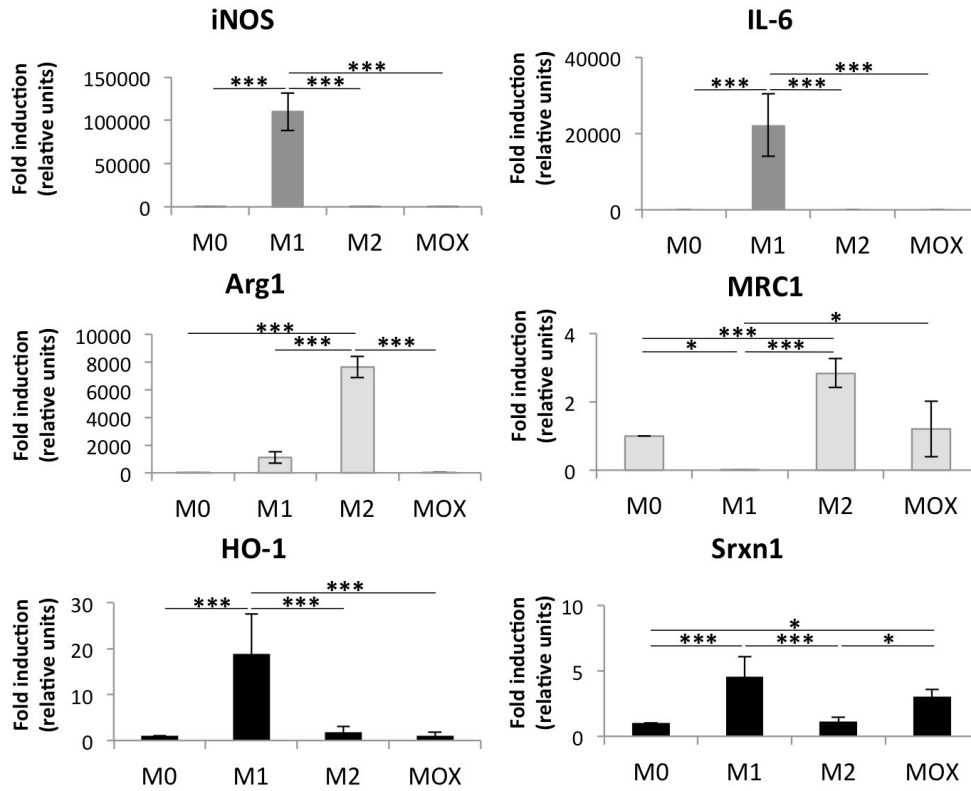


Figure III.1. Caractérisation des macrophages RAW 264.7 polarisés M0, M1 (LPS + IFN γ), M2 (IL-4 + IL-13) et MOX (OxPAPC). Les cellules ont été polarisées comme décrit dans les Matériels et Méthodes de Pireaux et al. (2016). (A) Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR), dans des macrophages M0, M1, M2 et MOX. L'expression de l'*iNOS* et l'*IL-6* comme marqueurs M1, *Arg1* et *Mrc1* comme marqueurs M2, et *Ho-1* et *Srxn1* comme marqueurs redox-sensibles « Mox », a été analysée par RT-qPCR. Les données ont été normalisées avec *Tbp* utilisé comme gène invariant et exprimées comme moyenne de « fold induction », par rapport aux cellules M0 \pm SD (n = 3). (B) Expression de marqueurs de polarisation au niveau protéique dans des macrophages M0, M1, M2 et MOX. (B1) Production d'IL-6 sécrétée (marqueur M1) dans les surnageants de culture cellulaire, évaluée par ELISA. Les données sont exprimées relativement par μ g de protéines par puits comme moyenne \pm SD (n = 3). (B2) Expression de MRC1 (marqueur M2) analysée par cytométrie de flux dans des macrophages M0, M1 et M2 et MOX (m ϕ). Les valeurs GMF (« geometric mean of the fluorescence intensity ») sont rapportées en unités arbitraires : Δ GMF_{M2-M0}, 65.57, Δ GMF_{M1-M0}, 28.9 et Δ GMF_{MOX-M0}, 20.44. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes. (B3) Expression de HO-1 et SRXN1 évaluée par Western blotting dans des macrophages M0, M1, M2 et MOX. Les données sont normalisées avec TBP utilisé comme contrôle de charge et exprimées comme moyenne \pm SD (n = 3). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. ANOVA 1 : ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

A



B B1

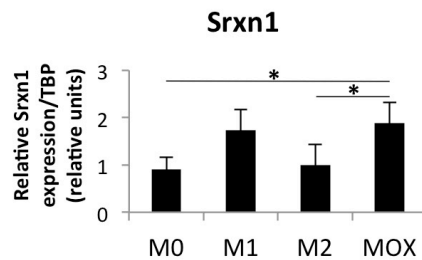
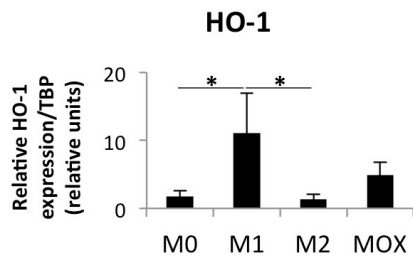
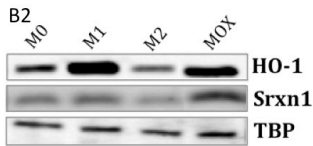
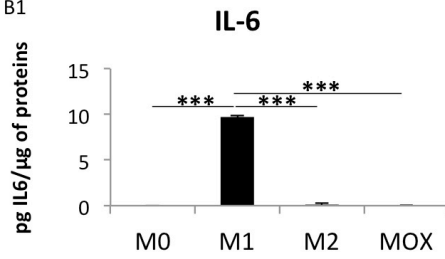
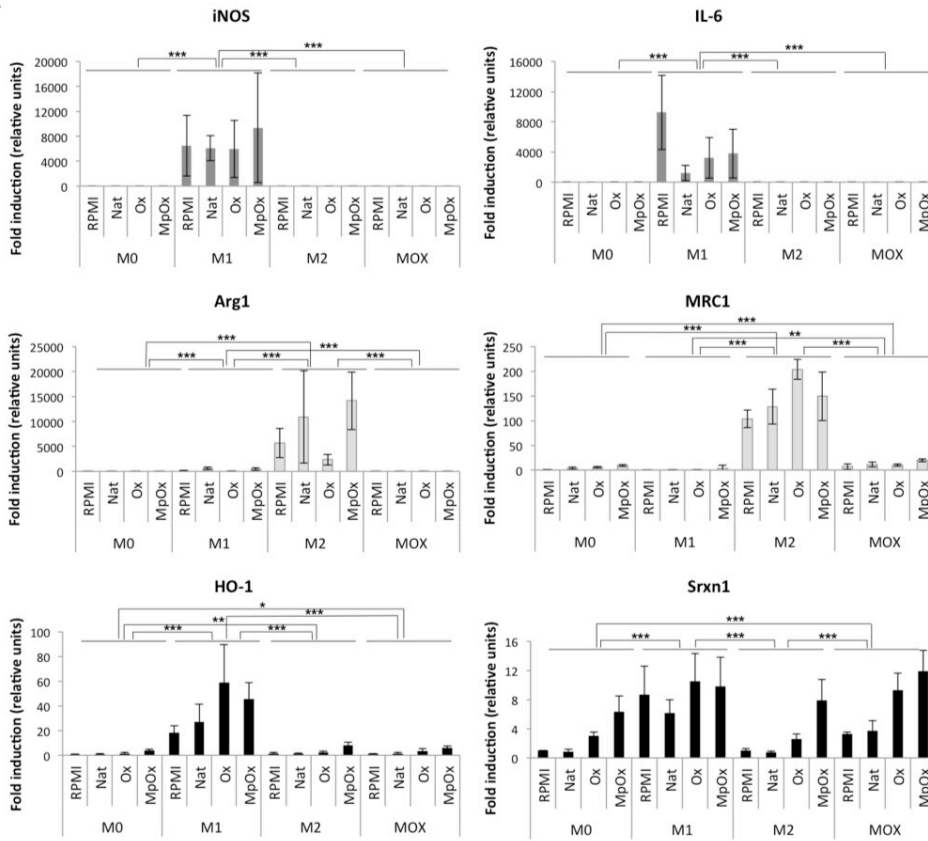


Figure III.2. Caractérisation des BMDMs polarisés M0, M1 (LPS + IFN γ), M2 (IL-4 + IL-13) et MOX (OxPAPC). (A) Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR), dans des macrophages M0, M1, M2 et MOX. L'expression des gènes marqueurs a été analysée comme décrit dans la figure III.1 et les données sont exprimées comme moyenne de « fold induction », par rapport aux cellules M0 \pm SD (n = 3). (B) Expression de marqueurs de polarisation au niveau protéique dans des macrophages M0, M1, M2 et MOX. (B1) Production d'IL-6 sécrétée (marqueur M1) dans les surnageants de culture cellulaire, évaluée par ELISA. Les données sont exprimées relativement par μ g de protéines par puits comme moyenne \pm SD (n = 3). (B2) Expression de HO-1 et SRXN1 évaluée par Western blotting dans des macrophages M0, M1, M2 et MOX. Les données sont normalisées avec TBP utilisé comme contrôle de charge et exprimées comme moyenne \pm SD (n = 3). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. ANOVA 1: * $p < 0.05$ et *** $p < 0.001$.

A



B

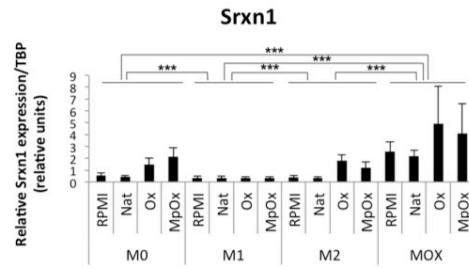
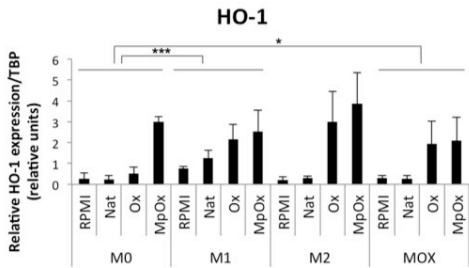
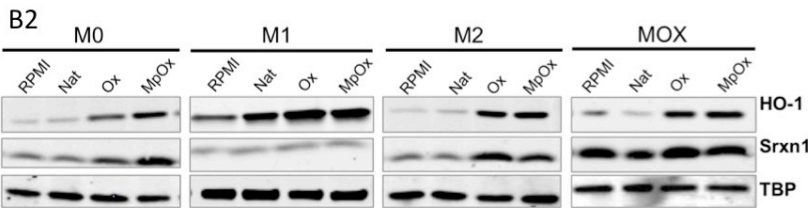
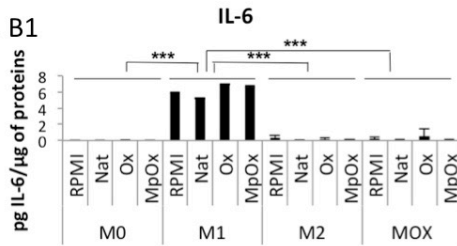
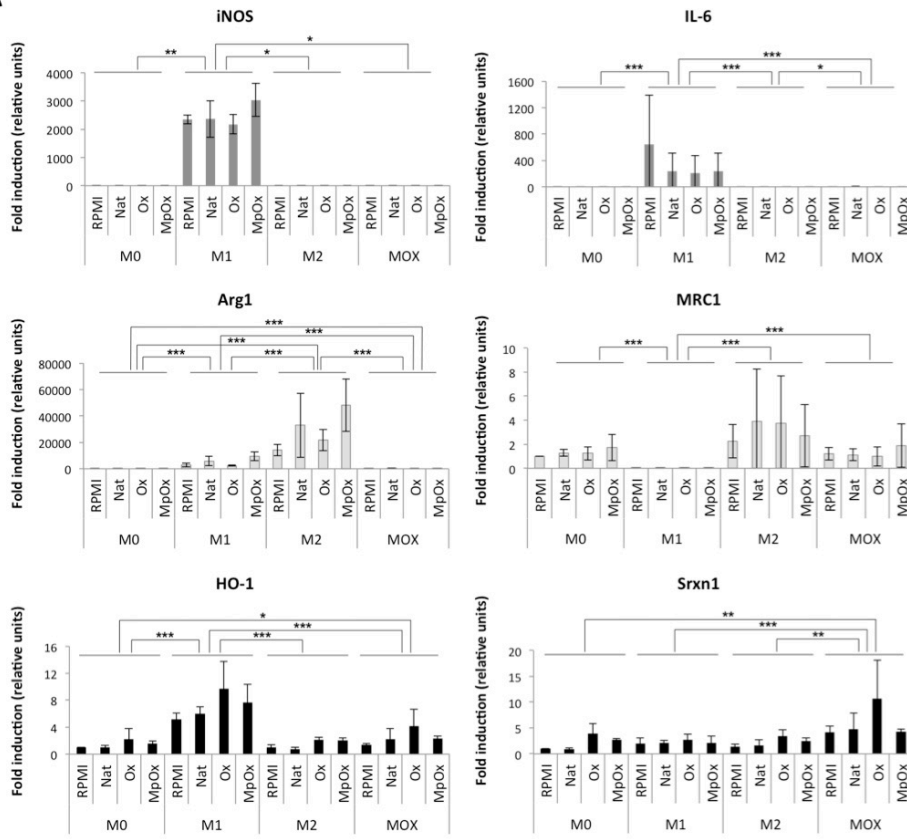


Figure III.3. Effets comparatifs des LDLs sur les macrophages RAW 264.7 polarisés ou non. Les macrophages M0, M1, M2 et MOX ont été stimulés avec des Nat-LDLs, Ox-LDLs et MpOx-LDLs (100 µg/mL) ou non (contrôle RPMI) pendant 24 heures. (A) Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR). L'expression des gènes marqueurs a été analysée par RT-qPCR comme décrit dans la figure III.1. Les données sont normalisées avec *Tbp* utilisé comme gène invariant et exprimées comme moyenne de « fold induction », par rapport aux cellules M0 dans du RPMI ± SD (n = 3). (B) Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau protéique (ELISA ; WB). (B1) Production d'IL-6 sécrétée (marqueur M1) dans les surnageants de culture cellulaire, évaluée par ELISA. Les données sont exprimées relativement par µg de protéines par puits comme moyenne ± SD (n = 3). (B2) Expression de HO-1 et SRXN1 évaluée par Western blotting. Les données sont normalisées avec TBP utilisé comme contrôle de charge et exprimées comme moyenne ± SD (n = 3). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. ANOVA 2 : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

A



B

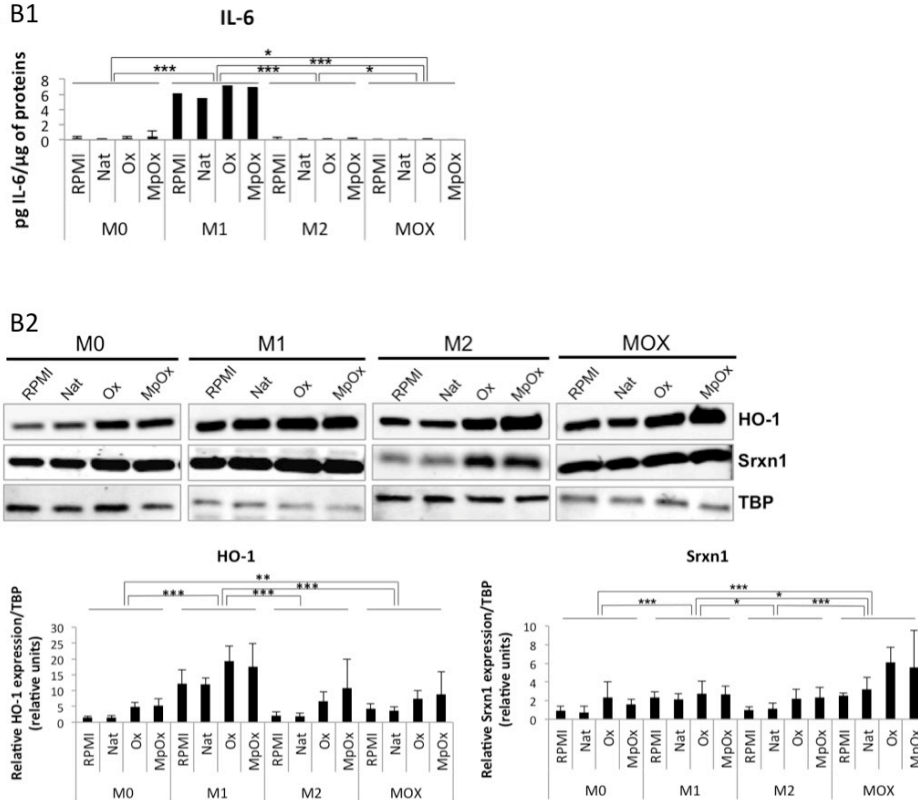
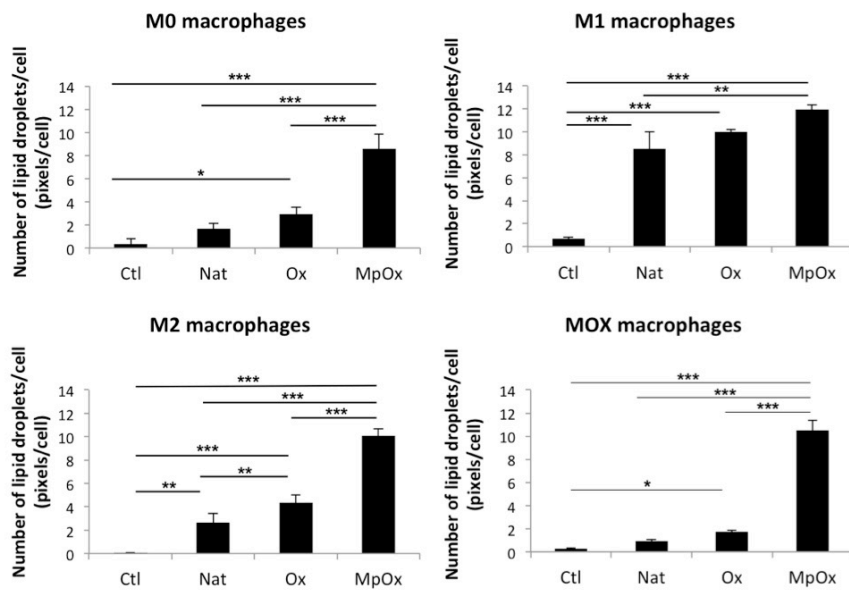


Figure III.4. Effets comparatifs des LDLs sur les BMDMs polarisés ou non. Les macrophages M0, M1, M2 et MOX ont été stimulés avec des Nat-LDLs, Ox-LDLs et MpOx-LDLs (100 µg/mL) ou non (contrôle RPMI) pendant 24 heures. (A) Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR). L'expression des gènes marqueurs a été analysée par RT-qPCR comme décrit dans la figure III.1. Les données sont normalisées avec *Tbp* utilisé comme gène invariant et exprimées comme moyenne de « fold induction », par rapport aux cellules M0 dans du RPMI ± SD (n = 3). (B) Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau protéique (ELISA ; WB). (B1) Production d'IL-6 sécrétée (marqueur M1) dans les surnageants de culture cellulaire, évaluée par ELISA. Les données sont exprimées relativement par µg de protéines par puits comme moyenne ± SD (n = 3). (B2) Expression de HO-1 et SRXN1 évaluée par Western blotting. Les données sont normalisées avec TBP utilisé comme contrôle de charge et exprimées comme moyenne ± SD (n = 3). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. ANOVA 2 : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

A.



B.

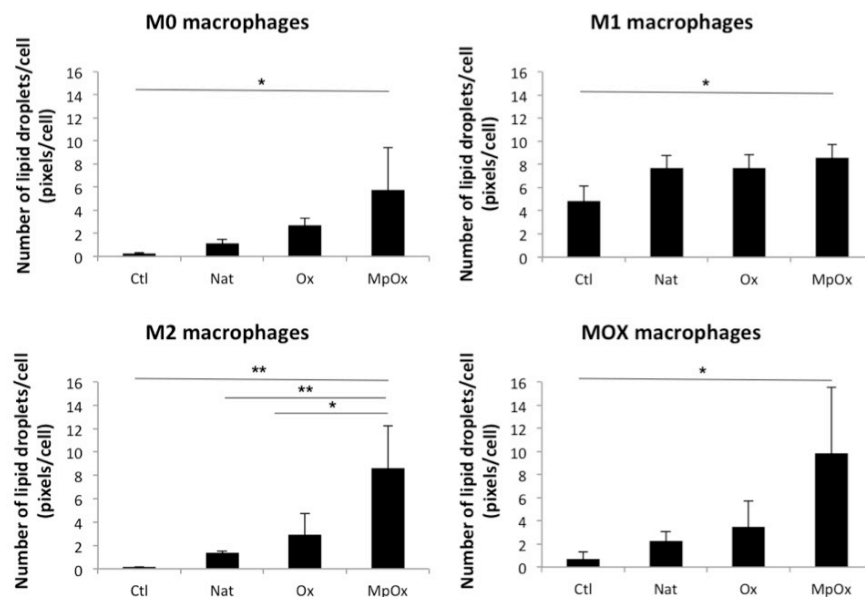


Figure III.5. Effets comparatifs des LDLs sur des macrophages RAW 264.7 (A) et sur des BMDMs (B) afin d'induire la formation de cellules spumeuses. Des macrophages M0, M1, M2 et MOX ont été incubés ou non (contrôle RPMI) en présence de Nat-LDLs, Ox-LDLs et MpOx-LDLs (100 µg/mL) pendant 24 heures. Le nombre de gouttelettes lipidiques a été estimé en utilisant le « High Content Imager » du BD Pathway 855, comme décrit dans les Matériels et Méthodes de Pireaux et al. (2016). Les données sont exprimées comme moyenne ± SD (n = 3).

ANOVA 1 : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, et *** $p < 0.001$.

Même si les écarts-types sont importants, nous avons observé une surexpression de *FcγRIII* ($p < 0.01$) et *Tlr4* ($p < 0.05$) dans les macrophages M1 et de *Sr-bI* dans les macrophages M2, par rapport aux macrophages M0. A l'inverse, l'expression de *Lox-1* ($p < 0.05$), *Abcg4* ($p < 0.05$) et *Sr-bI* ($p < 0.01$) était diminuée dans les macrophages M1 par rapport aux macrophages M0 (Annexe 6).

Ces résultats semblent cohérents avec les fonctions pro-inflammatoires et de résolution attribuées aux macrophages M1 et M2 respectivement et avec les publications étudiant l'expression de certains récepteurs « scavenger » dans les macrophages polarisés (*FcγRIII* : (Lefevre et al., 2013), *Tlr4* : (Wang et al., 2014), *Sr-bI* : (Jaguin et al., 2013)). Enfin, nous n'observons pas de modification significative de l'expression de *Msr1* dans les macrophages polarisés M1 et M2.

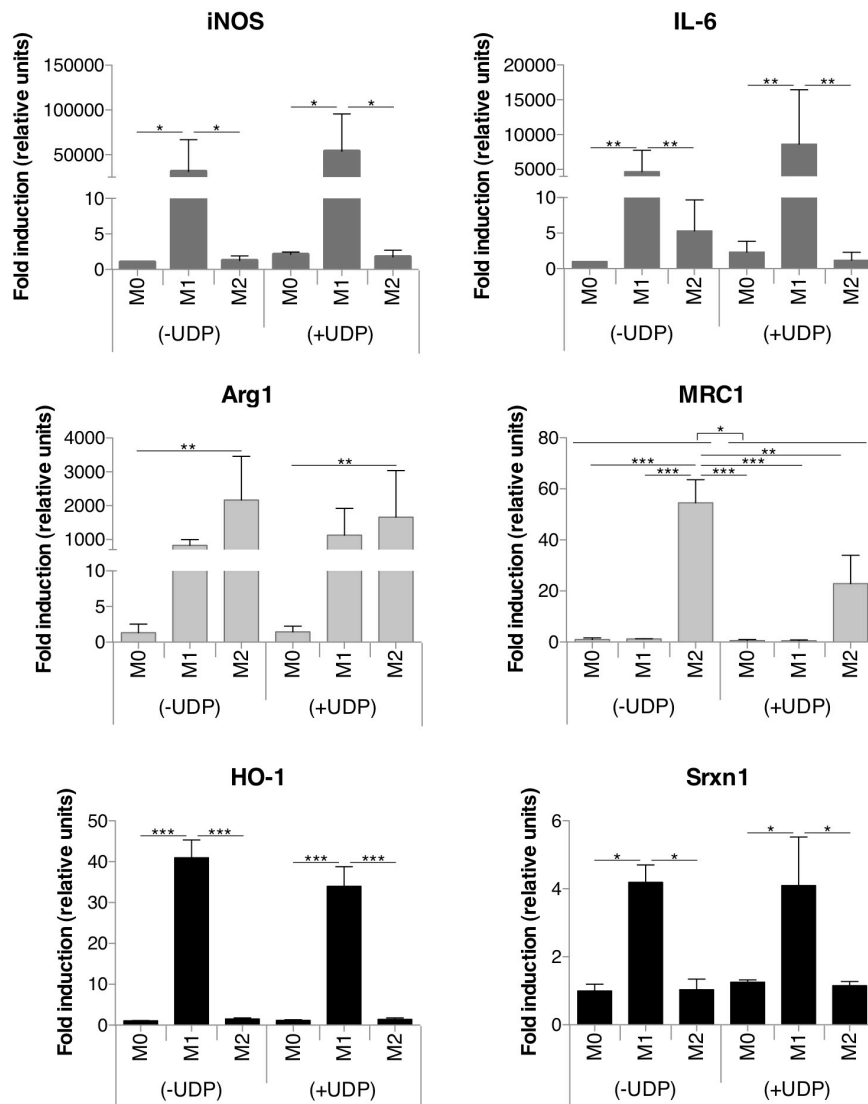


Figure III.6. Effet comparatif de l'UDP sur l'expression de gènes marqueurs chez des macrophages RAW 264.7 polarisés ou non. Les macrophages M0, M1 (LPS + IFN γ) et M2 (IL-4 et IL-13) ont été incubés ou non en présence d'UDP (100 μ M) pendant 18 heures.

Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR). L'expression des gènes marqueurs a été analysée par RT-qPCR, comme décrit dans la figure 1 de l'article de Pireaux et al. (2016). Les données ont été normalisées avec *Tbp*, utilisé comme gène invariant, et exprimées comme moyenne de « fold induction » relativement aux cellules M0 (-UDP) \pm SD ($n = 3$).

ANOVA 2: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; et *** $p < 0.001$.

3.2 IMPLICATION POSSIBLE DE P2Y₆ DANS LA POLARISATION DES MACROPHAGES.

3.2.1 Effet de l'UDP sur la polarisation des macrophages *in vitro*

En raison de l'implication possible du récepteur purinergique P2Y₆ dans le développement des lésions athéroscléreuseuses, nous nous sommes intéressés au modèle de souris *P2y6*^{-/-} créé en 2008 dans le laboratoire de B. Robaye (Bar et al., 2008) et au modèle DKO *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}, également étudié dans ce laboratoire. Il a en effet été montré que les lésions de ce modèle double « knock-out » sont de taille réduite. De plus, P2Y₆ est exprimé en membrane des cellules endothéliales, mais aussi au niveau des monocytes et macrophages et des cellules musculaires lisses vasculaires. Plusieurs équipes ont également montré qu'une stimulation de monocytes humains ou macrophages murins avec de l'UDP induit la surexpression de marqueurs M1 pro-inflammatoires, tels que l'*IL-8* ou l'*iNOS* respectivement (Cox et al., 2005; Guns et al., 2010; Warny et al., 2001).

Avant toute expérience sur le modèle *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}, nous avons donc décidé d'étudier, *in vitro*, l'effet de l'UDP, ligand de P2Y₆, sur la polarisation M1 ou M2 des macrophages RAW 264.7 ou des BMDMs, stimulés ou non avec des LDLs. Une concentration de 100 μM d'UDP a été utilisée. Il s'agit de celle utilisée après optimisation dans l'étude de Bar et al. qui utilise des macrophages péritonéaux (Bar et al., 2008) (communication personnelle de B. Robaye).

Nous avons ainsi pu montrer que l'UDP semble induire une légère augmentation de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires *iNOS* et *Il-6* dans les macrophages RAW M1. Cependant, cet effet est non significatif (Fig. III.6).

Du côté des marqueurs anti-inflammatoires, l'expression de *Mrc1* semble diminuer de manière significative lorsque les cellules M2 sont incubées en présence de 100 μM d'UDP ($p < 0.05$). L'expression des marqueurs antioxydants *Ho-1* et *Srxn1* ne semble pas être modifiée lorsque les cellules sont incubées avec de l'UDP (Fig. III.6).

Des résultats similaires sont observés avec les BMDMs (Fig. III.7).

Ces résultats sont cohérents avec ceux montrés par l'équipe de Jenh en 2005 (Cox et al., 2005). En effet, ils ont montré que l'UDP est capable d'induire une augmentation de la production d'*IL-8* et de *TNFα*, deux marqueurs pro-inflammatoires, dans la lignée de cellules U937 humaines (Cox et al., 2005). De même, Garcia et al. en 2014 ont montré une augmentation de la sécrétion du *TNFα*, de *MCP-1* ou de l'*IL-8* notamment, dans des macrophages THP-1 stimulés avec de l'UDP (Garcia et al., 2014).

Lorsque les macrophages (non-)polarisés sont stimulés ou non avec des LDLs, la présence d'UDP semble induire une légère augmentation de l'expression du marqueur *iNOS* dans les macrophages M1 RAW 264.7 et BMDMs (non significatif). Aucune différence significative n'est observée pour l'*Il-6* lorsque des macrophages (non-) polarisés, stimulés ou non avec des LDLs, sont incubés avec de l'UDP (Figs. III.8 et III.9). En ce qui concerne les marqueurs anti-inflammatoires, seule l'expression de *Mrc1* semble diminuer de manière très hautement significative dans les macrophages M2 RAW 264.7 ($p < 0.001$) (Fig. III.8). Cette observation est intéressante, car MRC1 est reconnu comme PRR, reconnaissant non seulement des PAMPs, mais aussi des DAMPs, glycosylés, dont des hydrolases fortement glycosylées, la L-sélectine et la MPO. MRC1

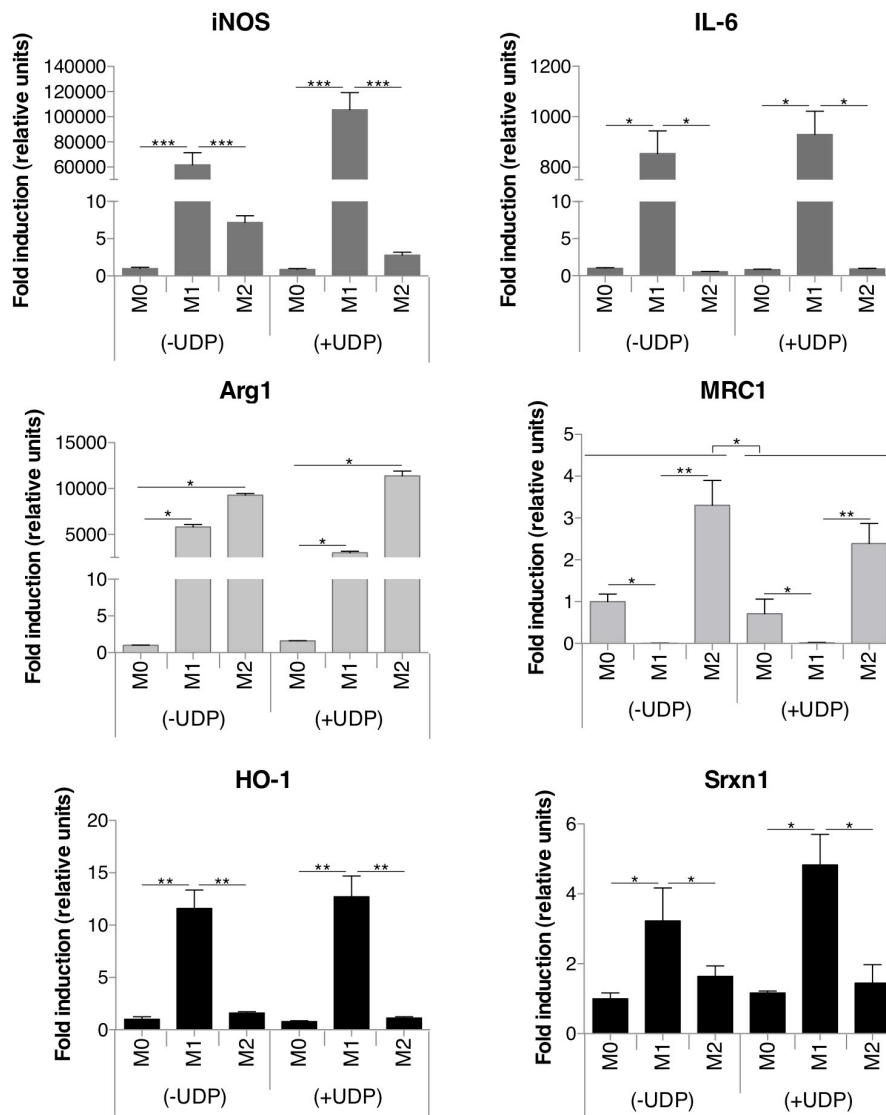


Figure III.7. Effet comparatif de l'UDP sur l'expression de gènes marqueurs chez des BMDMs polarisés ou non. Les macrophages M0, M1 (LPS + IFN γ) et M2 (IL-4 et IL-13) ont été incubés ou non en présence d'UDP (100 μ M) pendant 18 heures.

Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR). L'expression des gènes marqueurs a été analysée par RT-qPCR, comme décrit dans la figure 1 de l'article de Pireaux et al. (2016). Les données ont été normalisées avec *Tbp*, utilisé comme gène invariant, et exprimées comme moyenne de « fold induction » relativement aux cellules M0 (-UDP) \pm SD ($n = 3$).

ANOVA 2: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; et *** $p < 0.001$.

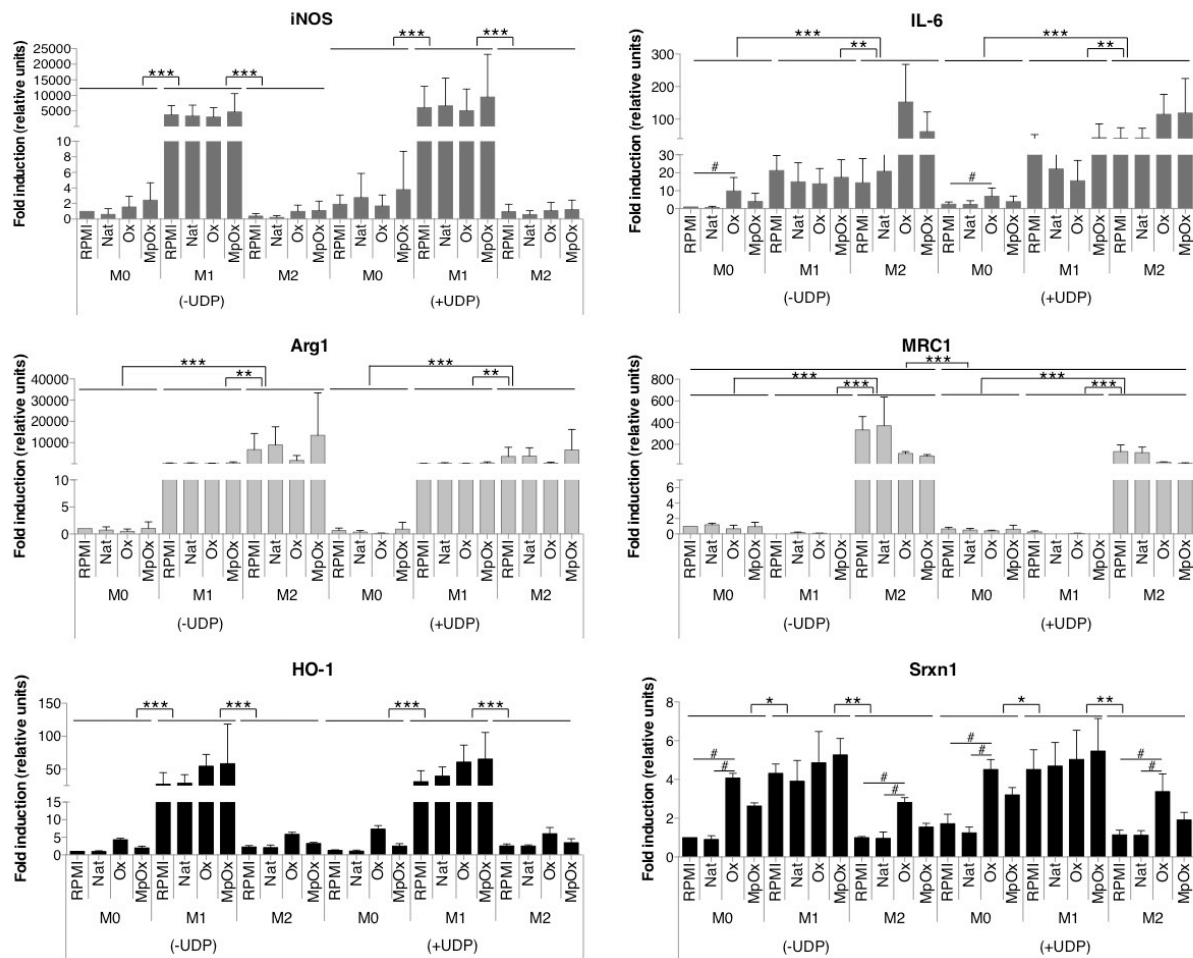


Figure III.8. Effet comparatif de l'UDP sur l'expression de gènes marqueurs chez des macrophages RAW 264.7 polarisés ou non, et stimulés ou non avec des LDLs. Les macrophages M0, M1 et M2 ont été stimulés en présence ou non (contrôle RPMI) de Nat-LDLs, Ox-LDLs et MpOx-LDLs (100 µg/mL) et incubés ou non en présence d'UDP (100 µM) pendant 24 heures.

Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR). L'expression des gènes marqueurs a été analysée par RT-qPCR, comme décrit dans la figure 1 de l'article de Pireaux et al. (2016). Les données ont été normalisées avec *Tbp*, utilisé comme gène invariant, et exprimées comme moyenne de « fold induction » relativement aux cellules M0 RPMI (-UDP) ± SD ($n = 3$).

ANOVA 2: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; et *** $p < 0.001$.

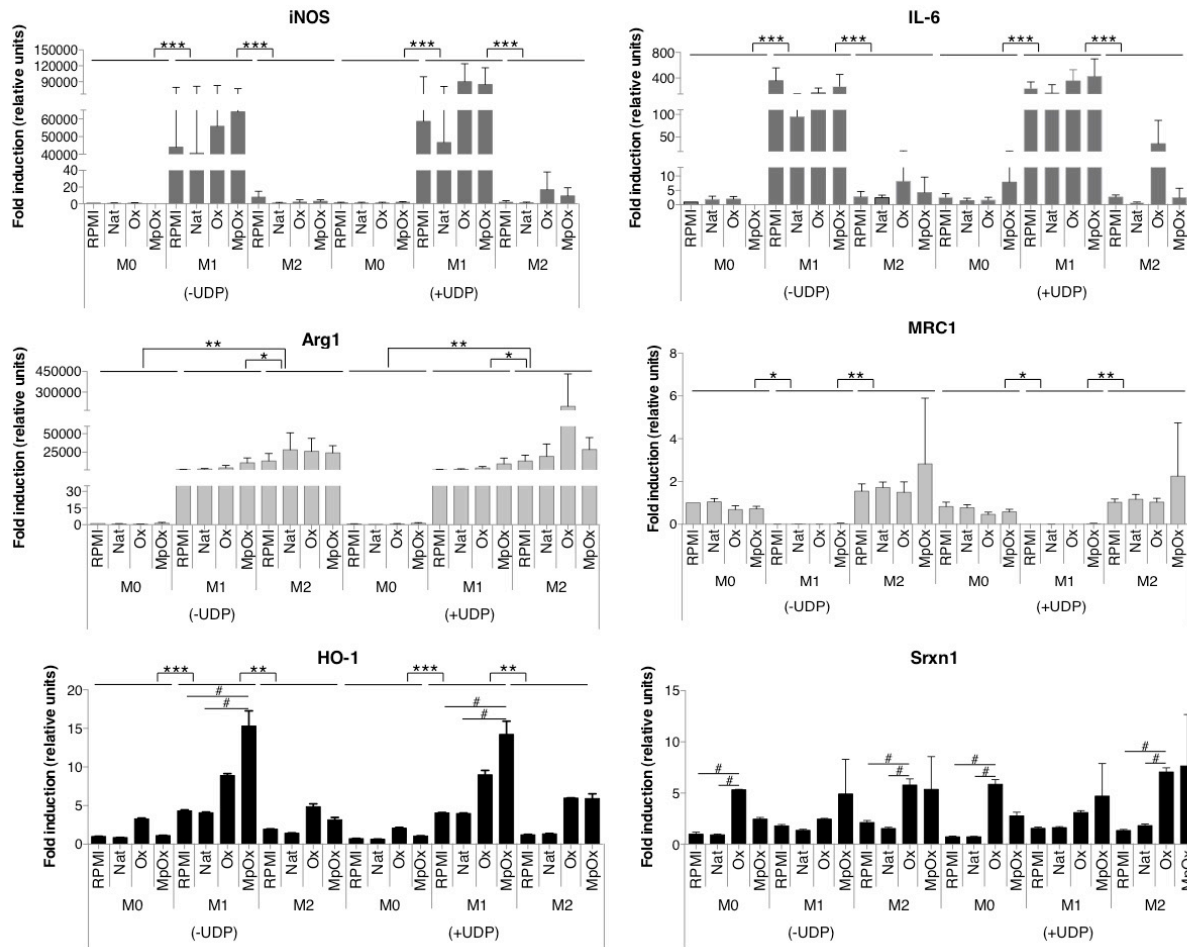


Figure III.9. Effet comparatif de l'UDP sur l'expression de gènes marqueurs chez des BMDMs polarisés ou non, et stimulés ou non avec des LDLs. Les macrophages M0, M1 et M2 ont été stimulés en présence ou non (contrôle RPMI) de Nat-LDLs, Ox-LDLs et MpOx-LDLs (100 µg/mL) et incubés ou non en présence d'UDP (100 µM) pendant 24 heures.

Expression des gènes marqueurs de polarisation au niveau ARNm (RT-qPCR). L'expression des gènes marqueurs a été analysée par RT-qPCR, comme décrit dans la figure 1 de l'article de Pireaux et al. (2016). Les données ont été normalisées avec *Tbp*, utilisé comme gène invariant, et exprimées comme moyenne de « fold induction » relativement aux cellules M0 RPMI (-UDP) ± SD ($n = 3$).

ANOVA 2: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; et *** $p < 0.001$.

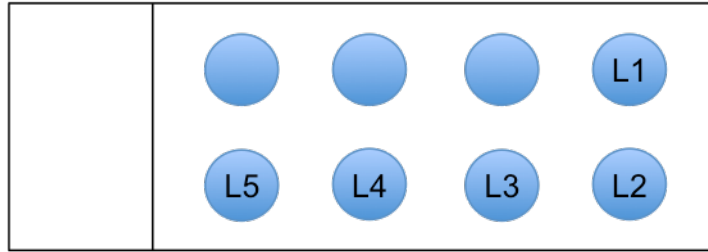


Figure III.10. Représentation schématique de la disposition des coupes L1 à L5 sur une lame.

joue donc un rôle dans la résolution de l'inflammation, favorisant la clairance des protéines pro-inflammatoires (Gazi and Martinez-Pomares, 2009).

L'expression d'*Ho-1* et *Srxn1* ne semble pas être modifiée après incubation avec l'UDP ($p > 0.05$) (Figs. III.8 et III.9).

De plus, au moyen du BD Pathway 855, nous avons voulu vérifier si une incubation avec de l'UDP était capable de moduler l'internalisation des lipides chez des macrophages, et ce, en déterminant le nombre de gouttelettes lipidiques pour des macrophages polarisés ou non, stimulés ou non avec des LDLs pendant 24 heures ou 48 heures, en présence ou non d'UDP. Nous n'avons vu aucun effet de l'UDP sur le nombre de gouttelettes lipidiques (résultats non montrés).

3.2.2 Effet de l'invalidation de *P2y₆* dans le modèle de souris *ApoE^{-/-}* sur la polarisation des macrophages au sein des lésions athéroscléreuses

En plus des résultats obtenus *in vitro*, nous avons voulu vérifier si l'invalidation du récepteur purinergique *P2Y₆* s'accompagnait d'une modification de la polarisation des macrophages dans les lésions aortiques de souris. Pour ce faire, le modèle de souris *P2y₆^{-/-}*, créé par Bar et al. en 2008, a été croisé avec des souris *ApoE^{-/-}*. Ce croisement donne des souris présentant une surface de lésions athéroscléreuses réduites par rapport à celle des souris *ApoE^{-/-}* (résultats non publiés par B. Robaye). Garcia et al. (2014) ont montré des résultats similaires au niveau de l'aorte et de la crosse aortique, après transplantation de cellules de moelle osseuse de souris *P2y₆^{-/-}* dans des souris *Ldl-r^{-/-}* (Garcia et al., 2014). De même, Stachon et al. (2014) ont observé un effet similaire lorsqu'ils ont croisé des souris *P2y₆^{-/-}* avec des souris *Ldl-r^{-/-}* (Stachon et al., 2014). Enfin, Guns et al. (2010), utilisant une approche pharmacologique appliquée à des souris *ApoE^{-/-}*, avaient également déjà suggéré le rôle des récepteurs *P2Y* et en particulier du récepteur *P2Y₆* dans l'athérosclérose. A notre connaissance, il n'y a pas de données concernant l'impact de l'invalidation de *P2y₆* dans les souris *ApoE^{-/-}* sur les concentrations en lipides ou en lipoprotéines plasmatiques.

Dans le modèle murin *ApoE^{-/-} x P2y₆^{-/-}*, nous avons réalisé des immunofluorescences sur coupes à congélation de cœurs et d'aortes. Le marqueur pro-inflammatoire M1 iNOS a été choisi ainsi que les marqueurs anti-inflammatoires M2 ARG1 et antioxydant HO-1 (voir Annexe 1 : Matériels et méthodes complémentaires).

Les souris *ApoE^{-/-}* (KO) et *ApoE^{-/-} x P2y₆^{-/-}* (DKO), mâles et femelles, étaient âgées de 35 semaines au moment du sacrifice.

Les coupes, préparées par Dominique Fokan au laboratoire de B. Robaye (IRIBHM, Gosselies), ont été disposées sur la lame selon une orientation de L1 à L5, avec la coupe L5 correspondant à la première section de l'aorte ascendante avec une lumière bien dégagée (Fig. III.10). Il est possible que plus de 5 coupes soient présentes sur les lames (en général, entre 8 et 11) : ces coupes supplémentaires correspondent à des coupes tranchées avant le premier point de repère établi par D. Fokan. Une fois les quantifications terminées pour chacune des coupes, nous avons calculé la moyenne des valeurs cumulées de L1 à L5 (ex. : quantification de l'iNOS dans les souris KO). Cette valeur moyenne a ensuite été comparée avec la valeur moyenne des autres conditions (ex. : par rapport à la valeur issue de la quantification de l'iNOS dans les souris DKO).

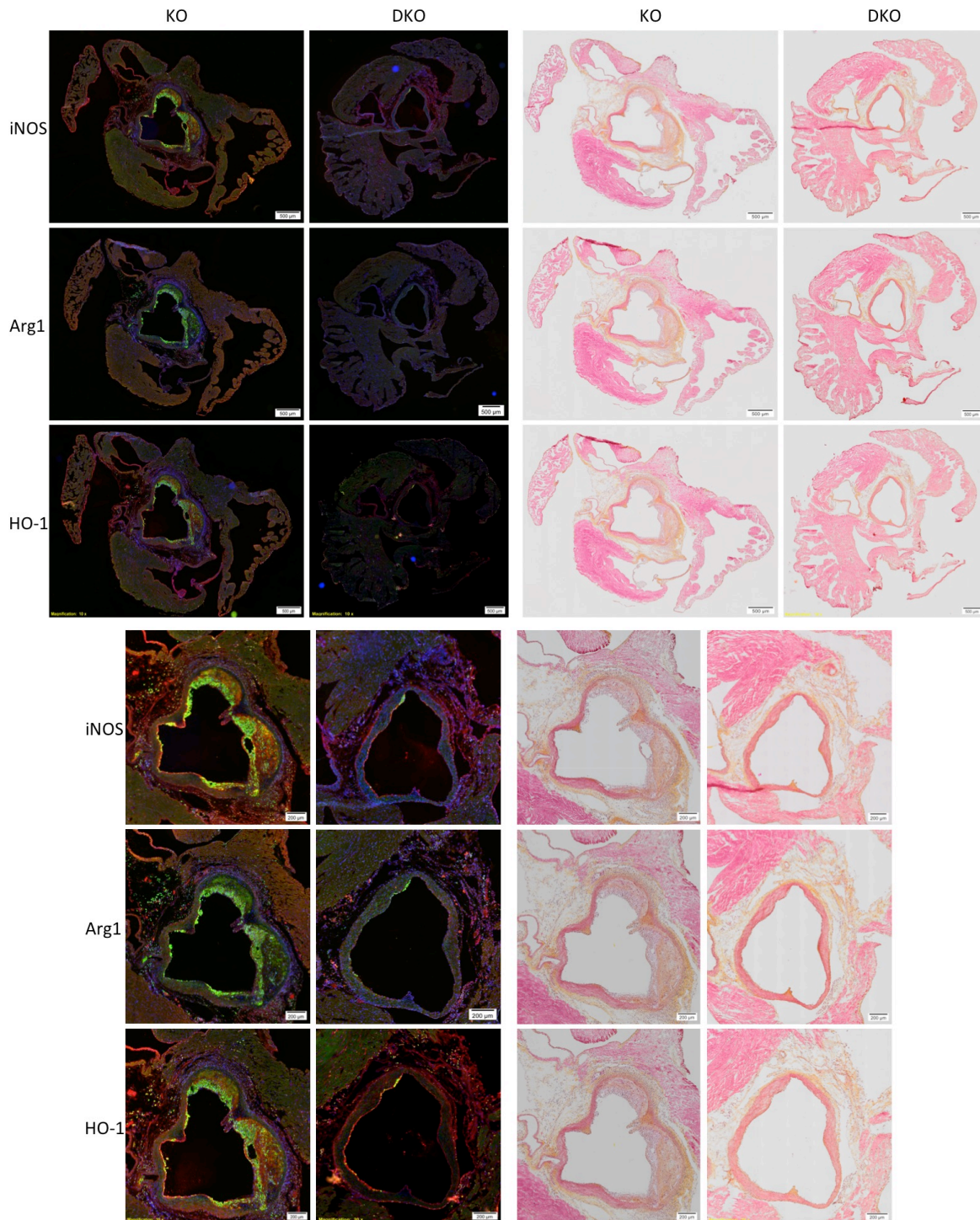


Figure III.11. Effet de l'inactivation de $P2y_6$ sur la polarisation des macrophages présents dans les lésions aortiques de souris $ApoE^{-/-}$. Analyse I.

Les cœurs de souris $ApoE^{-/-}$ (KO) et $ApoE^{-/-} \times P2y_6^{-/-}$ (DKO) ont été coupés en sections dites de L1 à L5 et les coupes ont été congelées à -80°C . L'immunofluorescence et la coloration HES ont été réalisées comme expliqué dans l' « Annexe 1 : Matériels et méthodes complémentaires ».

Les macrophages sont caractérisés par l'expression de CD68 (vert), les macrophages M1 par l'expression de CD68 (vert) et iNOS (rouge), les macrophages M2 par l'expression de CD68 (vert) et ARG1 (rouge) et les macrophages HO^+ par l'expression de CD68 (vert) et HO-1 (rouge).

A gauche : immunofluorescence. Expression de CD68 (vert) et d'iNOS, ARG1 ou HO-1 (rouge). A droite : coloration HES. Objectif 10x (haut) et 20 x (bas). Les résultats sont représentatifs de 7 expériences indépendantes ($n = 7$).

Nos résultats confirment que chez les souris DKO, les lésions sont en moyenne réduites par rapport aux souris KO *ApoE*^{-/-}, comme illustré pour deux analyses comparatives représentatives pour des souris KO et DKO (Figs. III. 11 et III.12).

Après acquisition des images, une coloration hématoxyline-éosine-safran (noyau-cytoplasme-collagène) a été réalisée sur les mêmes coupes (Figs. III.11 et III.12).

Sur base des sept séries de coupes analysées, nous avons essayé d'évaluer l'abondance des macrophages totaux (CD68⁺), des macrophages M1 (CD68⁺ et iNOS⁺), des macrophages M2 (CD68⁺ et ARG1⁺) et des macrophages exprimant la HO-1 (CD68⁺ et HO-1⁺), ces derniers pouvant correspondre à des macrophages Mox, mais aussi à des macrophages M1.

Il semblerait que le nombre de macrophages M1 diminue de manière significative lorsque la taille des lésions athéroscléreuses du modèle « DKO » *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-} diminue, par rapport au modèle de souris « KO » *ApoE*^{-/-} ($p < 0.05$). Le nombre de macrophages M2, bien que déjà faible chez les souris KO, semble également diminuer dans le modèle DKO par rapport au modèle *ApoE*^{-/-} ($p < 0.01$). Nous observons une tendance similaire en ce qui concerne les macrophages exprimant la HO-1 (non significatif, $p > 0.05$) (Figs. III.11, III.12 et III.13 A). Ces résultats sont attendus vu la diminution spectaculaire du nombre total de macrophages, visible à l'œil nu sur les micrographies.

Nous avons aussi voulu voir si la proportion de macrophages M1 et M2 était différente chez les souris KO et DKO. Nous avons donc estimé les ratios des cellules M1, M2 et exprimant la HO-1 par rapport aux macrophages CD68⁺.

Cependant, nos résultats ne montrent pas de changement significatif dans l'abondance relative des macrophages M1, M2 et les macrophages HO-1⁺, même si pour les derniers on observe une tendance à la diminution chez les souris DKO (Figs. III.11, III.12 et III.13 B).

La diminution de l'expression des différents marqueurs de polarisation serait donc probablement liée à la diminution du nombre de macrophages suite à la diminution de taille des lésions.

En conclusion, dans nos conditions, nous avons montré *in vitro* que l'UDP, ligand de P2Y₆, semble induire un phénotype plutôt pro-inflammatoire dans les macrophages (augmentation non significative de l'expression de l'*iNOS* et de l'*Il-6* et diminution significative de l'expression de *Mrc1*).

In vivo, au vu de l'absence de modification de ratio (marqueur d'intérêt/CD68) (Fig. III.13 C), il semblerait que l'invalidation du récepteur P2Y₆ prévienne les lésions, par un mécanisme encore non identifié, mais sans qu'il n'y ait d'effet significatif sur les proportions relatives des macrophages M1 et M2. Nos données confirment également que les macrophages exprimant la HO-1 sont abondants. Nous avons calculé le rapport des macrophages M1 sur les macrophages HO-1⁺ (Fig. III.13 D). Bien que la tendance soit non significative, nos données suggèrent que chez les DKO, ce serait majoritairement des macrophages M1, ce qui n'est pas le cas chez les KO.

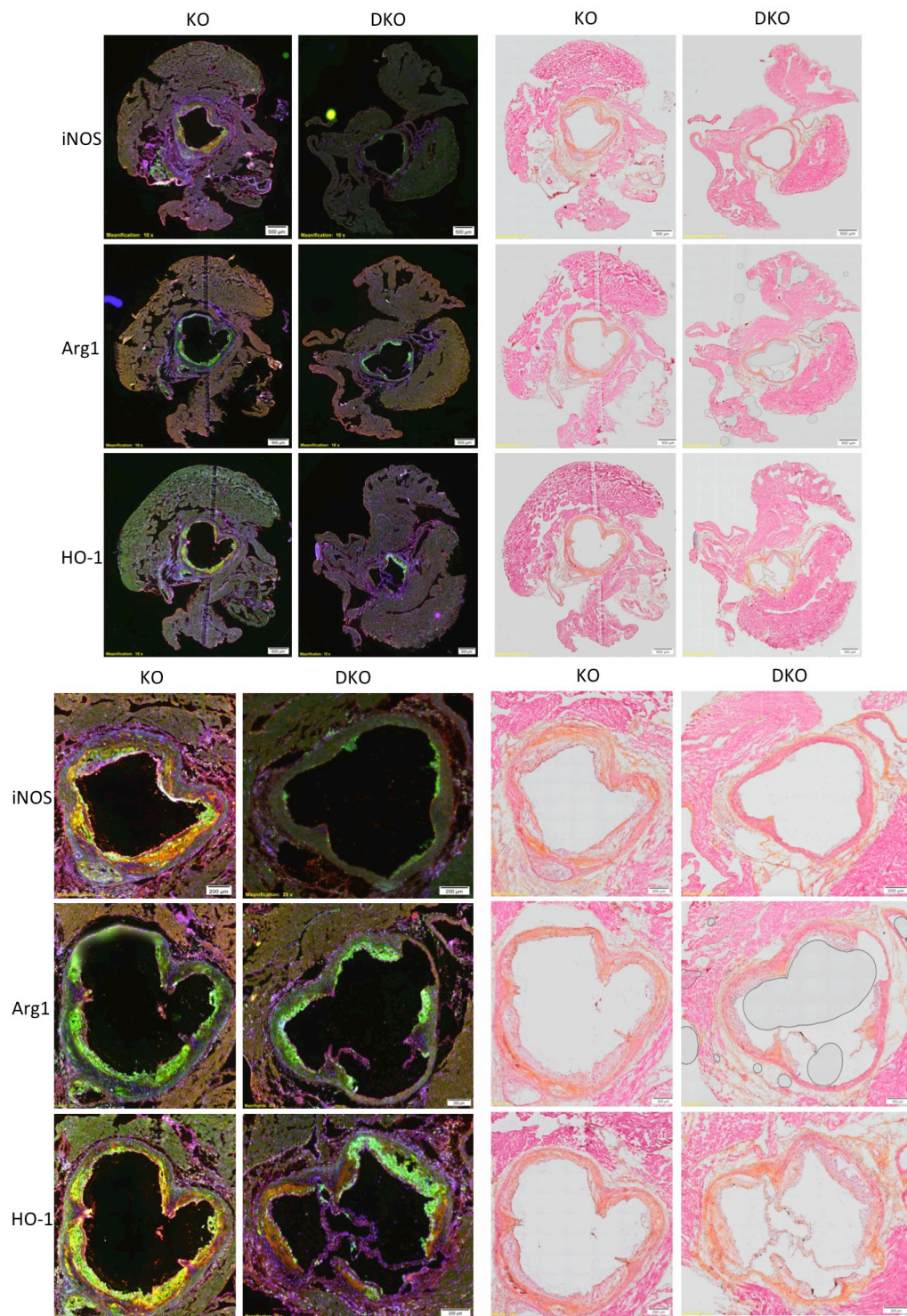


Figure III.12. Effet de l'inactivation de $P2y_6$ sur la polarisation des macrophages présents dans les lésions aortiques de souris $ApoE^{-/-}$. Analyse II.

Les cœurs de souris $ApoE^{-/-}$ (KO) et $ApoE^{-/-} \times P2y_6^{-/-}$ (DKO) ont été coupés en sections dites de L1 à L5 et les coupes ont été congelées à -80°C . L'immunofluorescence et la coloration HES subséquente ont été réalisées comme expliqué dans l'« Annexe 1 : Matériels et méthodes complémentaires ».

Les macrophages sont caractérisés par l'expression de CD68 (vert), les macrophages M1 par l'expression de CD68 (vert) et iNOS (rouge), les macrophages M2 par l'expression de CD68 (vert) et ARG1 (rouge) et les macrophages HO^+ par l'expression de CD68 (vert) et HO-1 (rouge).

A gauche : immunofluorescence. Expression de CD68 (vert) et d'iNOS, ARG1 ou HO-1 (rouge). A droite : coloration HES. Objectif 10x (haut) et 20 x (bas). Les résultats sont représentatifs de 7 expériences indépendantes ($n = 7$).

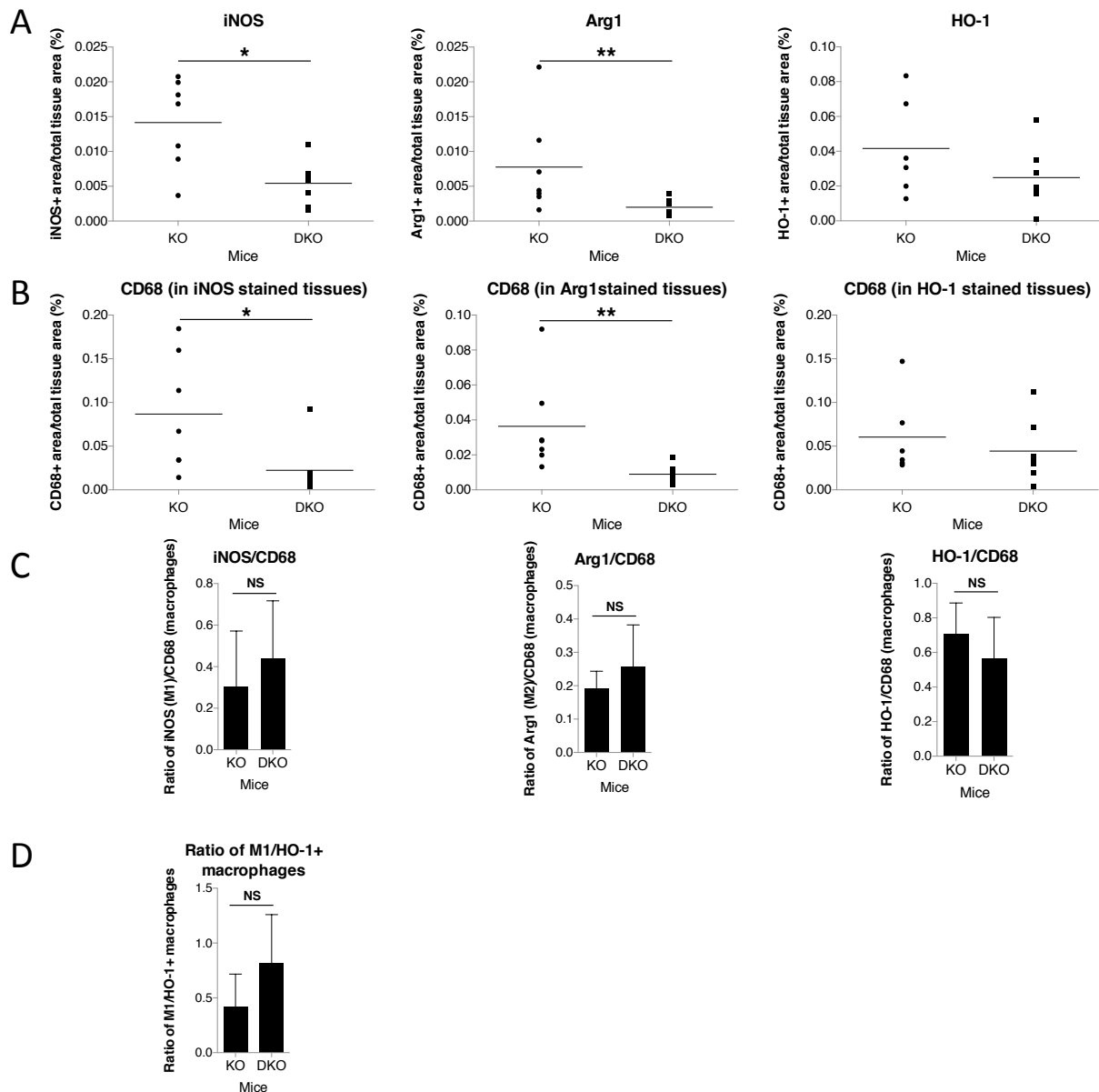


Figure III.13. Effet de l'inactivation de $P2y_6$ sur la polarisation des macrophages présents dans les lésions aortiques de souris $ApoE^{-/-}$.

Les cœurs de souris $ApoE^{-/-}$ (KO) et $ApoE^{-/-} \times P2y_6^{-/-}$ (DKO) ont été coupés en sections dites de L1 à L5 et les coupes ont été congelées à -80°C . L'immunofluorescence a été réalisée comme expliqué dans l'« Annexe 1 : Matériels et méthodes complémentaires ».

La surface totale positive regroupant les macrophages M1, M2 ou HO-1 positifs (HO-1⁺) a été quantifiée au moyen du logiciel Fiji (Image J). Les macrophages sont caractérisés par l'expression de CD68 (vert), les macrophages M1 par l'expression de CD68 et iNOS, les macrophages M2 par l'expression de CD68 et ARG1 et les macrophages HO-1⁺ par l'expression de CD68 et HO-1.

(A) Quantification des macrophages M1, M2 et HO-1⁺ dans les lésions aortiques de souris $ApoE^{-/-}$ (KO) et $ApoE^{-/-} \times P2y_6^{-/-}$ (DKO).

(B) Quantification des macrophages (CD68) dans les lésions aortiques de souris $ApoE^{-/-}$ (KO) et $ApoE^{-/-} \times P2y_6^{-/-}$ (DKO).

(C) Ratio de la surface regroupant les macrophages M1, M2 ou HO-1⁺ sur la surface regroupant les macrophages totaux présents dans les lésions.

(D) Ratio de surface regroupant les macrophages M1 (iNOS⁺CD68⁺) sur la surface regroupant les macrophages HO-1⁺ (HO-1⁺/CD68⁺).

Les données sont exprimées comme moyenne \pm SD ($n = 7$). Test U de Mann-Whitney (test non paramétrique): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; et *** $p < 0.001$.

3.3 ETUDE DE LA POLARISATION DES MONOCYTES ET DES MARQUEURS INFLAMMATOIRES ET DU STRESS OXYDATIF CHEZ DES PATIENTS HEMODIALYSES

L'athérosclérose étant une maladie typiquement humaine, il faut rester prudent dans l'analyse des résultats obtenus à partir de modèles murins, puisqu'il est nécessaire de modifier le génome de ces souris afin qu'elles développent des lésions athéroscléreuses. Nous avons donc décidé de travailler également chez l'homme, en réalisant des expériences peu invasives et en s'intéressant, plus en amont, à la polarisation des monocytes de patients hémodialysés, à risque pour des maladies cardiovasculaires, et à plusieurs paramètres tels que la concentration chez ces patients en Mox-LDLs ou en M-CSF, qui peuvent tous les deux influencer cette polarisation.

3.3.1 Article en préparation

L'article intitulé « M2 monocyte polarization in dialyzed patients is associated with increased levels of M-CSF and myeloperoxidase-associated oxidative stress » regroupe les résultats obtenus après avoir étudié le phénotype des monocytes circulants de patients hémodialysés et quantifié plusieurs paramètres pouvant être impliqués dans la polarisation de ces monocytes et/ou dans la progression accélérée des lésions athéroscléreuses de ces patients.

Les matériels et les méthodes qui s'y rapportent, les résultats obtenus et la discussion sont présentés dans l'article.

M2 monocyte polarization in dialyzed patients is associated with increased levels of M-CSF and myeloperoxidase-associated oxidative stress

Valérie Pireaux^a, Cédric Delporte^b, Alexandre Rousseau^c, Jean-Marc Desmet^d, Joëlle Nortier^e Pierre Van Antwerpen^b, Martine Raes^a, Karim Zouaoui Boudjeltia^c.

^aURBC-Narilis, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, Namur, Belgium.

^bLaboratory of Pharmaceutical Chemistry and Analytical Platform of the Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (Campus de la Plaine) CP205/05, Boulevard du Triomphe, Brussels, Belgium.

^cLaboratory of Experimental Medicine (ULB 222 Unit), Université Libre de Bruxelles, CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale, Montigny-Le-Tilleul, Belgium.

^dNephrology-Hemodialysis Unit, CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale, Montigny-Le-Tilleul, Belgium.

^eNephrology Department, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

Valérie Pireaux

URBC-Narilis, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

valerie.pireaux@unamur.be

Cédric Delporte

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry and Analytical Platform of the Faculty of Pharmacy, ULB (Campus de la Plaine) CP205/05, Boulevard du Triomphe, Brussels, Belgium

cedric.delporte@ulb.ac.be

Alexandre Rousseau

Laboratory of Experimental Medicine (ULB 222 Unit), Université Libre de Bruxelles, CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale, Montigny-Le-Tilleul, Belgium

alexandre.rousseau@chu-charleroi.be

Jean-Marc Desmet

Nephrology-Hemodialysis Unit, CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale, Montigny-Le-Tilleul, Belgium.

jeanmarc.desmet@chu-charleroi.be

Joëlle Nortier

Nephrology Department, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

joelle.nortier@erasme.ulb.ac.be

Pierre Van Antwerpen

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry and Analytical Platform of the Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (Campus de la Plaine) CP205/05, Boulevard du Triomphe, Brussels, Belgium

pierre.van.antwerpen@ulb.ac.be

Martine Raes

URBC-Narilis, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

martine.raes@unamur.be

Tel. : +32 81 72 41 24

Fax.: +32 81 72 41 35

Corresponding author:

Karim Zouaoui Boudjeltia

Laboratory of Experimental Medicine (ULB 222 Unit), Université Libre de Bruxelles,
CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale, Montigny-Le-Tilleul, Belgium

kzouaoui@ulb.ac.be

Tel. : +32 71 92 47 05

Fax. : +32 71 92 47 10

Prof. Karim Zouaoui Boudjeltia and Prof. Martine Raes co-directed this work.

Abstract

Background: Cardiovascular diseases represent a major issue in terms of morbidity and mortality for dialysis patients. This morbidity is due to the accelerated atherosclerosis observed in these patients. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by key players such as monocytes, macrophages or oxidized LDLs. Monocytes-macrophages are classified into subsets of polarized cells, with M1 and M2 macrophages considered respectively as pro- and anti-inflammatory.

Methods: The monocyte subsets and phenotypes were analyzed by flow cytometry. These data was completed by the quantification of plasma M-CSF, IL-8, CRP, Mox-LDLs, Apo-B and Apo-AI, chloro-tyrosine and homocitrulline concentrations. The statistical differences and associations between two continuous variables were assessed using the Mann-Whitney U test and Spearman's correlation coefficient, respectively.

Results: Hemodialyzed patients showed a significant increase in the concentrations of CRP, M-CSF and IL-8 (inflammation biomarkers) as well as of chloro-tyrosine and homocitrulline (myeloperoxidase-associated oxidative stress biomarkers). Moreover we observed a higher percentage of M2 monocytes in the plasma of hemodialysis patients, as compared to the controls.

Conclusions: Our data suggests that an oxidative stress and an inflammatory environment, amplified in hemodialysis patients, seems to favor an increase in the concentration of circulating M-CSF, therefore leading to an increase of M2 polarization among circulating monocytes.

Keywords: dialysis, inflammation, monocytes, myeloperoxidase, oxidation, polarization

Short summary:

Our data suggests that an oxidative stress and an inflammatory environment, amplified in hemodialysis patients, seems to favor an increase in the concentration of circulating M-CSF, associated with an increase of circulating M2 polarized monocytes.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) account for approximately 30 to 40 % of deaths among dialysis patients ((USRDS, 2015), updated 9/19/2016). They represent a major issue in terms of morbidity and mortality for the latter, and specifically in the case of hemodialyzed (HD) patients showing a 5-year survival rate on stable HD (for a review, see (Walter et al., 2002)). The morbidity associated with CVD is due to accelerated atherosclerosis, that has been shown to be present in carotid arteries of HD patients as opposed to aged-matched healthy controls, with a higher thickness of media/intima, as well as with arterial stiffness and calcification within the plaques (Goodman et al., 2000; Kawagishi et al., 1995; Savage et al., 1998; Stenvinkel et al., 1999).

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease affecting mainly medium and large size arteries. Indeed, injuries or local blood flow perturbations lead to an increased permeability of the endothelial layer, favoring lipoprotein infiltration in the intima where they get oxidized and become atherogenic (for reviews, see (Lusis, 2000; Tabas et al., 2015; Woollard and Geissmann, 2010)). This oxidation activates endothelial cells, enhancing chemokine and cytokine secretion and finally inducing the recruitment of monocytes that will differentiate into macrophages in the intima (Tabas et al., 2015; Woollard and Geissmann, 2010).

Monocytes-macrophages are important key players in the initiation and evolution of atherosclerotic lesions. They display high plasticity and heterogeneity and are activated by different signals varying according to the cellular environment, modulating their phenotypes as an adaptive response. The classification of monocytes and macrophages is based on the nomenclature of Th1/Th2 immune cells. *In vitro*, the M1 phenotype corresponding to “classically-activated macrophages” is obtained when they are exposed to IFN γ combined with a TNF α inducer such as LPS or to GM-CSF (Fleetwood et al., 2009; Labonte et al., 2014; Liberale et al., 2017; Mantovani et al., 2004). M1 macrophages display pro-inflammatory properties and are mostly involved in acute host defense towards intracellular microorganisms, in tumor resistance and tissue destruction thanks to their capacity to produce bursts of reactive oxygen and nitrogen species and to secrete pro-inflammatory cytokines (eg. IL-6 and IL-8) (Mantovani et al., 2004; Sica and Mantovani, 2012). On the opposite, anti-inflammatory M2 macrophages resolve inflammation by the production of anti-inflammatory mediators (Sica and Mantovani, 2012; Wolfs et al., 2011). They take part in matrix remodeling, angiogenesis, tissue repair and healing but can also be immunosuppressive promoting tumor development (Biswas et al., 2012; Liu et al., 2014). This phenotype can be induced by M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), by IL-4 and IL-13 (M2a), by immune complexes, TLR agonists or IL-1R (M2b) or by IL-10, as well as by glucocorticoid or secosteroid hormones (M2c) (Fleetwood et al., 2009; Gordon and Martinez, 2010; Labonte et al., 2014; Mantovani et al., 2004). M2a macrophages are characterized by the expression of markers such as CD206, CD163 and dectin-1, M2b by the expression of IL-10, MHC-II and CD206 and M2c by the expression of CD163, CD206 and Tie-2 (Liberale et al., 2017). In this study, we decided to keep the M1/M2 classification, even though we are aware that it is mainly based on *in vitro* studies that do not adequately mirror the complexity of the cell environment *in vivo*.

In the literature, the polarization of macrophages has been much more documented over the last years in macrophages compared to monocytes. However the term of “polarization” has also been suggested to be of interest for circulating monocytes (Gordon and Taylor, 2005).

The cause of accelerated atherosclerosis in dialysis patients is not known yet, even though several major risk factors are well represented such as high blood pressure, higher concentrations of plasma lipids, inflammation (eg. elevated homocysteine, CRP (C-reactive protein) or fibrinogen levels), oxidative stress, hyperinsulinemia, mineral metabolism disorders or anemia (for reviews, see (Garcia-Lopez et al., 2007; Harmankaya et al., 2015)).

In this study, we investigated whether the polarization of circulating monocytes would be different in hemodialysis patients versus healthy volunteers and whether it could be correlated with the inflammatory status, assessed by quantifying inflammatory proteins (IL-8, CRP and M-CSF) in the plasma. Oxidative stress was also monitored by assessing homocitrulline (Hcit). Homocitrulline is a product of protein carbamylation, generated non enzymatically from lysine residues by the action of cyanate. Cyanate is itself derived from the spontaneous decomposition of urea or via the oxidation of thiocyanate by myeloperoxidase in the presence of H₂O₂ (Turunen et al., 2014). Finally, to have a glance on the lipoprotein status, Apo-AI, Apo-B, but also myeloperoxidase-oxidized LDLs (Mox-LDLs) were quantified in dialysis patients versus healthy volunteers.

Subjects and methods

2.1. Study participants

27 patients undergoing hemodialysis and 23 healthy volunteers were studied (see Table S1 in supplementary data). They were recruited at the Nephrology unit of the CHU-Charleroi, ISPPC Hôpital Vésale in Belgium. Subjects were aged between 51 ± 28 years (healthy volunteers) and 71 ± 14 years (hemodialyzed patients). Blood samples were collected just before dialysis.

A written informed consent was obtained from each patient and healthy donor included in the study. The protocol of the study was in conformity with the ethical guidelines of the Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2000) and was approved by the Institution's ethics committee.

2.2. Flow cytometry

100 μ L of total blood from patients were incubated for 15 minutes at RT with PE mouse anti-human CD14 and V500 mouse anti-human CD16 antibodies (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) as well as with mouse anti-human CD86-FITC and anti-human CCR2-APC monoclonal antibodies (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for determining the M1 polarization or with mouse anti-human CD206-FITC, anti-human CXCR3-APC and anti-human CD163-VioBlue monoclonal antibodies (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for the M2 polarization. Red blood cells were then eliminated by adding BD FACS Lysing Solution (dilution: 1/20) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) to total blood and remaining cells were washed twice with 1 mL of running buffer. Cells were finally resuspended in 300 μ L of running buffer for analysis. The matching isotype controls were used for each antibody in order to define the threshold. The analysis was performed using the MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), applying a gating strategy based on the SSC vs PE gate (CD14), selecting the monocyte population. Classical monocytes were defined based on a high expression of CD14 and a low expression of CD16 (CD14⁺CD16⁻). Intermediate monocytes were defined based on a high expression of CD14 and CD16 (CD14⁺CD16⁺), while non-classical monocytes were characterized by a low expression of CD14 and a high expression of CD16 (CD14⁻CD16⁺).

2.3. Measurements of myeloperoxidase-modified LDLs, M-CSF and IL-8 (ELISA assays)

Antibodies used for the measurement of myeloperoxidase-modified LDLs (Mox-LDLs) were previously fully characterized (Moguilevsky et al., 2004). They react with the ApoB-100 protein moiety and provide positive signals in human atherosclerotic lesions (Moguilevsky et al., 2004).

Human serum IL-8 and M-CSF ELISA assays were performed following manufacturer's instructions (IL-8: BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; M-CSF: R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.4. Quantitative analysis of CRP, Apo-AI and Apo-B

Serum parameters such as hs-CRP, Apo-AI and Apo-B were evaluated by antibody-binding and turbidity measurement on SYNCHRON LX®.

2.5. Homocitrulline, lysine (Lys), chloro-tyrosine (Cl-Tyr) and tyrosine (Tyr) quantification by LC-MS/MS

Protein-bound homocitrulline and chloro-tyrosine were monitored in plasma after acid hydrolysis as previously described (Delporte et al., 2012). Briefly, plasma (20 μ L) was placed into the vial, 200 μ L of acid mixture (6 M HCl supplemented with 0.05% (m/v) phenol) and internal standards were added. Hydrolysis was carried out for 35 min at 110°C. $^{13}\text{C}_9$ -Tyr and $^{13}\text{C}_{15}\text{N}$ -Lys were used as internal standards. Samples were evaporated to dryness under nitrogen flow, labeled with a butanolic HCl solution, dried under nitrogen flow and finally dissolved in 1.0 mL formic acid 0.1 % in water before injection into the LC-MS system. The LC system was a 1290 Infinity series UHPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Amino acid residues were resolved on a Poroshell 120 EC-C18 column (2.1 \times 100 mm, 2.7 μ m) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using a gradient of 0.2 % formic acid and methanol. Amino acid residues were quantified by tandem MS on a 6490 series ESI-triple quadrupole mass spectrometer using a JetStream source (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Data was acquired using MassHunter Acquisition® software and analyzed by MassHunter Quantitative Analysis® software (Version B.07, Agilent Technologies). Data is expressed as ratio of homocitrulline to lysine and ratio of chloro-tyrosine to tyrosine.

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SigmaPlot (version 12.5) software. The Shapiro-Wilk test was used to assess normal distribution. Continuous non-normally distributed data was expressed as median and interquartile range. They were analyzed by Mann-Whitney U test. A correlation was checked using Spearman's *r* coefficient. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Circulating anti-inflammatory and immunosuppressive monocytes are increased in HD patients

At first, the monocyte phenotype and polarization were investigated in hemodialyzed patients (HD) versus non-HD donors. Based on the CD14 and CD16 expression, we observed a significant decrease in the percentage of classical CD14⁺CD16⁻ monocytes in HD patients compared to healthy subjects (controls) ($p < 0.05$), while the percentage of intermediate CD14⁺CD16⁺ and non-classical CD14⁻CD16⁺ monocytes was similar in the two groups (Fig. 1 A).

Then, assessing the expression of M1 (CD86 and CCR2) and M2 (CD206, CXCR3 and CD163) protein markers, we observed that, in comparison to the healthy subjects, HD patients showed an increased percentage of anti-inflammatory and immunosuppressive CD206⁺CXCR3⁺CD163⁺ M2 monocytes ($p < 0.01$), while the pro-inflammatory CD86⁺CCR2⁺ M1 monocyte population did not seem to be modified ($p > 0.05$) (Figs. 1 B and 1C). While analyzing the M1 or M2 predominance in the different monocyte subpopulations, we observed an increase in the M2 CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation ($p < 0.001$), as well in the M2 CD14⁻CD16⁺ monocytes ($p < 0.05$), in HD patients, as opposed to the controls (Fig. 1 E). There was no significant difference in the M1 CD86⁺CCR2⁺ monocyte subpopulations (Fig. 1 D).

Biomarkers of inflammation, including M-CSF, are increased in HD patients

Because M-CSF is described as an inflammation biomarker, known to favor macrophage polarization, we decided to measure the blood concentration of M-CSF, but also of other recognized inflammation markers such as IL-8, as well as CRP, shown to induce M-CSF secretion by endothelial cells (Fig. 2).

As a result, we observed that the concentration of M-CSF was significantly higher in the blood of HD patients as compared to healthy individuals ($p < 0.001$) (Fig. 2 A). These results are in agreement with the data of Nitta et al. (2001) and Nishida et al. (2016) (Nishida et al., 2016; Nitta et al., 2001). We also observed that this increased concentration positively correlated with the increased percentage of M2 monocytes in HD patients ($r = 0.48$; $p < 0.0004$) (Fig. 3A). Plasma CRP as well as IL-8 concentration was also increased in HD patients in comparison with the controls (respectively $p < 0.01$ and $p < 0.001$) (Fig. 2 A).

HD patients undergo myeloperoxidase-dependent oxidative stress

Besides inflammatory proteins and M-CSF, we also measured the plasma concentration of myeloperoxidase (MPO)-oxidized LDLs (Mox-LDLs) and chloro-tyrosine (Cl-Tyr), a product of LDL oxidation by MPO (Fig. 2). The abundance of apolipoprotein-AI (constituent of High-Density Lipoproteins) and Apo-B (constituent of Low-Density Lipoproteins) was also assessed (Fig. 2).

Interestingly, an increase in the plasma concentration of Mox-LDLs (ratio of Mox-LDLs/Apo-B) was observed in hemodialysis patients, even though this trend was not significant ($p = 0.11$). The concentration of chloro-tyrosine (Cl-Tyr) also increased in the plasma of HD patients, as compared to healthy controls ($p < 0.001$) (Fig. 2 B). This increase positively correlated with the increase in the percentage of M2 monocytes

($r = 0.43$; $p = 0.001$) in HD patients and in healthy controls (Fig. 3 B). In addition, a significant decrease in the Apo-AI concentration, the major apolipoprotein of high-density lipoprotein, was observed in the blood of HD patients, as opposed to the controls ($p = 0.002$) (Fig. 2 B).

Finally, the concentration of homocitrulline was quantified. Homocitrulline is a product of protein carbamylation, that accumulates after oxidation of thiocyanate by myeloperoxidase in the presence of H_2O_2 (Turunen et al., 2014). An increase in protein carbamylation has been observed in inflammatory diseases such as atherosclerosis (Turunen et al., 2014). The plasma concentration of homocitrulline (Hcit) increased in HD patients, as compared to the controls (Fig. 2 C).

Discussion

Our data suggest that an oxidative stress and an inflammatory environment, amplified in hemodialysis (HD) patients, seems to favor an increase in the concentration of circulating M-CSF, associated with an increase in M2 polarization among monocytes in bloodstream.

Accelerated atherosclerosis is a major problem in terms of morbidity for HD patients. Monocytes and macrophages are key cells in the pathophysiology of atherosclerosis. Indeed, they contribute to the lesion development after infiltration of the monocytes into the intima and their differentiation into macrophages. Besides producing inflammatory mediators contributing to the evolution of the lesion, macrophages also accumulate modified LDLs and become foam cells, a hallmark of atherosclerotic lesions (Tabas et al., 2015).

In this study, we decided to investigate the monocytes in the blood of HD patients, taking into account their polarization. Unexpectedly we observed an increase in the percentage of circulating M2 monocytes.

Therefore we wondered why the percentage of circulating M2 monocytes increased in hemodialysis patients. M-CSF, a hematopoietic growth factor, considered as a potent cytokine, is a keyplayer in monocyte differentiation into macrophages, regulating monocyte and macrophage survival, proliferation and activation (Fleetwood et al., 2009; Mia et al., 2014). In agreement with other studies (Ito et al., 2004; Nishida et al., 2016), we showed that M-CSF concentration was higher in the plasma of HD patients, in comparison to healthy individuals.

M-CSF level in the circulation increases in various pathologies such as cancer, infections and chronic inflammatory diseases (Chitu and Stanley, 2006; Hamilton, 2008; Hume and MacDonald, 2012). It is produced by arterial wall cells such as endothelial cells and fibroblasts, as well as by macrophages in atherosclerotic lesions (Clinton et al., 1992; Kihara et al., 2005; Shyy et al., 1993). Several studies in mice and humans have linked M-CSF to chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis and concluded that M-CSF would have a pro-atherogenic role (Irvine et al., 2009; Zhao et al., 2006). Indeed M-CSF has been detected within atherosclerotic lesions where it is overexpressed as compared to healthy artery tissues (Clinton et al., 1992). Furthermore, Smith et al. showed that the size of lesions of hyperlipidemic *ApoE*^{-/-} mice, deficient in M-CSF, is reduced (Smith et al., 1995).

Devaraj et al. showed that CRP, a pro-inflammatory protein, induces the production of M-CSF by endothelial cells and macrophages (Devaraj et al., 2009). We showed here that CRP concentration indeed increased in the plasma of HD patients.

We also quantified the level of plasma IL-8 to further confirm the pro-inflammatory status: the plasma concentration of this protein was also increased in HD patients in comparison with healthy volunteers.

Several teams showed that oxidized LDLs induce IL-8 secretion in cultured endothelial cells (Dje N'Guessan et al., 2009) and in vascular smooth muscle cells (Ryoo et al., 2004). Others recently identified CRP in the supernatants of human aortic endothelial cells stimulated with Ox-LDLs (Tsai et al., 2012). Besides IL-8, elevated levels of CRP and oxidized LDLs were found to positively correlate with cardiovascular diseases (for a review, see (Obradovic et al., 2015)). Mox-LDLs were also shown to trigger IL-8 secretion in endothelial cells (Boudjeltia et al., 2006). Mox-LDLs are the result of LDL

oxidation by myeloperoxidase, a cationic enzyme considered as one of the physiologically relevant oxidative systems of LDLs. In this work, we observed that the serum Mox-LDLs raised in HD patients at the limit of the significance while chloro-tyrosines detected on plasmatic proteins significantly increased. These modifications due to MPO activity are also detected in atherosclerotic lesions (Hazen and Heinecke, 1997; Moguilevsky et al., 2004). We also observed a higher level of plasma homocitrulline in HD patients, in comparison to the controls. As already mentioned, homocitrulline is a product of protein carbamylation, considered, at least in part, as a biomarker of MPO activity in the presence of H₂O₂ (Turunen et al., 2014). An increase in protein carbamylation has been observed in inflammatory diseases such as atherosclerosis (for a review, see (Turunen et al., 2014)). Carbamylated proteins are indeed important in the atherosclerosis process, as it has been shown that carbamylated LDLs induce monocyte adhesion to vascular endothelial cells (Apostolov et al., 2007). Moreover, carbamylated HDLs have been shown to contribute to foam cell formation (Holzer et al., 2011). Patients suffering from renal failure with uremia also displayed an increase in protein carbamylation, along with an increase in homocitrulline concentration (Desmons et al., 2016). This is consistent with our data, showing an increased concentration of plasma homocitrulline in HD patients. Taken all together, our data suggests a MPO-dependent oxidative stress in HD patients.

Therefore it is possible that Mox-LDLs and chloro-tyrosine on plasma proteins, more abundant in HD patients, induce the production of IL-8 and CRP, leading to their increase in the plasma and then to an increase in plasma M-CSF concentration.

Pireaux et al. showed *in vitro* that Mox-LDLs enhance a M2 phenotype in murine macrophages (Pireaux et al., 2016). Thus the increased concentrations of Mox-LDLs, and chloro-tyrosine on plasma proteins and M-CSF could explain the increased percentage of M2 monocytes observed in HD patients in our study. Further analyses are needed in order to validate this hypothesis.

In the context of renal pathology, studies showed that the percentage of M2 monocytes is also modified in the renal stroma of patients. However the recruitment and the role of CD163+ M2 macrophages in the dysfunctional kidney is not understood yet. There is evidence that they could be involved in the disease progression, with studies showing an association between increased CD163+ M2 macrophages infiltration and decreased renal function. Other studies showed that CD163+ M2 macrophages are associated with renal dysfunction as it progresses from the acute inflammatory to chronic fibrotic phase as the M2/M1 macrophages ratio increased (Han et al., 2013; Olmes et al., 2016). However Lu et al. (2013) proposed a role in tissue repair, restoration of tissue integrity and improvement of renal function by showing that CD163+ M2a and M2c macrophages were protective against renal inflammation and renal injury in chronic kidney disease (Lu et al., 2013).

Thus it remains unclear whether CD163+ M2 macrophages are primary actors of disease progression or are recruited in order to limit as much as possible inflammation induced tissue damage.

Considering that HD patients suffer from accelerated atherosclerosis, we were surprised to observe an increase in the circulating M2 monocytes. Indeed, M2 polarization among macrophages is usually considered as protective in atherosclerosis. M2 macrophages have been predominantly detected in early lesions of *ApoE*^{-/-} mouse lesions (Khallou-

Laschet et al., 2010), but also in regressing plaques (Feig et al., 2011a) or in the human perivascular adventitial tissue (Stoger et al., 2012). But M2 monocytes-macrophages are heterogeneous and can be considered as anti- or pro-atherogenic, depending on the stimuli and on the proteins they express. The increase in M2 monocytes in HD patients, characterized by accelerated atherosclerosis, could then be explained by two hypotheses. First, the M2 polarization is pro-atherogenic, as it has been hypothesized for IL-4-induced M2 macrophages (Pello et al., 2011). Indeed it has been shown that IL-4 induces the expression of the scavenger receptor CD36 in macrophages, promoting oxidized LDL uptake. IL-4 also upregulates the expression of matrix metalloproteinases, involved in the matrix degradation and plaque instability (Pello et al., 2011). It is thus possible that, in our study, the increased percentage of M2 monocytes would contribute to the progression of the lesions. Second, the M2 polarization is anti-atherogenic, thanks to the M2 monocyte-macrophage anti-inflammatory actions and their role in apoptotic cell efferocytosis. Studies like the one of Sharma et al. showed that M2 macrophages can be protective against atherogenesis at least in mice. They observed that *ApoE*^{-/-} mice deficient in *Klf4*, a transcription factor responsible for M2 polarization, develop more inflammation and atherosclerotic lesions than *ApoE*^{-/-} mice (Sharma et al., 2012). Hence in our study, the percentage of M2 monocytes would increase as an attempt to limit the development of the progressing atherosclerotic lesions.

In conclusion, these results suggest that the oxidative stress and inflammation, amplified in HD patients, induce the production of M-CSF, itself responsible for enhancing the M2 polarization.

Further analyses are required in order to assess whether these circulating M2 monocytes favor renal dysfunction and accelerated atherogenesis in hemodialysis patients or whether they represent an attempt to limit renal tissue damage and atherogenesis, but that at the end fails, probably due to the frequency of the dialyses.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Financial support

VP was supported by the FRIA (Brussels, Belgium) and the UNamur. This study was in part supported by the scientific commission of CHU-Charleroi. The Analytical Platform of the Faculty of Pharmacy, with the ESI-triple quadrupole mass spectrometer (PVA) was supported by the FNRS.

References

Apostolov, E.O., Shah, S.V., Ok, E., and Basnakian, A.G. (2007). Carbamylated low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial cells through intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 826-832.

Biswas, S.K., Chittechath, M., Shalova, I.N., and Lim, J.Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res* 53, 11-24.

Boudjeltia K. Z., L.I., Van Antwerpen P., Kisoka R. L., Babar S., Moguevsky N., Delree P., Ducobu J., Remacle C., Vanhaeverbeek M., and Brohee D. (2006). Triggering of inflammatory response by myeloperoxidase-oxidized LDL. *Biochem Cell Biol* 84, 805-812.

Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current opinion in immunology* 18, 39-48.

Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W., and Libby, P. (1992). Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 140, 301-316.

Delporte, C., Franck, T., Noyon, C., Dufour, D., Rousseau, A., Madhoun, P., Desmet, J.M., Serteyn, D., Raes, M., Nortier, J., *et al.* (2012). Simultaneous measurement of protein-bound 3-chlorotyrosine and homocitrulline by LC-MS/MS after hydrolysis assisted by microwave: application to the study of myeloperoxidase activity during hemodialysis. *Talanta* 99, 603-609.

Desmons, A., Jaisson, S., Pietrement, C., Rieu, P., Wynckel, A., and Gillery, P. (2016). Homocitrulline: a new marker for differentiating acute from chronic renal failure. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 54, 73-79.

Devaraj, S., Yun, J.M., Duncan-Staley, C., and Jialal, I. (2009). C-reactive protein induces M-CSF release and macrophage proliferation. *J Leukoc Biol* 85, 262-267.

Dje N'Guessan, P., Riediger, F., Vardarova, K., Scharf, S., Eitel, J., Opitz, B., Slevogt, H., Weichert, W., Hocke, A.C., Schmeck, B., *et al.* (2009). Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 380-386.

Feig, J.E., Parathath, S., Rong, J.X., Mick, S.L., Vengrenyuk, Y., Grauer, L., Young, S.G., and Fisher, E.A. (2011). Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation* 123, 989-998.

Fleetwood, A.J., Dinh, H., Cook, A.D., Hertzog, P.J., and Hamilton, J.A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol* 86, 411-421.

Garcia-Lopez, E., Carrero, J.J., Suliman, M.E., Lindholm, B., and Stenvinkel, P. (2007). Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 27 Suppl 2, S205-209.

Goodman, W.G., Goldin, J., Kuizon, B.D., Yoon, C., Gales, B., Sider, D., Wang, Y., Chung, J., Emerick, A., Greaser, L., *et al.* (2000). Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *The New England journal of medicine* 342, 1478-1483.

Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.

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

Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 533-544.

Han, Y., Ma, F.Y., Tesch, G.H., Manthey, C.L., and Nikolic-Paterson, D.J. (2013). Role of macrophages in the fibrotic phase of rat crescentic glomerulonephritis. *American journal of physiology Renal physiology* 304, F1043-1053.

Harmankaya, O., Akalin, N., Akay, H., Okuturlar, Y., Erturk, K., Kaptanogullari, H., and Kocoglu, H. (2015). Comparison of risk factors for cardiovascular disease in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Clinics* 70, 601-605.

Hazen, S.L., and Heinecke, J.W. (1997). 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99, 2075-2081.

Holzer, M., Gauster, M., Pfeifer, T., Wadsack, C., Fauler, G., Stiegler, P., Koefeler, H., Beubler, E., Schuligoi, R., Heinemann, A., *et al.* (2011). Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid Redox Signal* 14, 2337-2346.

Hume, D.A., and MacDonald, K.P. (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* 119, 1810-1820.

Irvine, K.M., Andrews, M.R., Fernandez-Rojo, M.A., Schroder, K., Burns, C.J., Su, S., Wilks, A.F., Parton, R.G., Hume, D.A., and Sweet, M.J. (2009). Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J Leukoc Biol* 85, 278-288.

Ito, A., Shimokawa, H., Meno, H., and Inou, T. (2004). Possible involvement of macrophage-colony stimulating factor in the pathogenesis of cardiac dysfunction in hemodialysis patients. *Jpn Heart J* 45, 497-503.

Kawagishi, T., Nishizawa, Y., Konishi, T., Kawasaki, K., Emoto, M., Shoji, T., Tabata, T., Inoue, T., and Morii, H. (1995). High-resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney international* 48, 820-826.

Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A.T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., *et al.* (2010). Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* *5*, e8852.

Kihara, T., Miyata, Y., Furukawa, M., Noguchi, M., Nishikido, M., Koga, S., and Kanetake, H. (2005). Predictive value of serum macrophage colony-stimulating factor for development of aortic calcification in haemodialysis patients: a 6 year longitudinal study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *20*, 1647-1652.

Labonte, A.C., Tosello-Trampont, A.C., and Hahn, Y.S. (2014). The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Molecules and cells* *37*, 275-285.

Liberale, L., Dallegri, F., Montecucco, F., and Carbone, F. (2017). Pathophysiological relevance of macrophage subsets in atherogenesis. *Thromb Haemost* *117*, 7-18.

Liu, Y.C., Zou, X.B., Chai, Y.F., and Yao, Y.M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International journal of biological sciences* *10*, 520-529.

Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., Wang, Y., Lee, V.W., Zheng, G., Tan, T.K., *et al.* (2013). Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney international* *84*, 745-755.

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

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* *25*, 677-686.

Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X.M., Malmstrom, V., and Harris, R.A. (2014). An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scandinavian journal of immunology* *79*, 305-314.

Moguilevsky, N., Zouaoui Boudjeltia, K., Babar, S., Delree, P., Legssyer, I., Carpentier, Y., Vanhaeverbeek, M., and Ducobu, J. (2004). Monoclonal antibodies against LDL progressively oxidized by myeloperoxidase react with ApoB-100 protein moiety and human atherosclerotic lesions. *Biochem Biophys Res Commun* *323*, 1223-1228.

Nishida, M., Ando, M., Iwamoto, Y., Tsuchiya, K., and Nitta, K. (2016). New Insight into Atherosclerosis in Hemodialysis Patients: Overexpression of Scavenger Receptor and Macrophage Colony-Stimulating Factor Genes. *Nephron Extra* *6*, 22-30.

Nitta, K., Akiba, T., Kawashima, A., Kimata, N., Miwa, N., Uchida, K., Honda, K., Takei, T., Otsubo, S., Yumura, W., *et al.* (2001). Serum levels of macrophage colony-stimulating factor and aortic calcification in hemodialysis patients. *American journal of nephrology* *21*, 465-470.

Obradovic, M.M., Trpkovic, A., Bajic, V., Soskic, S., Jovanovic, A., Stanimirovic, J., Panic, M., and Isenovic, E.R. (2015). Interrelatedness between C-reactive protein and oxidized low-

density lipoprotein. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 53, 29-34.

Olmes, G., Buttner-Herold, M., Ferrazzi, F., Distel, L., Amann, K., and Daniel, C. (2016). CD163+ M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis. *Arthritis research & therapy* 18, 90.

Pello, O.M., Silvestre, C., De Pizzol, M., and Andres, V. (2011). A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 216, 1172-1176.

Pireaux, V., Sauvage, A., Bihin, B., Van Steenbrugge, M., Rousseau, A., Van Antwerpen, P., Zouaoui Boudjeltia, K., and Raes, M. (2016). Myeloperoxidase-oxidized LDLs enhance an antiinflammatory M2 and antioxidant phenotype in murine macrophages. *Mediators of inflammation* 2016, 20.

Ryoo, S.W., Kim, D.U., Won, M., Chung, K.S., Jang, Y.J., Oh, G.T., Park, S.K., Maeng, P.J., Yoo, H.S., and Hoe, K.L. (2004). Native LDL induces interleukin-8 expression via H2O2, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 62, 185-193.

Savage, T., Clarke, A.L., Giles, M., Tomson, C.R., and Raine, A.E. (1998). Calcified plaque is common in the carotid and femoral arteries of dialysis patients without clinical vascular disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 13, 2004-2012.

Sharma, N., Lu, Y., Zhou, G., Liao, X., Kapil, P., Anand, P., Mahabeleshwar, G.H., Stamler, J.S., and Jain, M.K. (2012). Myeloid Kruppel-like factor 4 deficiency augments atherogenesis in ApoE^{-/-} mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2836-2838.

Shyy, Y.J., Wickham, L.L., Hagan, J.P., Hsieh, H.J., Hu, Y.L., Telian, S.H., Valente, A.J., Sung, K.L., and Chien, S. (1993). Human monocyte colony-stimulating factor stimulates the gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 and increases the adhesion of monocytes to endothelial monolayers. *J Clin Invest* 92, 1745-1751.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787-795.

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

Stenvinkel, P., Heimbürger, O., Paulter, F., Diczfalussy, U., Wang, T., Berglund, L., and Jogestrand, T. (1999). Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney international* 55, 1899-1911.

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

Tabas, I., Garcia-Cardena, G., and Owens, G.K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* 209, 13-22.

Tsai, M.H., Chang, C.L., Yu, Y.S., Lin, T.Y., Chong, C.P., Lin, Y.S., Su, M.Y., Yang, J.Y., Shu, T.Y., Lu, X., *et al.* (2012). Chemical analysis of C-reactive protein synthesized by human aortic endothelial cells under oxidative stress. *Analytical chemistry* 84, 9646-9654.

Turunen, S., Koivula, M.-K., Nicholas, A., Risteli, L., and Risteli, J. (2014). Homocitrulline: an analog and confounder related to citrulline. In *Protein deimination in human health and disease*, A. Nicholas, and S. Bhattacharya, eds. (Springer Science + Business Media LLC), pp. 367-376.

USRDS (2015). 2015 United States Renal Data System annual data report.

Walter, R., Mischak, H., and Haller, H. (2002). Haemodialysis, atherosclerosis and inflammation-identifying molecular mechanisms of chronic vascular disease in ESRD patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 17 Suppl 3, 24-29.

Wolfs, I.M., Donners, M.M., and de Winther, M.P. (2011). Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thromb Haemost* 106, 1-9.

Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews Cardiology* 7, 77-86.

Zhao, B., Li, Y., Buono, C., Waldo, S.W., Jones, N.L., Mori, M., and Kruth, H.S. (2006). Constitutive receptor-independent low density lipoprotein uptake and cholesterol accumulation by macrophages differentiated from human monocytes with macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF). *J Biol Chem* 281, 15757-15762.

Figure legends

Figure 1. Effects of hemodialysis on monocyte phenotype and polarization.

M1 and M2 monocytes in the blood of HD patients (n = 27) and healthy subjects (n = 23) were analyzed by flow cytometry. (A) Quantification of classical, intermediate and non-classical monocytes. Quantification of M1 monocytes assessed by the positive expression of CD86 and CCR2 (B) and of M2 monocytes assessed by the positive expression of CD206, CXCR3 and CD163 (C). Quantification of M1 (D) and M2 (E) monocytes in classical, intermediate and non-classical monocyte subsets.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 2. Comparison of the presence of inflammatory factors as well as of myeloperoxidase-oxidized LDLs and their oxidation products, in hemodialyzed patients and in controls.

(A) Quantification of the concentration of M-CSF (pg/ml), IL-8 (pg/ml) and CRP (mg/L) in the plasma of HD patients (n = 27) and healthy volunteers (n = 23). (B) Quantification of the plasma concentration of Mox-LDLs (ratio of Mox-LDLs/Apo-B), Apo-B (g/l), Apo-AI (g/l) and chloro-tyrosine (ratio of chloro-tyrosine/tyrosine) in HD patients and in healthy subjects. (C) Quantification of the plasma concentration of homocitrulline (ratio of homocitrulline/lysine).

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 3. Correlations between the percentage of M2 monocytes, plasma inflammatory and oxidative stress biomarkers, in hemodialyzed patients and in controls.

Correlation between the percentage of circulating M2 monocytes and the plasma concentration of M-CSF (A), and between the percentage of circulating M2 monocytes and the plasma concentration of Cl-Tyr/Tyr (B), in HD patients (n = 27) and in healthy subjects (n = 23).

Figure 1

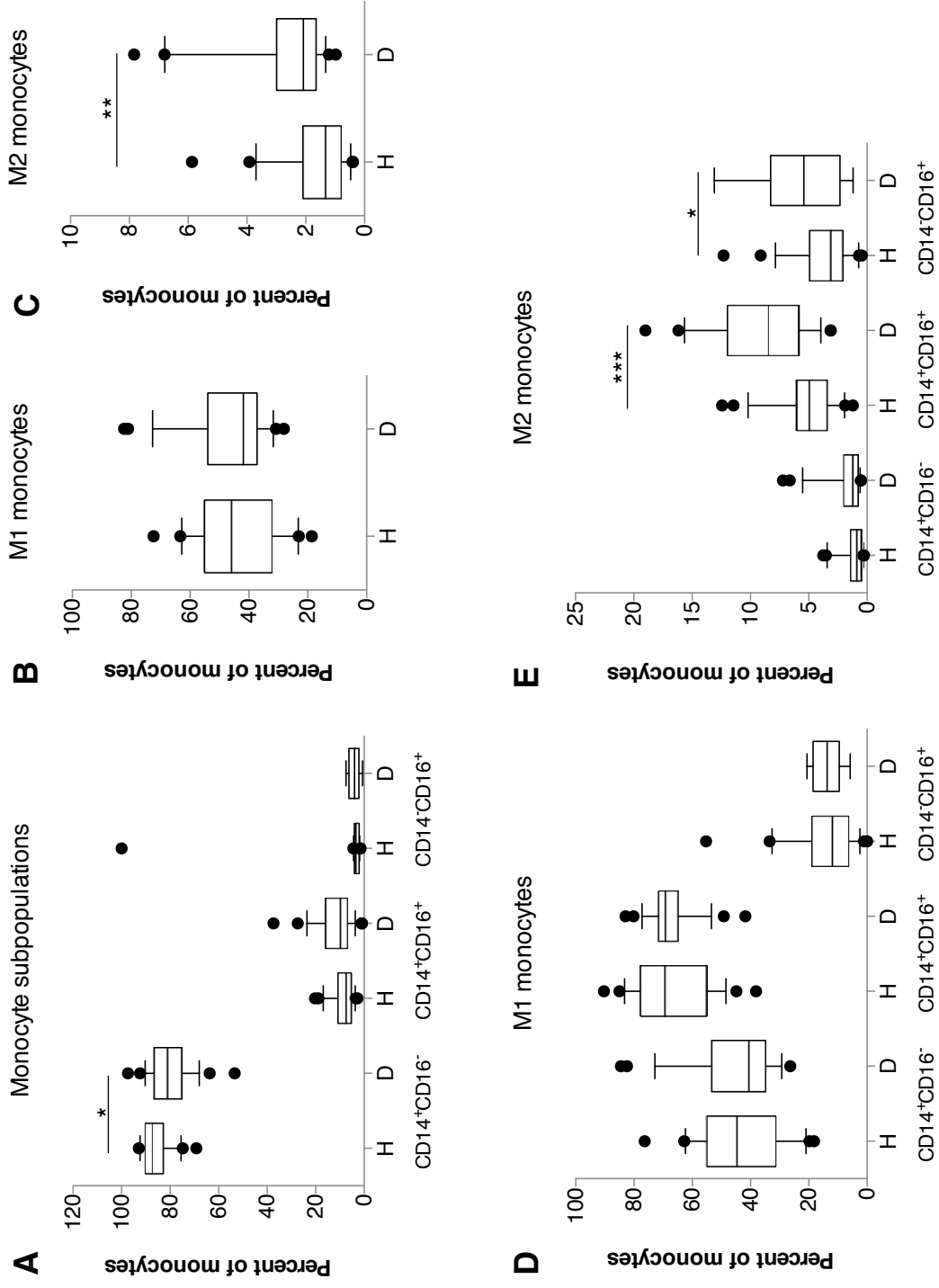


Figure 2

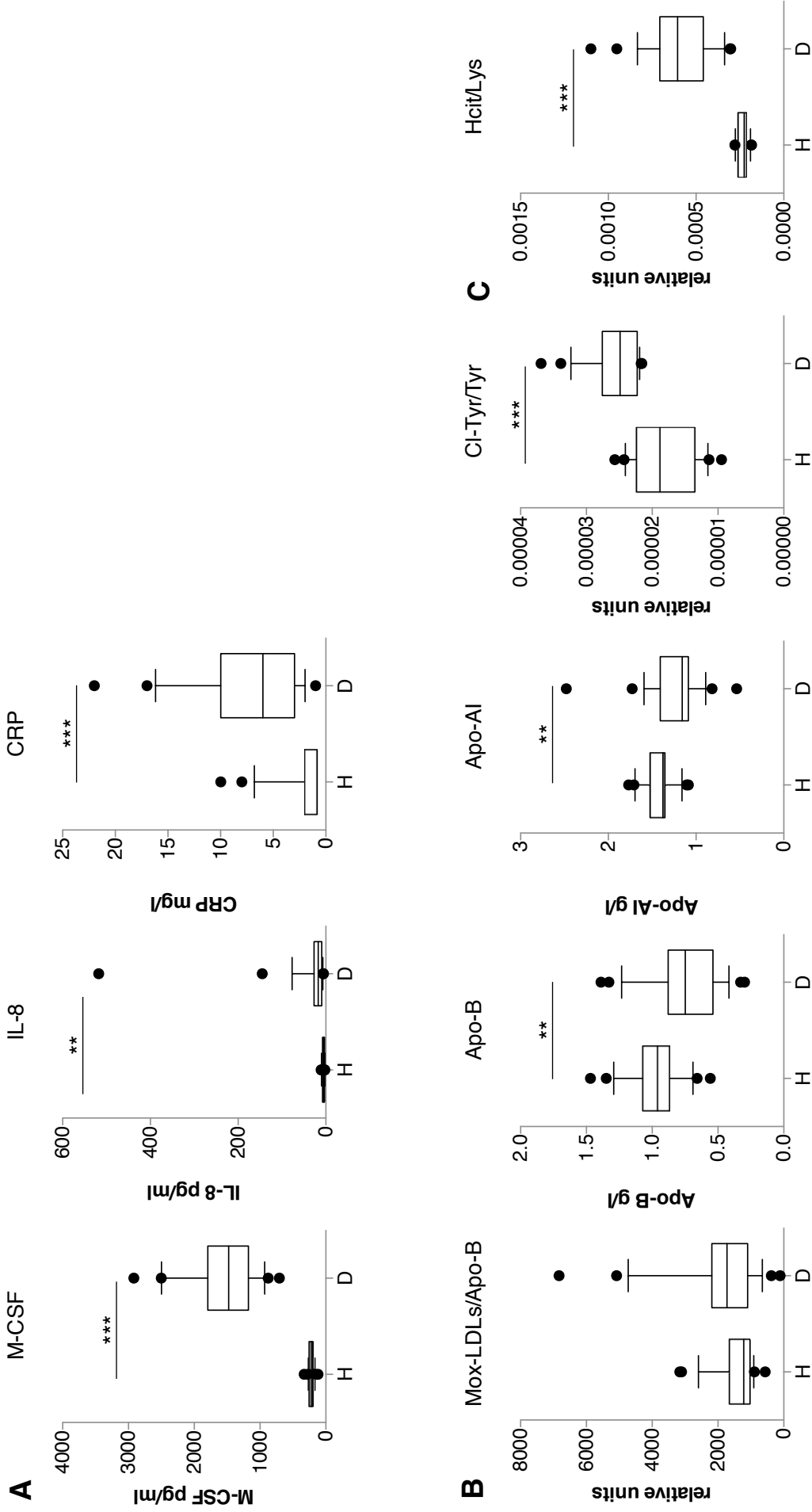
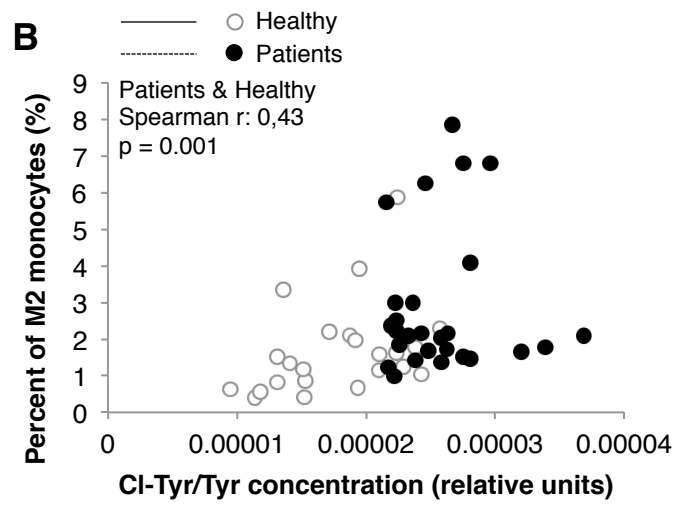
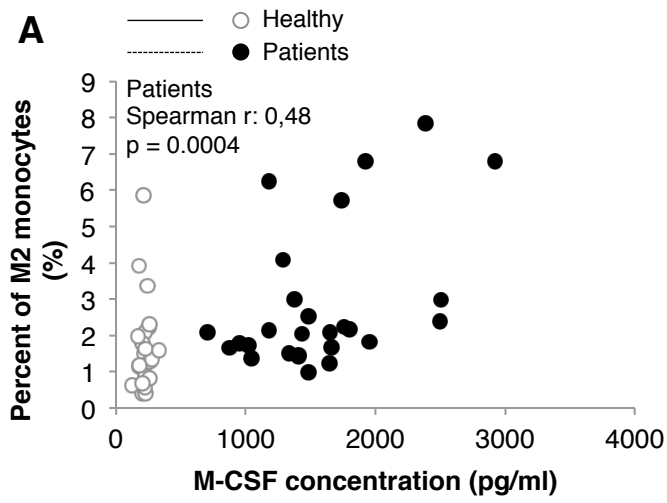


Figure 3



Supplementary data

Patient Number	Gender	Age (y)	HD Time/week	Dialyzer	Access	Smoking Status	Diabetes
P1	M	83	12h	HF22	Hemocath	No	Yes
P2	M	64	10h30	HF22	Hemocath	Yes	Yes
P3	M	64	10h30	FX80	Hemocath	Yes	No
P4	M	29	12h	HF22	Hemocath	No	No
P5	M	88	9h	EVO	Hemocath	No	No
P6	F	88	9h	FX80	FAV	No	No
P7	F	68	9h	HF17	Hemocath	No	No
P8	F	88	10h30	Nephral 500	Hemocath	No	Yes
P9	M	61	12h	FX80	Hemocath	Yes	Yes
P10	M	62	12h	HF22	FAV	No	No
P11	M	59	12h	Nephral 500	Hemocath	Yes	Yes
P12	F	81	12h	HF17	Hemocath	No	No
P13	F	94	9h	HF17	Hemocath	No	Yes
P14	F	87	6h	HF22	Hemocath	No	No
P15	M	50	12h	HF22	Hemocath	No	No
P16	M	74	10h30	HF22	FAV	No	No
P17	M	59	16h	HF22	Hemocath	Yes	Yes
P18	F	77	9h	HF22	Hemocath	No	Yes
P19	M	71	9h	EVO	Hemocath	No	No
P20	F	70	12h	HF22	Hemocath	No	Yes
P21	M	79	10h30	HF22	FAV	No	No
P22	M	63	10h30	HF22	FAV	No	No
P23	F	88	12h	Nephral 500	Hemocath	No	Yes
P24	M	69	12h	HF22	Hemocath	No	Yes
P25	M	80	10h30	HF17	Hemocath	No	No
P26	M	72	12h	Nephral 500	Hemocath	No	Yes
P27	F	71	12h	FX80	Hemocath	No	No

Table S1. Summary of patient data.

HF22 (polyphenylene): high flux; FX80 (polysulfone): high flux; Nephral 500 (AN69ST):

high flux; Hemocath: long-term tunneled catheter; FAV: arterio-venous graft.

Discussion et
perspectives de recherche

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

L'athérosclérose est une maladie vasculaire inflammatoire chronique, constituant la cause principale du développement de maladies cardiovasculaires. Elle est notamment caractérisée par un dysfonctionnement de l'endothélium et par une accumulation de macrophages et de lipoprotéines de faible densité, les LDLs, dans l'intima d'artères de gros ou moyen calibres, entraînant une diminution de l'élasticité et un épaississement des zones artérielles touchées (Lusis, 2000; Tabas et al., 2015). Cette maladie reste un problème majeur de santé publique puisque les maladies cardiovasculaires associées sont responsables d'un tiers des décès annuels à travers le monde (OMS; www.who.int/nmh/publications/).

Deux facteurs clés impliqués dans le développement de l'athérosclérose ont été étudiés au cours de cette thèse, à savoir les **LDLs oxydées** et les **macrophages** qui renforcent la **composante inflammatoire** de la maladie.

Depuis de nombreuses années maintenant, le concept de **polarisation** des macrophages a été introduit et développé (Bouhlef et al., 2007; Kadl et al., 2010; Khallou-Laschet et al., 2010; Leitinger and Schulman, 2013). En effet, en fonction de son microenvironnement, le macrophage acquiert un phénotype particulier, associé à l'expression de certains gènes dits « marqueurs de polarisation ». Les différents phénotypes acquis par les macrophages, en fonction des stimuli, appartiennent à un continuum de polarisation, dont font partie les macrophages M1, pro-inflammatoires, et les macrophages M2, anti-inflammatoires. L'importance de la polarisation des macrophages dans le contexte de l'athérosclérose n'est pas encore bien définie. De même, les facteurs du microenvironnement tissulaire influençant la polarisation ne sont pas encore, à l'heure actuelle, bien identifiés (Leitinger and Schulman, 2013; Marathe et al., 2006; van Tits et al., 2011; Wolfs et al., 2011).

Pour rappel, des études ont, par exemple, montré chez la souris que le phénotype des macrophages passe de M2 à M1 lorsque l'athérome évolue vers un stade avancé (Khallou-Laschet et al., 2010). A l'inverse, dans un modèle murin de régression des lésions athérosclérotiques, le phénotype passe de M1 à M2 lorsque la lésion régresse (Feig et al., 2011a). Rappelons cependant que dans ce modèle, c'est la composition des lésions qui change, et non leur taille qui reste non modifiée. Chez l'homme, les macrophages M2 ont principalement été détectés au niveau de l'adventice, tandis que les macrophages M1 le sont plutôt dans les régions périphériques des lésions, plus enclines à se rompre (Stoger et al., 2012). Cho et al. (2013) constatent également que les macrophages M1 sont plus abondants au niveau des plaques instables, chez des patients symptomatiques ((Cho et al., 2013), pour une revue, voir (Liberale et al., 2017)). La question de savoir si les macrophages subissent progressivement un changement de phénotype en fonction d'une modification de la composition de leur microenvironnement ou bien s'ils sont remplacés par des macrophages d'un autre phénotype n'est pas encore tranchée (voir 2.2.1 Comportement dynamique des macrophages M1 et M2 dans les plaques *in vivo*). Enfin, si les marqueurs de polarisation des cellules M1 et M2 sont bien connus, il en va nettement moins de leurs fonctions, que ce soit dans un contexte pathologique ou non.

LES LDLS OXYDEES INFLUENCENT-ELLES LA POLARISATION DES MACROPHAGES ? ET SI OUI, QUEL TYPE DE LDLS OXYDEES ?

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux phénotypes M1 (pro-inflammatoire) et M2 (anti-inflammatoire), ainsi qu'au phénotype Mox (macrophages positifs pour des marqueurs antioxydants, mais négatifs pour les marqueurs M1 et M2). Plusieurs modèles *in vitro* de polarisation de macrophages ont déjà été développés utilisant des macrophages d'origines diverses tels que des BMDMs provenant de souris C57BL/6 ou *ApoE*^{-/-}, des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6, des monocytes circulants humains différenciés en macrophages en présence de M-CSF, des macrophages dérivés de cellules THP-1 ou de cellules souches pluripotentes induites (Genin et al., 2015; Hirose et al., 2011; Khallou-Laschet et al., 2010; Lopez-Castejon et al., 2010; Martinez et al., 2006; Pelegrin et al., 2008; Spiller et al., 2015). Néanmoins, nous avons décidé de travailler avec les cellules de la lignée **RAW 264.7**, capables de se convertir en cellules spumeuses en présence de LDLs modifiées et faciles à cultiver. De plus, une fois les protocoles de polarisation établis et après vérification des résultats, obtenus à partir des macrophages RAW 264.7, avec des BMDMs, nous pouvons proposer que ces cellules représentent une bonne alternative à l'utilisation de cellules primaires murines (Calay et al., 2010).

Ces cellules constituent cependant une lignée immortalisée, obtenue à partir d'une tumeur murine induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson. C'est pour cette raison que la plupart des résultats obtenus sur les cellules RAW 264.7 ont été confirmés avec les BMDMs. Les macrophages RAW 264.7 constituent donc un modèle robuste dans le contexte de l'athérosclérose. De plus, le modèle murin des cellules RAW 264.7, permet d'utiliser les mêmes outils moléculaires (amorces, anticorps, ligands,...) dans les modèles murins *in vivo*.

Après avoir mis au point un protocole de polarisation M1, M2 et Mox dans la lignée RAW 264.7 et choisi plusieurs marqueurs de polarisation M1 (*iNOS*, *Il-6*, *Tnfa*, *Arg2* et *IL-12*), M2 (*Arg1*, *Mrc1*, *IL-10*, *Mgl2* et *Ym1*) et Mox (*Ho-1* et *Srxn1*), nous avons étudié l'effet des LDLs oxydées sur l'état de polarisation des macrophages. En effet, il est maintenant accepté depuis plusieurs années qu'une concentration élevée de LDLs plasmatiques, ainsi que la production de LDLs oxydées représentent des facteurs clés dans l'initiation et l'évolution des lésions athéroscléreuses. De plus, il est possible que l'accumulation des LDLs oxydées dans les lésions contribue à des modifications dans le microenvironnement des macrophages, induisant ainsi un changement de leur phénotype et donc de leurs fonctions.

Au cours de ce travail, deux techniques d'oxydation ont été choisies. La première utilise le sulfate de cuivre (**CuSO₄**) : il s'agit d'une méthode classique d'oxydation décrite depuis plusieurs décennies. Les LDLs sont modifiées d'abord au niveau de la partie lipidique, avec production de peroxydes lipidiques. Les modifications au niveau des acides gras, induisent la production de dérivés aldéhydes et carboxyliques (ex. : HNE, MDA), pouvant ensuite se lier aux groupements thiols et amines libres de la partie protéique des LDLs et ainsi la modifier. Cependant, cette oxydation est peu physiologique puisque les concentrations en CuSO₄ utilisées sont 300 à 3000 fois supérieures à celles détectées *in vivo* (voir 2.1.4.1.2 Le sulfate de cuivre (CuSO₄)) (Heinecke et al., 1984; Ziouzenkova et al., 1998).

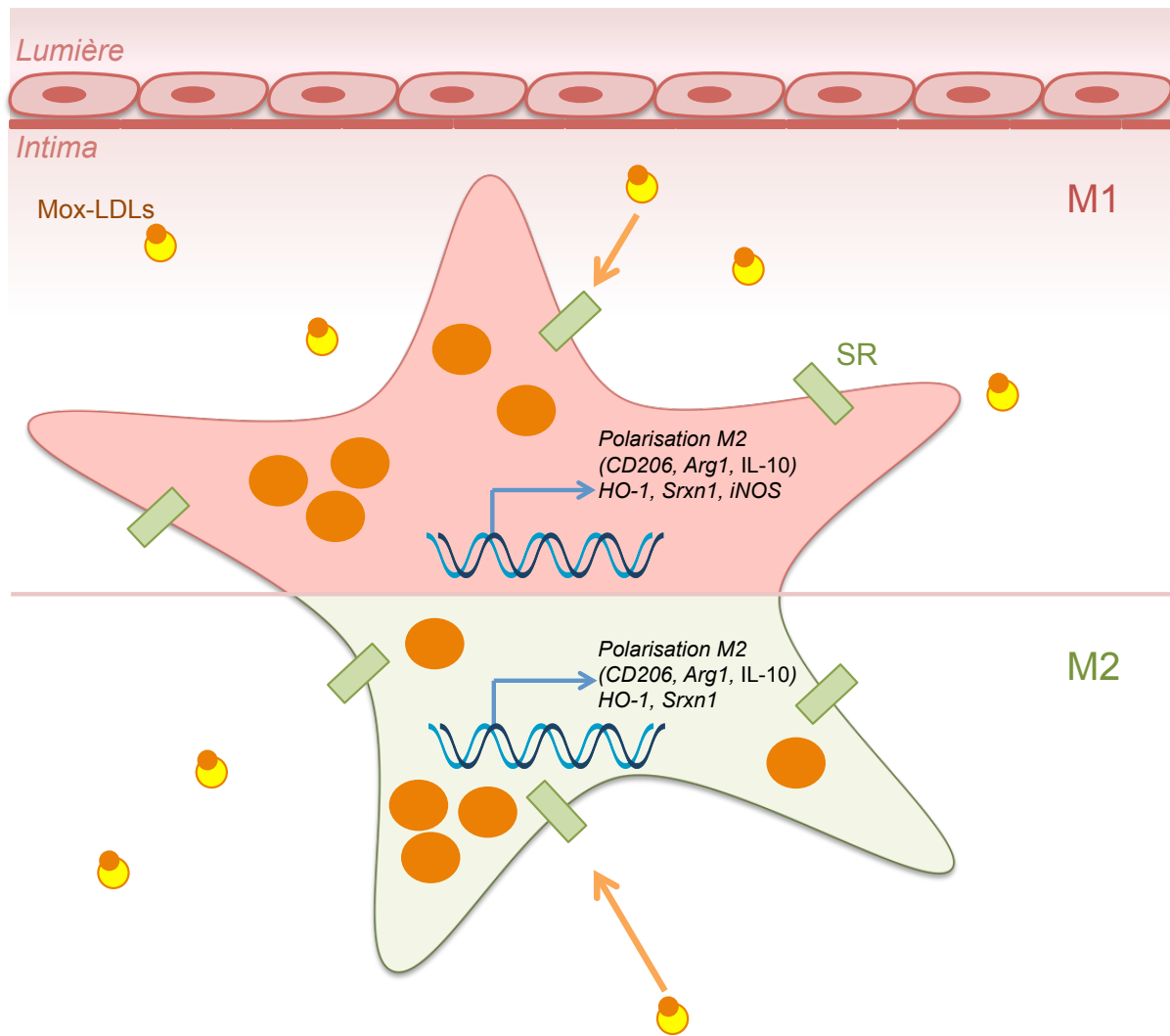


Figure 4.1. Schéma récapitulatif des résultats de la partie 1.

Nos résultats montrent que les Mox-LDLs, reconnues par des récepteurs « scavenger » (SR) non identifiés, favorisent une polarisation M2 dans les macrophages M1, et la renforcent dans les macrophages M2. Elles induisent également l'expression de gènes antioxydants. Ces LDLs modifiées sont, de plus, les plus internalisées par les macrophages.

Nous nous sommes donc également tournés vers un autre système d'oxydation, la **myéloperoxydase**, une enzyme cationique oxydant principalement l'APOB100 des LDLs, via la génération de plusieurs espèces réactives (ex. : HOCl, RNH₂Cl), avec très peu de peroxydes lipidiques produits (voir 2.1.4.2.4.4 Rôle de la MPO dans l'athérosclérose) (Rosen et al., 2009). Cette enzyme, ainsi que ses produits d'oxydation comme la chlorotyrosine, ont effectivement été détectés au sein de lésions athéroscléreuses humaines (Daugherty et al., 1994; Hazen and Heinecke, 1997; Moguilevsky et al., 2004). De plus, il a été montré que des concentrations élevées en MPO circulante et leucocytaire sont associées à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires (Duzguncinar et al., 2008).

Ce travail s'est inscrit dans la continuité de la thèse de D. Calay qui a notamment montré que les LDLs oxydées avec la myéloperoxydase (Mox-LDLs) et celles oxydées avec le sulfate de cuivre (Ox-LDLs), activent des voies de signalisation différentes, avec un stress oxydatif plus intense en présence des Mox-LDLs, ce qui explique que la réponse antioxydante *Nrf2* dépendante soit plus marquée avec ces dernières. Les Mox-LDLs sont internalisées par les macrophages non polarisés de façon également plus importante (Calay et al., 2010).

Puisque les macrophages non polarisés répondent différemment aux Ox- et Mox-LDLs, nous avons émis l'hypothèse que ces LDLs oxydées pouvaient aussi moduler de manière différente la polarisation des macrophages. A notre connaissance, il n'y a pas, dans la littérature, d'études comparant l'effet d'une oxydation des LDLs au cuivre et l'effet de celle avec la MPO, sur la polarisation des macrophages. En effet, seul l'effet des Ox-LDLs a été étudié dans le cadre d'études sur la polarisation alors que ces LDLs oxydées sont peu représentatives de la situation *in vivo* (Hirose et al., 2011; Isa et al., 2011; van Tits et al., 2011).

Ainsi que cela a été décrit et discuté dans l'article « Myeloperoxidase-oxidized LDLs enhance an anti-inflammatory M2 and antioxidant phenotype in murine macrophages » (2016), **les LDLs oxydées de manière plus physiologique, avec la myéloperoxydase, interfèrent de manière plus importante avec la polarisation des macrophages, en induisant préférentiellement un phénotype M2, anti-inflammatoire, et un phénotype antioxydant, mais aussi en étant les plus rapidement internalisées par les macrophages** (Fig. 4.1).

Ces résultats permettent de proposer l'hypothèse que l'induction d'une polarisation M2 dans les macrophages, par les Mox-LDLs, permettrait *in vivo*, en tous les cas dans un premier temps, de diminuer le cholestérol plasmatique, mais aussi de réduire le stress oxydatif et l'inflammation. Rappelons que, dans le modèle *ApoE*^{-/-}, Khallou-Laschet et al. observent une majorité de macrophages M2 dans les lésions précoces (Khallou-Laschet et al., 2010).

Nos résultats montrent donc que les macrophages M1 et M2 ne perçoivent pas les LDLs oxydées de la même façon. Les Mox-LDLs sont reconnues comme des DAMPs différents des Ox-LDLs par les macrophages. Nous avons montré qu'elles modulent différemment la polarisation des macrophages, en favorisant une polarisation M2. Ces résultats peuvent peut-être être mis en lien avec ceux de Marengo et al., qui ont montré que les oxystérols, et plus précisément le 27-hydroxycholestérol, induisent une polarisation M2 dans des macrophages humains (Marengo et al., 2016). Pour rappel, les oxystérols sont

des produits de l'oxydation des LDLs. Mais d'après la littérature, les profils d'oxystérols (ex. : oxystérols tels que le 15-cétocholestérol, le 27-hydroxycholestérol ou les chlorohydrines de cholestérol, mais aussi différentes formes d'oxystérols avec une oxydation au niveau du cholestérol ou au niveau de la chaîne d'acides gras) dans les Ox-LDLs et les Mox-LDLs ne sont pas les mêmes, les chlorohydrines de cholestérol étant caractéristiques des Mox-LDLs (Schroepfer, 2000). Malheureusement les données sur ces chlorohydrines de cholestérol dans la littérature sont beaucoup moins abondantes que celles sur les hydroxy- et céto-stérols présents dans les Ox-LDLs (pour une revue, voir (Schroepfer, 2000)).

Une autre limitation de cette étude est que nous avons décidé de stimuler des macrophages polarisés ou non, avec des LDLs oxydées ou non, pendant 24 heures et à une concentration de 100 µg/ml. Une stimulation pendant 24 heures est courte et à l'avenir, il serait intéressant d'étudier l'impact d'une stimulation avec des LDLs sur la polarisation de macrophages, pendant des temps plus longs puisqu'*in vivo* les cellules sont soumises à ce stress athérogène de façon continue. Les concentrations utilisées devraient pour ces temps plus longs être diminuées, afin de mimer au mieux la situation pathologique *in vivo*. De plus, bien que le rapport entre le cholestérol et le cholestérol estérifié ait été mesuré au sein des cellules après l'internalisation, cette mesure n'a pas été réalisée au sein des LDLs natives et oxydées.

Enfin, si les biomarqueurs des macrophages polarisés M1 et M2 sont bien décrits, il faudrait poursuivre ce travail par une analyse plus approfondie de leurs fonctionnalités respectives, en s'intéressant non seulement à l'internalisation des gouttelettes lipidiques, à la capacité de phagocytose de bactéries mais aussi de cellules en apoptose (ou efférocytose sur laquelle nous reviendrons plus tard dans cette discussion), des macrophages M1 et M2, en présence ou non de LDLs, natives ou modifiées.

Les macrophages M1 et M2 semblent en effet avoir des capacités différentes de **phagocytose**. Il serait donc pertinent de poursuivre les expériences sur la phagocytose et de déterminer non seulement comment les LDLs oxydées peuvent moduler ce processus mais aussi comment les macrophages polarisés assurent cette fonction importante de défense de l'hôte et de maintien de l'homéostasie tissulaire, en évaluant par exemple leur sensibilité par rapport aux PAMPs/DAMPs. L'identification des récepteurs « scavenger » impliqués se révèle donc cruciale pour notamment comprendre comment les Ox-LDLs ou les Mox-LDLs sont internalisées et ainsi identifier les voies de signalisation activées par ces lipoprotéines.

Dans la lésion, les LDLs oxydées, et plus particulièrement l'APOB100 modifiée, sont en effet reconnues par les macrophages au moyen des **récepteurs « scavenger »** (ex. : CD36, LOX-1) (voir 2.1.5.2 Récepteurs « scavenger »). L'expression de ces récepteurs n'est pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, ce qui entraîne l'internalisation massive des LDLs modifiées et donc la formation de cellules spumeuses (Canton et al., 2013; Libby, 2002). Au cours du mémoire de master BBMC, l'impact de la polarisation M1 et M2 sur l'expression de plusieurs récepteurs « scavenger » avait été étudié. Nous avons observé une surexpression de *FcγrIII* et *Tlr4* dans les macrophages M1 et de *Sr-bl* dans les macrophages M2, par rapport aux macrophages M0. A l'inverse, l'expression de *Lox-1*, *Abcg4* et *Sr-bl* est diminuée dans les macrophages M1 par rapport aux macrophages M0 (Annexe 6). Ces résultats semblent cohérents avec les fonctions pro-inflammatoires et de résolution attribuées aux macrophages M1 et M2

respectivement et avec les résultats décrits dans les publications étudiant l'expression de certains récepteurs « scavenger » dans les macrophages polarisés (*FcγRIII* : (Lefevre et al., 2013), *Tlr4* : (Wang et al., 2014), *Sr-bI* : (Jaguin et al., 2013)). En ce qui concerne l'expression de *Lox-1*, elle est diminuée dans les macrophages M2 par rapport aux macrophages M1 dans l'étude de van Tits et al. (van Tits et al., 2011), ce que nous n'avons pas confirmé, en raison d'une variabilité importante des résultats pour les macrophages M2 (Annexe 6). Dans cette même étude, l'expression de *Cd36* est augmentée dans les macrophages M2 (non significatif dans notre cas) (Annexe 6) (Martinez et al., 2006; van Tits et al., 2011). A notre connaissance, l'expression d'*Abcg4* n'a pas été étudiée dans les macrophages polarisés : dans nos conditions, ce récepteur est sous-exprimé dans les macrophages M1 par rapport aux macrophages M2 (Annexe 6). Enfin, nous n'observons pas de modification significative de l'expression de *Msr1* dans les macrophages polarisés. Selon l'analyse transcriptomique de Martinez et al., ce récepteur serait spécifique des macrophages M2 (Martinez et al., 2006).

Nous n'avons pas poursuivi cet axe de recherche, mais ces résultats pourraient être confirmés en augmentant le nombre de réplicats afin de réduire les écarts-types (Annexe 6). Il serait aussi intéressant d'étudier l'impact des Mox-LDLs (ou MpOx-LDLs) sur l'expression des récepteurs « scavenger » dans les macrophages polarisés.

Les macrophages M1 et M2 privilégient également des **voies métaboliques** différentes (voir par exemple (Biswas et al., 2012; Jha et al., 2015; Mills and O'Neill, 2016): les M1 présentent une respiration mitochondriale réduite, avec un cycle de Krebs perturbé et un métabolisme glycolytique exacerbé ; dans les cellules M2, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative semblent fonctionnels, avec en outre une oxydation intense des acides gras. Ces différences de métabolisme pourraient expliquer certains de nos résultats. En effet, nous avons notamment observé des différences de comportement des macrophages lors de l'internalisation des LDLs, ne serait-ce que vis-à-vis des LDLs natives. Comme montré dans l'article publié, les macrophages M1 internalisent de manière importante les LDLs oxydées, mais également les LDLs natives, ce qui suggère l'oxydation de ces dernières.

Par le passé, Parthasarathy et al. avaient déjà montré que des macrophages péritonéaux, recrutés après injection de thioglycollate, sont capables d'oxyder des LDLs natives par eux-mêmes, menant à la formation de cellules spumeuses ((Parthasarathy et al., 1986), pour une revue, voir (Jessup, 1993)). Pour rappel, les macrophages péritonéaux présentent une augmentation de leur activité phagocytaire et une augmentation de la production de ROS (Kondo et al., 1997; Zhang et al., 2008). Il a de plus été montré que dans les macrophages M1, suite à la présence de LPS et à la reprogrammation du métabolisme mitochondrial qui en résulte, il y a une production augmentée de ROS ((Infantino et al., 2011) et pour des revues voir, (Galvan-Pena and O'Neill, 2014; Mills and O'Neill, 2014; O'Neill, 2011)). Enfin plusieurs auteurs ont démontré que les ROS peuvent modifier les LDLs (Aviram et al., 1996; Heinecke et al., 1993).

Les **processus de mort cellulaire** sont également importants au niveau du cœur lipidique des lésions et il est reconnu qu'au delà d'une certaine concentration et d'un certain temps d'exposition, les lipides deviennent toxiques pour la cellule. Isa et al. (2011) ont déjà évalué l'impact des Ox-LDLs sur les macrophages humains polarisés. Selon ces auteurs, les macrophages M2 seraient plus sensibles à la lipotoxicité induite par les Ox-LDLs et donc plus enclins à l'apoptose, en comparaison aux macrophages M0 et aux monocytes. Ces auteurs émettent l'hypothèse que cette sensibilité des cellules M2,

contribuerait à leur diminution lors de la progression des lésions. Néanmoins, seules les LDLs oxydées avec du sulfate de cuivre ont été testées et ce, seulement sur des macrophages M0 et M2 (Isa et al., 2011).

Etant donné l'importance de l'apoptose des macrophages au sein des lésions athéroscléreuses, que ce soit en terme de limitation, d'initiation ou de progression de la lésion (Akishima et al., 2005; Tabas, 2009), nous avons envisagé au début de la thèse d'investiguer les processus de mort éventuellement déclenchés dans les macrophages M1 et M2 par les LDLs oxydées au cuivre ou la myéloperoxydase. La réponse inflammatoire sera en effet différente si les macrophages subissent une apoptose, une autophagie (Vlaminck et al., 2014) ou une nécrose. En effet, dans ce dernier cas, la libération de médiateurs inflammatoires induit l'extension de la plaque athéroscléreuse *in vivo*, avec un recrutement de nouvelles cellules inflammatoires (Glass and Witztum, 2001; Sanz and Fayad, 2008).

Des expériences préliminaires avaient été réalisées par une stagiaire pour aborder la question de la susceptibilité des macrophages M1 et M2, spumeux ou non, à l'apoptose, en utilisant une sonde FAM-FLICA se liant aux caspases actives (marqueurs de l'apoptose) dans les cellules vivantes, mais des problèmes techniques ne lui ont pas permis de finaliser ce travail et nous ne l'avons pas poursuivi.

Une perspective de notre travail serait donc de le poursuivre en testant l'effet des Mox-LDLs sur les capacités de résistance ou de sensibilité des cellules M0, M1 et M2 à l'apoptose et de voir si elle est dépendante d'un stress du réticulum. Il faudrait ensuite vérifier s'il existe une corrélation ou non entre les marqueurs d'apoptose et l'expression des marqueurs de polarisation M1 ou M2 au niveau des lésions athéroscléreuses murines (de préférence dans les souris DKO *Ldl-r* x *Apobec* (voir ci-dessous)) et humaines. Ces résultats permettraient aussi de déterminer si les Mox-LDLs exercent des effets modulateurs sur certaines fonctions des macrophages, différents de ceux exercés par les Ox-LDLs (Ziouzenkova et al., 1998).

L'ensemble de tous ces résultats nous permettent de suggérer que **l'internalisation des Mox-LDLs module le phénotype des macrophages vers une polarisation M2, même si elle n'est pas suffisante à elle seule pour induire une polarisation M1 ou M2 des macrophages.**

P2Y₆ JOUE-T-IL UN ROLE DANS LA POLARISATION DES MACROPHAGES PRESENTS DANS LES LESIONS ATHEROSCLEREUSES ?

Le travail entrepris *in vitro* dans la première partie de la thèse montre que les macrophages M2 ont des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes.

Outre les Mox-LDLs, nous avons donc voulu explorer une deuxième piste afin d'identifier d'autres voies de modulation de la polarisation des macrophages dans les lésions athéroscléreuses. Le rôle de récepteurs purinergiques tels que P2Y₂ dans l'athérosclérose a déjà été largement abordé (Seye et al., 2003; Stachon et al., 2016). C'est la raison pour laquelle, en collaboration avec le laboratoire de B. Robaye à l'IRIBHM (ULB, Gosselies), nous nous sommes intéressés à P2Y₆, moins étudié que d'autres récepteurs purinergiques, mais aussi parce que dans le modèle *in vivo* de souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}, l'invalidation de **P2y₆** semble jouer un rôle protecteur, réduisant le développement de lésions athéroscléreuses. Pour rappel, P2Y₆ est un récepteur

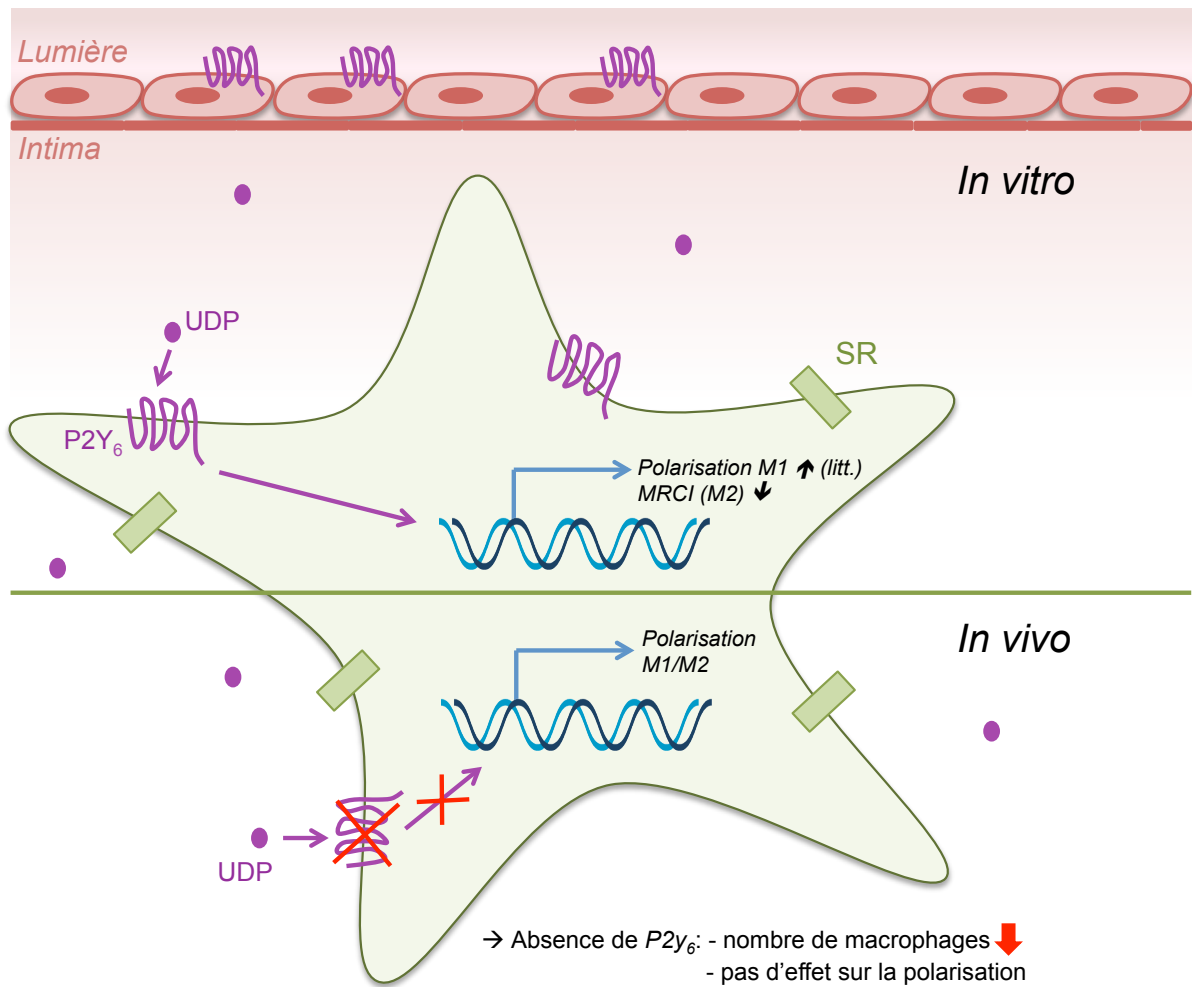


Figure 4.2. Schéma récapitulatif des résultats de la partie 2.

Nos données obtenues *in vitro* montrent que l'UDP, ligand du récepteur purinergique P2Y₆, induit une diminution de l'expression de MRC1 dans les macrophages M2. Plusieurs équipes ont également montré que l'expression de marqueurs de polarisation M1 est augmentée lorsque les macrophages sont stimulés avec de l'UDP (Cox et al., 2005, Warny et al., 2001).

Nous avons ensuite décidé d'étudier l'effet de l'absence d'expression de P2y₆ sur la polarisation des macrophages de lésions de souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}. Nous avons observé dans les lésions de taille réduite de ces souris une diminution du nombre de macrophages. Cependant, l'inactivation de P2y₆ ne semble pas avoir d'effet sur la polarisation des macrophages.

purinergique exprimé notamment par les cellules endothéliales, mais aussi les monocytes et les macrophages, ainsi que par les cellules musculaires lisses vasculaires (Bar et al., 2008; Jin et al., 1998; Riegel et al., 2011). De plus, l'expression de ce récepteur est augmentée au niveau des lésions athéroscléreuses au cours de leur développement et dans les macrophages spumeux (Guns et al., 2010), et la stimulation de monocytes ou macrophages avec de l'UDP, nucléotide extracellulaire et agoniste spécifique de P2Y₆, induit la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires ((Cox et al., 2005; Warny et al., 2001) pour une revue, voir (Jacobson et al., 2009)).

De manière similaire aux souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}, l'équipe de Zirlick a montré, dans le modèle de souris *Ldl-r*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}, nourries avec un régime hypercholestérolémiant, que l'invalidation de *P2y6* a pour effet de diminuer la taille des lésions (Stachon et al., 2014). De plus, l'invalidation de *P2y6* aurait pour effet de diminuer l'adhérence et le recrutement des leucocytes au niveau de la paroi artérielle, le nombre de macrophages au sein de la lésion, le contenu en lipides, ainsi que l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que *Il-6* et *Vcam-1* (qui jouent un rôle dans le recrutement des leucocytes), tandis qu'elle augmenterait le nombre de cellules musculaires lisses et la production de collagène. Cette invalidation favoriserait donc l'établissement de lésions plus petites et plus stables. Cette équipe a également montré que P2Y₆ influençait l'expression de molécules d'adhérence dans les cellules endothéliales et que c'est son expression dans ces cellules (ou du moins dans les cellules vasculaires résidentes), et pas dans les cellules hématopoïétiques, qui induisait le recrutement des leucocytes au niveau du site d'inflammation dans la paroi vasculaire (Stachon et al., 2014).

Des observations similaires ont été faites dans le modèle de souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-} par l'équipe de B. Robaye (résultats encore non publiés).

En nous intéressant au modèle *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-}, nous avons comme objectif de vérifier si la polarisation des macrophages dans les lésions athéroscléreuses de taille réduite de ces souris était modifiée suite à l'invalidation de *P2y6*. Ces expériences pourraient ainsi peut-être mettre en évidence le rôle de pro-résolution de l'inflammation des macrophages M2 et leur éventuel rôle anti-athérogène. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce phénotype se retrouverait en prédominance dans les lésions des souris *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-} comme observé par Khallou-Laschet chez les souris *ApoE*^{-/-}.

Nous avons commencé par une étude *in vitro*, dans laquelle nous avons montré que l'UDP, ligand de P2Y₆, semble induire un phénotype plutôt inflammatoire dans les macrophages RAW 264.7, même si les effets restent non significatifs (Fig. 4.2).

Nous avons ensuite réalisé des marquages en immunofluorescence sur coupes à congélation de cœurs et d'aortes de souris *ApoE*^{-/-} et *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-} afin d'observer ou non une modification de la polarisation des macrophages en absence de P2Y₆.

Au terme de ces expériences, nous avons montré que l'abondance des macrophages (CD68⁺) diminuait de manière significative au sein de ces lésions, ce qui est conforme au paradigme du lien athérosclérose-macrophages, mais l'absence d'expression de *P2y6* ne semblait pas affecter les proportions relatives des macrophages M1 et M2 (Fig. 4.2). Il s'agissait cependant d'une étude préliminaire, où seules des lésions précoces ont été analysées. En effet, les coupes histologiques utilisées dans ce travail ont été préparées à partir de cœurs et d'aortes de souris âgées de 35 semaines. De plus, les marquages ont été réalisés seulement au niveau de lésions de la crosse aortique. L'étude a donc été menée à un moment donné du développement des lésions et un endroit précis de l'aorte. Ces expériences pourraient donc être poursuivies sur des lésions plus avancées, ainsi

que sur des lésions situées à plusieurs endroits de l'aorte (ex. : crosse et racine aortique, segment abdominal aortique, bifurcations iliaques).

De plus, au vu de la diminution spectaculaire du nombre de macrophages dans les lésions et de la diminution de la taille de celles-ci et puisque P2Y₆ est exprimé par les cellules endothéliales et les monocytes, il serait intéressant de vérifier si P2Y₆ est impliqué dans l'extravasation des monocytes, en particulier en présence de plaquettes activées. En effet Theilmeier et al. (1999) ont montré que des plaquettes activées pouvaient former des complexes avec les monocytes dans certaines conditions de shear stress, favorisant la diapédèse des monocytes présents dans ces complexes. Boudjeltia et al. (2008) ont montré que les monocytes participant à ces complexes surexprimaient CD62L, ligand de la P-sélectine (Boudjeltia et al., 2008; Theilmeier et al., 1999).

LES MONOCYTES SONT-ILS DÉJÀ PRE-POLARISÉS DANS LA CIRCULATION ? - CAS DES PATIENTS HEMODIALYSÉS

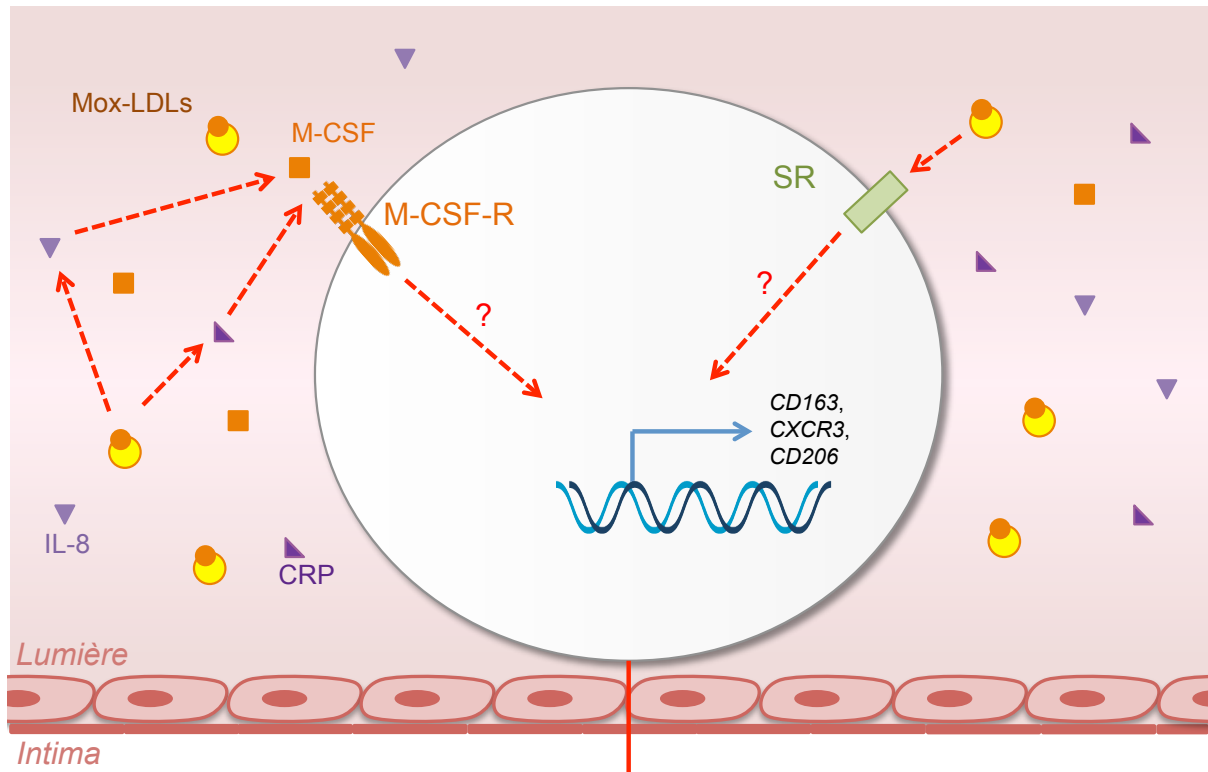
Si la polarisation des macrophages a déjà fait l'objet de nombreuses publications dans le contexte de l'athérosclérose, mais aussi d'autres maladies chroniques, on commence aussi à étudier la polarisation des monocytes dans la circulation (Fadini et al., 2013a; Fadini et al., 2013b; Fadini et al., 2014).

Nous nous sommes intéressés aux patients dialysés, car ceux-ci se caractérisent par un profil inflammatoire et de stress oxydatif très dépendant de la myéloperoxydase. En effet, Delporte et al. (2012) ont démontré que l'activité de la myéloperoxydase dans le plasma augmente rapidement après l'initiation de la dialyse. Ces patients présentent également une activité MPO dans le plasma qui est systématiquement plus élevée que chez des donneurs sains, ce qui a tendance à augmenter leur concentration plasmatique de Mox-LDLs (Delporte et al., 2012). De plus, les patients hémodialysés développent de l'athérosclérose plus rapidement que des individus sains (voir Introduction, point 2.1.1 Contexte général, définition et facteurs de risques). Les maladies cardiovasculaires représentent la cause principale de décès chez ces patients, avec une mortalité environ 10 à 30 fois supérieure par rapport à des individus sains (Harmankaya et al., 2015; Sarnak et al., 2003; Vazquez et al., 2014).

Nous avons donc voulu déterminer, chez les patients hémodialysés, si les **monocytes** étaient déjà polarisés dans la circulation sanguine, et si c'était le cas, déterminer si leur **polarisation** était différente de celle d'individus sains.

Au terme de notre étude, nous avons observé que le pourcentage de monocytes circulants M2 augmente chez les patients hémodialysés par rapport à des personnes saines, ce qui est en corrélation avec l'augmentation des concentrations plasmatiques en M-CSF et en chloro-tyrosine, produit de l'oxydation des LDLs par la myéloperoxydase.

Sur base des résultats obtenus, nous avons émis l'hypothèse que **le stress oxydatif et l'inflammation, amplifiés chez les patients hémodialysés, induisent une augmentation de la concentration en M-CSF, facteur de croissance et de différenciation qui pourrait être responsable de la polarisation M2 des monocytes** (Fig. 4.3) (voir l'article en préparation « M2 monocyte polarization in dialyzed patients is associated with increased levels of M-CSF and myeloperoxidase-associated oxidative stress »).



Anti-athérogène
Anti-oxydant



Pro-athérogène

Figure 4.3. Schéma récapitulatif des résultats de la partie 3.

Au terme de notre étude préliminaire chez des patients hémodialysés, caractérisés par un profil inflammatoire et de stress oxydatif très dépendant de la myéloperoxydase, nous avons observé que le pourcentage de monocytes M2 augmente chez ces patients, par rapport à des individus sains. Cette augmentation est en corrélation avec l'augmentation des concentrations plasmatiques en M-CSF et en chloro-tyrosine, un des produits de l'oxydation des LDLs par la myéloperoxydase.

Nous avons donc émis l'hypothèse, à vérifier, que le stress oxydatif et l'inflammation (augmentation de la concentration en IL-8 et CRP), amplifiés chez ces patients, pourraient induire une augmentation de la concentration en M-CSF, qui lui-même serait responsable de la polarisation M2. Sur base de nos résultats publiés dans « Mediators of Inflammation », nous émettons l'hypothèse qu'il serait possible que l'augmentation de la concentration plasmatique en Mox-LDLs, et en chloro-tyrosine, observée chez ces patients, pourrait modifier la polarisation de ces monocytes.

L'augmentation du pourcentage de monocytes M2 chez les patients hémodialysés, présentant un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires, peut avoir deux explications. Soit les monocytes M2 ont un rôle pro-athérogène et favorisent le développement des lésions. Soit les monocytes M2 jouent un rôle de défense, vu leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-athérogènes, leur augmentation limitant ainsi le développement des lésions. Nous pencherions plutôt pour cette deuxième hypothèse, au vu des résultats obtenus notamment par Sharma et al. avec les souris *ApoE*^{-/-} déficientes pour *Klf4* (Sharma et al., 2012).

Signalons qu'il serait également intéressant de vérifier dans quelle mesure la réponse *Nrf2* est impactée dans les monocytes de ces patients, au vu des résultats obtenus (réponse *Nrf2* diminuée) par les études de Mozzini et al. et Suzuki et al. chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques (Mozzini et al., 2014, Suzuki et al., 2008).

Plusieurs équipes ont déjà montré *in vitro* que les LDLs oxydées sont capables d'induire une polarisation des monocytes (voir Introduction 2.2.2 LDLs et polarisation des macrophages) (Han 2000, Fuhrman 2008, Bekkering 2014). Nos résultats publiés dans « Mediators of Inflammation » ont mis en évidence que les Mox-LDLs favorisaient une polarisation M2 dans les macrophages murins RAW 264.7 et dans les BMDMs (Pireaux et al., 2016). L'augmentation de la concentration plasmatique des Mox-LDLs et de la chlorotyrosine pourrait donc également modifier la polarisation des monocytes vers un phénotype M2.

En ce qui concerne le pourcentage de monocytes M1, nous n'avons pas observé de modifications entre les patients dialysés et les volontaires sains. Il est donc possible que cette population reste stable. On ne peut cependant pas exclure une différence de recrutement entre monocytes M1 et M2 au niveau de la paroi vasculaire, avec l'hypothèse que les macrophages M2 seraient moins bien recrutés chez les patients dialysés. Pour étayer cette hypothèse, nous pourrions purifier les monocytes M1 et M2 à partir du sang de donneurs sains et de patients dialysés et tester leur capacité de transmigration *in vitro*. Fadini et al. ont observé *in vitro* que les monocytes M1 montraient une capacité supérieure de transmigration par rapport aux monocytes M2. Cependant, ces résultats ont été obtenus à partir de monocytes de patients diabétiques, chez lesquels il a été montré que la population de monocytes M1 circulants augmente (Fadini et al., 2013b).

Sachant que les patients hémodialysés présentent un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires, associé à un développement accéléré de l'athérosclérose, l'augmentation du pourcentage de monocytes M2 peut avoir deux explications (Fig. 4.3). Soit, cette population de monocytes M2 augmente et favoriserait à long terme le développement des lésions et de la pathologie rénale. Elle doit donc être considérée comme pro-athérogène. Soit le pourcentage de monocytes M2 augmente en tant que mécanisme de défense, pour limiter la progression des lésions athéroscléreuses et la progression de la pathologie rénale. En absence de ce mécanisme de défense, les lésions évolueraient encore plus rapidement et de façon plus sévère chez ces patients. Fadini et al. ont notamment montré que les monocytes M2 auraient une capacité de phagocytose distincte des monocytes M1. Dans le cadre de cette étude, ils internaliseraient plus de LDLs acétylées *in vitro*, ce qui serait lié à une augmentation de l'expression de récepteurs « scavenger » au niveau des monocytes M2 (Fadini et al., 2013b).

Le rôle de la polarisation M2 dans le contexte de la pathologie rénale et de l'athérosclérose a été discuté dans l'article. Sur base des données de la littérature, nous pouvons dire que le rôle des macrophages M2 n'est pas encore complètement compris puisqu'ils sont considérés à la fois comme acteurs dans la progression de la maladie rénale, mais aussi dans la limitation de l'inflammation (Han et al., 2013; Lu et al., 2013; Olmes et al., 2016). De même, les monocytes-macrophages M2 peuvent être à la fois considérés comme pro-athérogènes et anti-athérogènes. Les macrophages M2 joueraient en effet un rôle dans la limitation du développement de l'athérosclérose via leur action anti-inflammatoire et dans l'efférocytose. Cependant, il a été montré *in vitro* que les macrophages M2 dépendants de l'IL-4 joueraient également un rôle dans la progression de l'athérosclérose, ce qui pourrait expliquer en partie l'augmentation du pourcentage de monocytes M2 et le phénomène d'athérosclérose accélérée observés chez les patients hémodialysés.

Par contre, les expériences d'inactivation de *Klf4* en souris sont clairement en faveur d'un rôle protecteur des macrophages M2, *in vitro* et *in vivo* (Sharma et al, 2012 ; Liao et al, 2017), puisque cette inactivation favorise un phénotype inflammatoire des macrophages et favorise l'inflammation vasculaire ainsi que la progression des lésions athéroscléreuses dans le modèle des souris *ApoE*^{-/-}.

Ces données nous semblent convaincantes. Le rôle protecteur des monocytes M2 pourrait être vérifié en suivant des cohortes de patients dialysés d'âge similaire (ex. : 45-50 ans), en nombre suffisant et de manière régulière pendant plusieurs années (sur 10-15 ans). Cette étude permettrait tout d'abord de confirmer nos données préliminaires sur la polarisation M2 des monocytes. En effet, notre analyse a été réalisée sur un groupe limité et hétérogène de patients hémodialysés, avec une seule mesure par patient. La polarisation des monocytes a été évaluée une seule fois à un moment donné (avant l'initiation de la dialyse). Dans l'étude que nous proposons, il faudrait suivre les patients de manière régulière, pendant plusieurs années, et voir si les patients présentant les taux les plus élevés en monocytes M2, sont oui ou non moins à risque de complications cardiovasculaires.

En cas de réponse positive, nous pourrions considérer que la polarisation M2 est protectrice.

Par contre, il est temps de dépasser le simple phénotypage des monocytes-macrophages via des biomarqueurs et d'arriver à une **nouvelle classification des macrophages tenant compte de leurs fonctions**.

En effet, nous nous sommes basés sur la classification M1/M2, établie *in vitro*, qui ne représente que de manière très simplifiée le microenvironnement des monocytes et des macrophages *in vivo*. De plus, se baser uniquement sur l'identification des stimuli d'activation et sur l'expression de gènes marqueurs est simplificateur comme le montre une étude utilisant la cytokine IL-10 comme marqueur de polarisation M2. En effet, une stimulation *in vitro* de macrophages M2, avec du LPS, induit une surexpression de CD86 et MHC-II, des marqueurs M1, mais induit aussi une augmentation de l'expression de l'IL-10 ((Parsa et al., 2012), pour des revues, voir (Harris, 2014) et (Roszer, 2015)).

Les macrophages M2 sont de plus une population de macrophages très hétérogène. Les macrophages M2 sont classés en plusieurs sous-types : M2a, M2b et M2c, avec les macrophages M2b, par exemple, sur-exprimant des gènes M2 mais aussi M1. Nous pensons donc que les macrophages doivent être classés non seulement **sur base de l'expression de marqueurs de polarisation**, mais aussi **sur base de leurs fonctions** précises.

L'ATHEROSCLEROSE, UNE MALADIE INFLAMMATOIRE QUI NE SE RESOUD PAS ?

La réponse inflammatoire, pour être adéquate, doit à un moment donné se restreindre dans l'espace et le temps : c'est la phase de résolution, tout aussi critique et trop souvent négligée.

Les macrophages M2 sont des acteurs clefs de cette phase et on admet généralement que leur présence dans les lésions athéroscléreuses serait plutôt favorable, même si la question reste débattue pour les lésions chez l'homme (pour une revue récente, voir (Liberale et al., 2017)).

Chez la souris, il semble que les cellules M2 soient bien présentes dans les lésions précoces, mais qu'elles deviennent minoritaires dans les lésions avancées (Khallou-Laschet et al., 2010).

Rappelons que Sharma et al. observent chez des souris *ApoE*^{-/-} déficientes en *Klf4* une exacerbation de l'inflammation et des lésions athéroscléreuses (Sharma et al., 2012). Ces résultats sont plutôt en faveur d'un rôle favorable des macrophages M2, même s'il faut encore le confirmer chez l'homme, chez qui l'échelle de temps pour le développement des lésions s'exprime en dizaines d'années et non pas en mois comme chez la souris *ApoE*^{-/-}.

Tout d'abord, il semble donc important de valider ces données sur un modèle plus représentatif de la situation chez l'homme telles les souris DKO *Ldl-r* x *Apobec*. Ces souris nourries avec un régime normal, développent spontanément des athéromes et ont des profils lipoprotéiniques très proches des profils humains, avec une concentration élevée en LDLs, due à la production hépatique d'APOB100 principalement, à la place de l'APOB48 (Powell-Braxton et al., 1998). Les souris *ApoE* KO sont, elles, caractérisées par une augmentation importante de VLDLs plasmatiques, avec peu de LDLs (Marschang and Herz, 2003; Plump et al., 1992; Powell-Braxton et al., 1998). Les souris *Ldl-r*^{-/-} x *Apobec*^{-/-} présentent, de plus, une différence dans l'évolution de la maladie entre les souris mâles et femelles, comme chez l'homme (Powell-Braxton et al., 1998). Pour ces raisons, ce modèle murin semble le plus proche de la situation humaine par rapport aux modèles KO pour *ApoE* ou *Ldl-r* (voir 3.2.1.1 Souris *Ldl-r*^{-/-} x *Apobec*^{-/-}) et il nous semble donc particulièrement approprié pour étudier comment la polarisation des macrophages évolue au cours la progression des lésions athéroscléreuses dans ce modèle.

Un croisement entre ces souris DKO et des souris transgéniques surexprimant la myéloperoxydase humaine (Tg *hMPO*) serait aussi très informatif pour mieux comprendre l'effet des LDLs modifiées par la myéloperoxydase sur la polarisation des macrophages dans les lésions de ces souris.

En utilisant ces derniers modèles, nous pourrions donc envisager une analyse immunohistologique de la racine aortique, de la crosse aortique et du segment postérieur de l'aorte, au niveau de lésions précoces, intermédiaires et avancées, et réaliser des marquages permettant de caractériser l'abondance (CD68) et le phénotype des macrophages au niveau des lésions (iNOS, ARG2, IRF5 pour les M1 ; MRC1, ARG1, STAT6, PPAR γ pour les M2 ; HO-1, SRXN1 et NRF2 pour les « Mox »). Le phénotypage pourrait être complété par une analyse de marqueurs inflammatoires (activation de NF κ B) et des cellules en apoptose (présence de caspases actives dont la caspase-3) (Tsukano et al., 2010). Ces expériences permettraient de déterminer *in vivo* quel est le phénotype prédominant dans les lésions à différents stades et si un phénotype en particulier serait plus susceptible à l'apoptose. Nous n'avons pas pu réaliser d'expériences sur les souris DKO *Ldl-r*^{-/-} x *Apobec*^{-/-} car nos tentatives pour obtenir ces souris n'ont pas abouties.

Pour répondre à la question du rôle des macrophages M1 et M2 dans les lésions précoces et tardives, il faudrait envisager un étude plus fonctionnelle, en réalisant des expériences de transplantation de moelle osseuse provenant de souris M1-incompétentes (*Irf5*^{-/-} ou *Klf6*^{-/-}) ou de souris M2-incompétentes (*Stat6*^{-/-} ou *Klf4*^{-/-}) dans des souris DKO ou DKO x Tg *hMPO* préalablement irradiées (Date et al., 2014; Goodman et al., 2016; Kapoor et al., 2015; Liao et al., 2011; Weiss et al., 2015). L'analyse de la taille

des lésions, de leur composition cellulaire, de leur charge en lipides et de l'expression de différents marqueurs (ex. : polarisation, apoptose, rapport du nombre de macrophages M1/M2,...) au cours du processus de développement de la lésion permettrait de démontrer ou non si une diminution du nombre de macrophages M1 ou M2 a un effet positif ou négatif sur l'initiation et l'évolution des lésions.

A côté d'une classification fonctionnelle se dégage également, depuis quelques années, la notion de monocytes-macrophages dysfonctionnels dans le contexte de maladies inflammatoires chroniques caractérisées par un stress oxydatif. Par exemple, Mozzini et al. décrivent, dans des cellules mononuclées de sang périphérique chez des patients avec une maladie coronarienne stable, une réponse *Nrf2* déficiente alors que la réponse UPR reste opérationnelle. D'autre part, Suzuki et al., étudiant des patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique, montrent une expression de *Nrf2* diminuée dans des macrophages alvéolaires (Mozzini et al., 2014; Suzuki et al., 2008). Signalons que ces auteurs font abstraction de la polarisation des macrophages. Il serait donc intéressant, chez ces patients ainsi que chez les patients dialysés, de vérifier dans quelle mesure la réponse *Nrf2* est affectée chez des monocytes-macrophages M1 et M2.

L'origine des cellules M1 et M2 au cours de la progression des lésions reste aussi mal connue. Il serait donc également crucial de déterminer si, dans les lésions, les macrophages M1 et M2 proviennent directement de la moelle osseuse ou s'ils proviennent de macrophages résidents. L'utilisation de souris avec des lignées cellulaires marquées avec, par exemple, la GFP (Jetten et al., 2013), pourrait se révéler utile. Cela nous permettrait également de voir si ces macrophages meurent ou sortent de la lésion au cours de temps, pouvant ainsi expliquer les changements de prédominance de phénotype entre les lésions précoces et avancées (Khallou-Laschet et al., 2010).

La transposition de ces expériences chez l'homme est bien entendu plus difficile à réaliser. Mais nous pourrions commencer l'étude de l'importance de la polarisation M2 dans le développement des lésions ou de la pathologie rénale en établissant des cohortes, comme déjà expliqué précédemment.

A côté des cellules M2 de résolution, il existe des médiateurs lipidiques qui contribuent également à résoudre l'inflammation. Les résolvines, tout comme les marésines, lipoxines ou protectines, sont des **médiateurs lipidiques endogènes de résolution** dérivés d'acides gras polyinsaturés, connus pour avoir des effets bénéfiques dans plusieurs modèles de maladies inflammatoires chroniques comme l'hyperplasie néointimale, l'inflammation du tissu adipeux induite par l'obésité, la colite, la péritonite ou l'athérosclérose (Krishnamoorthy et al., 2012; Merched et al., 2008; Miyahara et al., 2013; Serhan, 2014; Titos et al., 2011). Herova et al. (2015) ont démontré récemment l'importance des **résolvines**, dans la polarisation des macrophages (Herova et al., 2015). Cette équipe a montré que la résolvine RvE1, dérivée de l'acide éicosapentaénoïque, joue un rôle anti-inflammatoire et de résolution de l'inflammation, en se liant notamment à son récepteur CHEMR23 et induisant une repolarisation des macrophages M1 ou M0 (macrophages au repos) en un phénotype intermédiaire de résolution, proche des macrophages M2 (augmentation de la transcription de l'*IL-10*, de la phagocytose des particules microbiennes (zymosan), tout en maintenant l'expression de marqueurs M1) (Herova et al., 2015). De manière similaire, l'injection péritonéale de RvE1, dans des souris C57BL/6, induit la formation de macrophages CD11^{low}, présentant une forte

capacité de phagocytose, une augmentation de la sécrétion de l'IL-10 et une diminution de celle du TNF α (Schif-Zuck et al., 2011). Hasturk et al. observent, dans un modèle de lapin développant plus de plaques athéroscléreuses au niveau de l'aorte, nourris avec un régime hypercholestérolémiant puis traités avec la RvE1, une diminution de l'athérogenèse, de la taille des plaques, du rapport intima/média, de l'infiltration des cellules inflammatoires et de la concentration systémique de CRP, par rapport à des lapins non traités (Hasturk et al., 2015).

D'autres chercheurs ont étudié la RvD1 ou la RvD2, dérivées de l'acide docosahéxaénoïque. Ils ont, par exemple, montré que ces résolvines ont pour action d'accélérer la résolution de l'inflammation en favorisant la polarisation des macrophages en cellules M2, via un mécanisme dépendant de PPAR γ (RvD1) (Saito et al., 2015), de diminuer la dilatation moyenne de l'aorte, dans le cas d'un modèle d'anévrisme aortique abdominal induit chez la souris, en diminuant l'expression de marqueurs pro-inflammatoires (MCP-1, CXCL1, IL-1 β) et en augmentant la proportion de macrophages M2 (RvD1 et RvD2) (Pope et al., 2016). Administrées de manière répétée, ces molécules empêchent la progression de l'athérosclérose dans des souris *ApoE*^{-/-} nourries avec un régime hyperlipidémiant (RvD2) (Viola et al., 2016) et atténuent la réponse inflammatoire et les dommages hépatocellulaires causés par une ischémie/reperfusion (séquelle inévitable d'une chirurgie majeure du foie) (RvD1) (Kang and Lee, 2016). Au vu de ces rôles positifs, les récepteurs de ces médiateurs pourraient constituer de très bonnes cibles thérapeutiques.

Signalons qu'au terme de notre étude sur les patients hémodialysés, nous pensons qu'il serait très intéressant de doser également les résolvines dans le sang de ces patients afin de déterminer de quelle manière leur concentration est affectée par rapport à des individus sains et de quelle manière elles pourraient affecter la polarisation des monocytes.

Mais si les mécanismes de résolution existent, comme le soulignent Viola et Soehnlein (2015), le problème de l'athérosclérose reste la question d'une inflammation non résolue à long terme (pour une revue, voir (Viola and Soehnlein, 2015)) et en tous les cas chez les souris *ApoE*^{-/-} les cellules M1 prennent le pas sur les cellules M2.

QUELQUES AUTRES PISTES D'INTERVENTION POUR LIMITER L'ATHEROGENESE?

En plus de leurs effets sur l'apoptose ou sur la production de résolvines, il serait de plus pertinent d'évaluer l'effet des Mox-LDLs sur les capacités d'**efférocytose** (élimination des cellules apoptotiques) des macrophages, phénomène crucial dans la limitation de l'évolution des lésions athéroscléreuses et de leur vulnérabilité. En effet, une efférocytose efficace empêche la libération de molécules inflammatoires et toxiques provenant des cellules en apoptose pouvant devenir nécrotiques et contribuer ainsi au développement du cœur lipidique (Tabas, 2010). Oliveira Fulco et al. ont par exemple, montré en 2014, que des macrophages M1 mis en présence de *Mycobacterium leprae* et de cellules apoptotiques subissent un changement de phénotype de M1 à M2 et que des macrophages M2, exposés aux mêmes conditions, maintiennent leur phénotype anti-inflammatoire via une augmentation de l'expression de *CD163*, *SR-AI*, *TGF- β* , *IL-10*, une induction de la sécrétion de cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) par les cellules T et une augmentation de la capacité de phagocytose des cellules apoptotiques (efférocytose) (de Oliveira Fulco et al., 2014).

Les macrophages **M2** seraient donc **plus aptes à l'efférocytose**. Des médiateurs de l'efférocytose comme MERTK (« Mer tyrosine kinase ») sont importants dans le devenir des lésions athéroscléreuses puisque des équipes comme Thorp et al. ont montré que des lésions de souris *ApoE*^{-/-}, déficientes pour le récepteur MERTK, présentent une augmentation de la taille du cœur nécrotique et du nombre de cellules apoptotiques présentes, par rapport à des souris *ApoE*^{-/-} contrôles (Thorp et al., 2008). De manière similaire, une transplantation de cellules de moelle osseuse de souris *Lrp1*^{-/-}, un autre effecteur de l'efférocytose, dans des souris *Ldl-r*^{-/-}, a pour conséquence une augmentation de la taille des lésions, de la taille du cœur nécrotique et du nombre de cellules apoptotiques (Overton et al., 2007; Yancey et al., 2010; Yancey et al., 2011). Lorsque les lésions progressent, on peut observer une déficience dans l'efférocytose. Cette observation pourrait s'expliquer en partie par l'augmentation de la production de ROS par les macrophages et de l'oxydation de molécules extracellulaires et en particulier des LDLs, qui entrent en compétition avec les cellules apoptotiques pour les récepteurs impliqués dans l'efférocytose (ex. : SR-BI) (Gillotte-Taylor et al., 2001).

En jouant sur une ou plusieurs de ces fonctions (ex. : apoptose, efférocytose,...), il devrait être possible d'induire une **régression** des plaques athéroscléreuses. Cette régression est caractérisée par une diminution de la taille des plaques, du contenu en cholestérol et lipides, du nombre de macrophages et de cellules musculaires lisses et/ou de l'état d'inflammation dans la lésion (Francis and Pierce, 2011; Peled and Fisher, 2014). Plusieurs de ces caractéristiques peuvent être observées en même temps, bien que cela ne soit pas toujours le cas. Par exemple, Feig et al., dans leur modèle de souris Reversa (voir 3.2.2 Modèles murins ciblés sur la régression des lésions : les souris Reversa), ont, après induction de la régression par activation du « knock-out » conditionnel de *Mtth*, montré que le contenu en macrophages dans les lésions de ces souris diminue, l'inflammation se révèle moindre, la synthèse de collagène augmente et les lésions sont plus stables. Cependant, la taille des lésions reste inchangée (voir 3.2.2 Modèles murins ciblés sur la régression des lésions : les souris Reversa) (Feig et al., 2011a). La régression peut être également induite, par exemple, par des injections d'APOAI humaine ou de HDLs, menant aussi à une diminution du nombre de macrophages et du contenu lipidique, une augmentation de la production de collagène et, comme pour les souris Reversa, un changement du phénotype des macrophages (Feig et al., 2011a; Hewing et al., 2014; Tangirala et al., 1999; Zhao et al., 2014).

En effet, après induction de la régression, le phénotype des macrophages a « switché » de M1 (pro-inflammatoire) en M2 (anti-inflammatoire) (Feig et al., 2011a; Feig et al., 2011b; Trogan et al., 2006). Les macrophages acquièrent ainsi des capacités de résolution de l'inflammation et de remodelage tissulaire, via une augmentation de la sécrétion de l'IL-10 et de la production de collagène notamment, mais aussi via une capacité plus importante d'efférocytose (Schnoor et al., 2008; Zizzo et al., 2012). Ce changement de phénotype peut être expliqué, soit par le **remplacement de cellules M1** quittant la lésion et ce, par des macrophages M2, après recrutement de nouveaux monocytes se différenciant en macrophages et après changement du microenvironnement, soit par un **changement direct du phénotype d'une même cellule** suite à une modification de ce microenvironnement, soit par une augmentation de la **prolifération des macrophages résidents** provenant de la vésicule vitelline et une modification de leur phénotype en fonction du microenvironnement (Davies et al., 2013; Gordon and Martinez, 2010; Llodra et al., 2004). Les données publiées commencent à s'accumuler en ce qui concerne l'identification des facteurs du

microenvironnement responsables de l'augmentation de la proportion de macrophages M2, par rapport aux M1, dans les lésions en régression. Pour la polarisation M2, la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13, par des éosinophiles, basophiles ou lymphocytes Th2, pourrait contribuer à ce processus (Cardilo-Reis et al., 2012; Gessner et al., 2005). Mais nous ne savons toujours pas comment un changement du contenu en lipides dans la lésion peut induire une stimulation de la sécrétion de cytokines Th2 par ces cellules, voire même induire un recrutement ou une augmentation de la prolifération de ces cellules présentes dans le microenvironnement des macrophages.

Enfin, une des actions, peut-être la plus évidente, afin d'induire une diminution de la taille des lésions est un **changement du régime alimentaire** vers une alimentation plus équilibrée. Signalons entre autres les effets bénéfiques de certains acides gras, liés à leur potentiel anti-inflammatoire et anti-thrombotique (pour une revue, voir (Calder, 2011)). Mais l'alimentation de chacun conditionne aussi son microbiote.

Pour rappel, Khallou-Laschet et al., en 2010, ont montré que lors d'une progression des lésions athéroscléreuse murines de précoces à avancées, le phénotype des macrophages passe de M2 à M1 (Khallou-Laschet et al., 2010). Ceci pourrait notamment être expliqué par une modification des facteurs du microenvironnement suite à l'accumulation de LDLs et lipides dans les lésions. Une des raisons de ce changement de phénotype pourrait être liée à l'augmentation de la concentration en **LPS plasmatique**, notamment observée après un repas riche en graisses ou chez des patients obèses (Cani et al., 2007; Erridge et al., 2007; Laugerette et al., 2011). Il a été montré que le LPS se lie aux chylomicrons et serait donc transféré dans la circulation sanguine via la sécrétion des chylomicrons (Laugerette et al., 2011) (Ghoshal et al., 2009). L'augmentation de la concentration en LPS plasmatique induit une augmentation systémique de l'expression de plusieurs médiateurs/acteurs inflammatoires, comme le TNF α et l'IL-8 ou NF κ B (Aljada et al., 2004; Blanco-Colio et al., 2000; Nappo et al., 2002; van Oostrom et al., 2003). Il est donc possible que l'amplification de l'inflammation dans l'environnement plasmatique induise une amplification de l'inflammation dans l'environnement des lésions athéroscléreuse et donc une polarisation M1 des macrophages.

En conclusion, privilégier une alimentation équilibrée permet non seulement de favoriser un microbiote (ou flore bactérienne intestinale) adapté, mais aussi de diminuer l'état d'inflammation systémique favorable à l'induction d'un phénotype M1 dans les macrophages et de l'évolution des lésions athéroscléreuse.

En lien avec notre étude, nous pourrions, après avoir nourri des souris avec un régime riche en lipides, mesurer la concentration en LPS plasmatique et étudier l'expression de marqueurs de polarisation dans la population de monocytes circulants et de macrophages dans la lésion.

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, ce projet de thèse nous a permis de mettre en évidence un effet des LDLs oxydées avec la myéloperoxydase sur la polarisation des macrophages. En effet, nous avons observé qu'une stimulation des macrophages, polarisés ou non, avec des Mox-LDLs favorise un phénotype anti-inflammatoire M2 et un phénotype antioxydant (Fig. 4.1). Ce phénotype semble *a priori* favorable, puisqu'il est retrouvé en prédominance dans les lésions murines précoces, en régression ou dans les régions

stables des lésions humaines (Feig et al., 2011a; Khallou-Laschet et al., 2010; Stoger et al., 2012).

D'autre part, nous avons montré qu'il ne semble pas y avoir d'effet de l'absence de P2Y₆ sur la polarisation des macrophages dans les lésions de souris *ApoE*^{-/-} x *P2Y6*^{-/-} (Fig. 4.2). Étonnamment, nous avons également observé une augmentation du nombre de monocytes M2 dans le sang de patients hémodialysés, enclins à une athérogenèse accélérée (Fig. 4.3).

Le rôle des macrophages M2 dans l'athérosclérose, comme dans le dysfonctionnement rénal chez les patients hémodialysés, reste donc un sujet à débat, puisque les monocytes-macrophages M2 semblent à la fois protecteurs et pro-athérogènes, même si les résultats obtenus avec les souris KO pour l'*ApoE* et déficientes pour *Klf4* au niveau des macrophages, plaident pour un rôle globalement bénéfique des macrophages M2 (Sharma et al., 2012).

Il est possible que, lors des étapes précoces de l'athérogenèse, les macrophages M2 participent à une réponse défensive anti-inflammatoire et anti-athérogène *a priori* bénéfique. Cependant, il semble qu'au cours du temps, pour des raisons encore peu comprises, cette réponse devienne insuffisante, les macrophages M2 cédant le pas aux macrophages M1, la lésion évoluant vers un stade plus avancé (pour une revue, voir (Viola and Soehnlein, 2015)).

Nos résultats confirment également que le cocktail inflammation – stress oxydatif – hyperlipidémie, à la condition qu'on tienne compte non seulement des LDLs, mais aussi des LDLs oxydées et en particulier des Mox-LDLs, malheureusement toujours négligées, est propice à l'athérogenèse (Fig. 4.3).

L'ensemble de nos résultats indiquent qu'il sera probablement nécessaire de combiner plusieurs stratégies thérapeutiques afin d'arriver à des effets positifs menant à la prévention, mais aussi à la régression des plaques. Si le rôle protecteur des macrophages M2 se confirmait, des modifications de régime alimentaire pourraient être combinées, par exemple, avec l'utilisation d'une thérapie favorisant la polarisation M2 anti-athérogène, aidant respectivement à réduire le cholestérol plasmatique et à favoriser un environnement anti-inflammatoire dans les lésions. L'utilisation de DES (« drug-eluting stents »), par exemple, pourrait être une solution, afin de permettre une administration locale et progressive d'agents inducteurs d'une polarisation M2, et non pas systémique pour éviter un effet immunosuppresseur (pour une revue, voir (Kalra et al., 2017)).

Références

V. REFERENCES

A-Gonzalez, N., Guillen, J.A., Gallardo, G., Diaz, M., de la Rosa, J.V., Hernandez, I.H., Casanova-Acebes, M., Lopez, F., Tabraue, C., Beceiro, S., *et al.* (2013). The nuclear receptor LXRalpha controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat Immunol* 14, 831-839.

Abu-Soud, H.M., and Hazen, S.L. (2000). Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 275, 37524-37532.

Adachi, H., and Tsujimoto, M. (2006). Endothelial scavenger receptors. *Progress in lipid research* 45, 379-404.

Adamson, S.E., Griffiths, R., Moravec, R., Senthivinayagam, S., Montgomery, G., Chen, W., Han, J., Sharma, P.R., Mullins, G.R., Gorski, S.A., *et al.* (2016). Disabled homolog 2 controls macrophage phenotypic polarization and adipose tissue inflammation. *J Clin Invest* 126, 1311-1322.

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.

Aiello, R.J., Brees, D., and Francone, O.L. (2003). ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 972-980.

Akagawa, K.S. (2002). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *International journal of hematology* 76, 27-34.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Akishima, Y., Akasaka, Y., Ishikawa, Y., Lijun, Z., Kiguchi, H., Ito, K., Itabe, H., and Ishii, T. (2005). Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 18, 365-373.

Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M., and Cook, J.L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274, 26071-26078.

Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Abdo, T., Tripathy, D., Chaudhuri, A., and Dandona, P. (2004). Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *The American journal of clinical nutrition* 79, 682-690.

Anderson, M.T., Staal, F.J., Gitler, C., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1994). Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11527-11531.

Apostolov, E.O., Shah, S.V., Ok, E., and Basnakian, A.G. (2007). Carbamylated low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial cells through intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 826-832.

Arai, T., Hiromatsu, K., Nishimura, H., Kimura, Y., Kobayashi, N., Ishida, H., Nimura, Y., and Yoshikai, Y. (1995). Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during Salmonella infection. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 600-607.

- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* *204*, 1057-1069.
- Asselbergs, F.W., Tervaert, J.W., and Tio, R.A. (2004). Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *The New England journal of medicine* *350*, 516-518; author reply 516-518.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* *317*, 666-670.
- Aukrust, P., Halvorsen, B., Yndestad, A., Ueland, T., Oie, E., Otterdal, K., Gullestad, L., and Damas, J.K. (2008). Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 1909-1919.
- Austyn, J.M., and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* *11*, 805-815.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Etzioni, A., and Levy, R. (1996). Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism: clinical and experimental* *45*, 1069-1079.
- Awan, Z., Alrasadi, K., Francis, G.A., Hegele, R.A., McPherson, R., Frohlich, J., Valenti, D., de Varennes, B., Marcil, M., Gagne, C., *et al.* (2008). Vascular calcifications in homozygote familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 777-785.
- Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M., and Grompe, M. (2007). Robust expansion of human hepatocytes in Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} mice. *Nature biotechnology* *25*, 903-910.
- Babaev, V.R., Patel, M.B., Semenkovich, C.F., Fazio, S., and Linton, M.F. (2000). Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* *275*, 26293-26299.
- Babior, B.M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* *73*, 599-601.
- Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal immunology* *6*, 498-510.
- Baldrige, M.T., King, K.Y., and Goodell, M.A. (2011). Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol* *32*, 57-65.
- Baldus, S., Eiserich, J.P., Mani, A., Castro, L., Figueroa, M., Chumley, P., Ma, W., Tousson, A., White, C.R., Bullard, D.C., *et al.* (2001). Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* *108*, 1759-1770.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W., and Vercellotti, G.M. (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* *267*, 18148-18153.
- Balla, G., Jacob, H.S., Eaton, J.W., Belcher, J.D., and Vercellotti, G.M. (1991). Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury.

Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association 11, 1700-1711.

Banerjee, Y., Santos, R.D., Al-Rasadi, K., and Rizzo, M. (2016). Targeting PCSK9 for therapeutic gains: Have we addressed all the concerns? *Atherosclerosis* 248, 62-75.

Bar, I., Guns, P.J., Metallo, J., Cammarata, D., Wilkin, F., Boeynants, J.M., Bult, H., and Robaye, B. (2008). Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 74, 777-784.

Barbul, A. (2008). Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. *The Journal of nutrition* 138, 2021S-2024S.

Barcat, D., Amadio, A., Palos-Pinto, A., Daret, D., Benlian, P., Darmon, M., and Berard, A.M. (2006). Combined hyperlipidemia/hyperalphalipoproteinemia associated with premature spontaneous atherosclerosis in mice lacking hepatic lipase and low density lipoprotein receptor. *Atherosclerosis* 188, 347-355.

Barry-Lane, P.A., Patterson, C., van der Merwe, M., Hu, Z., Holland, S.M., Yeh, E.T., and Runge, M.S. (2001). p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 108, 1513-1522.

Barter, P. (2014). Lipoprotein metabolism and CKD: overview. *Clinical and experimental nephrology* 18, 243-246.

Beaumont, C., and Canonne-Hergaux, F. (2005). [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfus Clin Biol* 12, 123-130.

Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87, 245-313.

Beffert, U., Stolt, P.C., and Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J Lipid Res* 45, 403-409.

Bekkering, S., Quintin, J., Joosten, L.A., van der Meer, J.W., Netea, M.G., and Riksen, N.P. (2014). Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1731-1738.

Ben Yebdri, F., Kukulski, F., Tremblay, A., and Sevigny, J. (2009). Concomitant activation of P2Y(2) and P2Y(6) receptors on monocytes is required for TLR1/2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion. *Eur J Immunol* 39, 2885-2894.

Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181, 3733-3739.

Berg, K.E., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Bryngelsson, C., Hedblad, B., Fredrikson, G.N., Nilsson, J., and Bjorkbacka, H. (2012). Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circulation Cardiovascular genetics* 5, 122-131.

Bergt, C., Pennathur, S., Fu, X., Byun, J., O'Brien, K., McDonald, T.O., Singh, P., Anantharamaiah, G.M., Chait, A., Brunzell, J., *et al.* (2004). The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13032-13037.

- Berliner, J.A., Territo, M.C., Sevanian, A., Ramin, S., Kim, J.A., Bamshad, B., Esterson, M., and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 85, 1260-1266.
- Berneis, K.K., and Krauss, R.M. (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 43, 1363-1379.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5.
- Binker, M.G., Cosen-Binker, L.I., Terebiznik, M.R., Mallo, G.V., McCaw, S.E., Eskelinen, E.L., Willenborg, M., Brummel, J.H., Saftig, P., Grinstein, S., *et al.* (2007). Arrested maturation of Neisseria-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2. *Cell Microbiol* 9, 2153-2166.
- Bissig, K.D., Le, T.T., Woods, N.B., and Verma, I.M. (2007). Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20507-20511.
- Bissig-Choisat, B., Wang, L., Legras, X., Saha, P.K., Chen, L., Bell, P., Pankowicz, F.P., Hill, M.C., Barzi, M., Kettlun Leyton, C., *et al.* (2015). Development and rescue of human familial hypercholesterolaemia in a xenograft mouse model. *Nature communications* 6, 7339.
- Biswas, S.K., Chittechath, M., Shalova, I.N., and Lim, J.Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res* 53, 11-24.
- Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M.B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980-984.
- Bjorkbacka, H., Kunjathoor, V.V., Moore, K.J., Koehn, S., Ordija, C.M., Lee, M.A., Means, T., Halmen, K., Luster, A.D., Golenbock, D.T., *et al.* (2004). Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 10, 416-421.
- Blanco-Colio, L.M., Valderrama, M., Alvarez-Sala, L.A., Bustos, C., Ortego, M., Hernandez-Presa, M.A., Cancelas, P., Gomez-Gerique, J., Millan, J., and Egido, J. (2000). Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 102, 1020-1026.
- Boesten, L.S., Zadelaar, A.S., van Nieuwkoop, A., Gijbels, M.J., de Winther, M.P., Havekes, L.M., and van Vlijmen, B.J. (2005). Tumor necrosis factor-alpha promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-Leiden transgenic mice. *Cardiovasc Res* 66, 179-185.
- Boeynaems, J.M., Communi, D., Gonzalez, N.S., and Robaye, B. (2005). Overview of the P2 receptors. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31, 139-149.
- Bolick, D.T., Orr, A.W., Whetzel, A., Srinivasan, S., Hatley, M.E., Schwartz, M.A., and Hedrick, C.C. (2005). 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2301-2307.
- Boren, J., Lee, I., Zhu, W., Arnold, K., Taylor, S., and Innerarity, T.L. (1998). Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest* 101, 1084-1093.

- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897.
- Borregaard, N. (1997). Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci* 832, 62-68.
- Bos, A., Wever, R., and Roos, D. (1978). Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta* 525, 37-44.
- Boskovic, J., Arnold, J.N., Stilion, R., Gordon, S., Sim, R.B., Rivera-Calzada, A., Wienke, D., Isacke, C.M., Martinez-Pomares, L., and Llorca, O. (2006). Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor. *J Biol Chem* 281, 8780-8787.
- Bottcher, A., Gaipl, U.S., Furnrohr, B.G., Herrmann, M., Girkontaite, I., Kalden, J.R., and Voll, R.E. (2006). Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis and rheumatism* 54, 927-938.
- Boudjeltia, K.Z., Brohee, D., Piro, P., Nuyens, V., Ducobu, J., Kherkofs, M., Van Antwerpen, P., Cauchie, P., Remacle, C., and Vanhaeverbeek, M. (2008). Monocyte-platelet complexes on CD14/CD16 monocyte subsets: relationship with ApoA-I levels. A preliminary study. *Cardiovasc Pathol* 17, 285-288.
- Boudjeltia, K.Z., Legssyer, I., Van Antwerpen, P., Kisoka, R.L., Babar, S., Moguilevsky, N., Delree, P., Ducobu, J., Remacle, C., Vanhaeverbeek, M., *et al.* (2006). Triggering of inflammatory response by myeloperoxidase-oxidized LDL. *Biochem Cell Biol* 84, 805-812.
- Bouhlef, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., *et al.* (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6, 137-143.
- Bradamante, S., Barenghi, L., Giudici, G.A., and Vergani, C. (1992). Free radicals promote modifications in plasma high-density lipoprotein: nuclear magnetic resonance analysis. *Free Radic Biol Med* 12, 193-203.
- Branen, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J., and Jovinge, S. (2004). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 2137-2142.
- Brash, A.R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274, 23679-23682.
- Breckenridge, W.C., Roberts, A., and Kuksis, A. (1985). Lipoprotein levels in genetically selected mice with increased susceptibility to atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 5, 256-264.
- Brennan, M.L., Anderson, M.M., Shih, D.M., Qu, X.D., Wang, X., Mehta, A.C., Lim, L.L., Shi, W., Hazen, S.L., Jacob, J.S., *et al.* (2001). Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest* 107, 419-430.
- Brocheriou, I., Maouche, S., Durand, H., Braunersreuther, V., Le Naour, G., Gratchev, A., Koskas, F., Mach, F., Kzhyshkowska, J., and Ninio, E. (2011). Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 214, 316-324.

- Brown, G.D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* *413*, 36-37.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11041-11048.
- Brunham, L.R., Kruit, J.K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J.M., Pape, T.D., Coburn, B.A., Bissada, N., Staels, B., Groen, A.K., *et al.* (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* *116*, 1052-1062.
- Burgess, A.W., and Metcalf, D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* *56*, 947-958.
- Burnstock, G. (2002). Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *22*, 364-373.
- Burnstock, G., and Boeynaems, J.M. (2014). Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic signalling* *10*, 529-564.
- Burnstock, G., and Dale, N. (2015). Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic signalling* *11*, 277-305.
- Calay, D., Rousseau, A., Mattart, L., Nuyens, V., Delporte, C., Van Antwerpen, P., Moguelevsky, N., Arnould, T., Boudjeltia, K.Z., and Raes, M. (2010). Copper and myeloperoxidase-modified LDLs activate Nrf2 through different pathways of ROS production in macrophages. *Antioxid Redox Signal* *13*, 1491-1502.
- Calder, P.C. (2011). Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *European journal of pharmacology* *668 Suppl 1*, S50-58.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., *et al.* (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* *56*, 1761-1772.
- Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* *13*, 621-634.
- Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Cannon, R.O., 3rd, Quyyumi, A.A., and Panza, J.A. (1997). Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* *30*, 57-63.
- Cardilo-Reis, L., Gruber, S., Schreier, S.M., Drechsler, M., Papac-Milicevic, N., Weber, C., Wagner, O., Stangl, H., Soehnlein, O., and Binder, C.J. (2012). Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. *EMBO molecular medicine* *4*, 1072-1086.
- Carr, A.C., McCall, M.R., and Frei, B. (2000a). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *20*, 1716-1723.
- Carr, A.C., Myzak, M.C., Stocker, R., McCall, M.R., and Frei, B. (2000b). Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* *487*, 176-180.
- Castelli, W.P. (1984). Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *The American journal of medicine* *76*, 4-12.

- Cattaneo, M. (2015). P2Y12 receptors: structure and function. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 13 Suppl 1*, S10-16.
- Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta 1761*, 655-666.
- Chambers, J.K., Macdonald, L.E., Sarau, H.M., Ames, R.S., Freeman, K., Foley, J.J., Zhu, Y., McLaughlin, M.M., Murdock, P., McMillan, L., *et al.* (2000). A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem 275*, 10767-10771.
- Chang, N.C., Hung, S.I., Hwa, K.Y., Kato, I., Chen, J.E., Liu, C.H., and Chang, A.C. (2001). A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *J Biol Chem 276*, 17497-17506.
- Chapman, A.L., Hampton, M.B., Senthilmohan, R., Winterbourn, C.C., and Kettle, A.J. (2002). Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem 277*, 9757-9762.
- Charlton-Menys, V., and Durrington, P.N. (2007). Squalene synthase inhibitors : clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential. *Drugs 67*, 11-16.
- Chatterjee, S. (1998). Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol 18*, 1523-1533.
- Chen, J., Yao, Y., Gong, C., Yu, F., Su, S., Chen, J., Liu, B., Deng, H., Wang, F., Lin, L., *et al.* (2011a). CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer cell 19*, 541-555.
- Chen, X.W., Shen, Y., Sun, C.Y., Wu, F.X., Chen, Y., and Yang, C.D. (2011b). Anti-class a scavenger receptor autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients impair phagocytic clearance of apoptotic cells by macrophages in vitro. *Arthritis research & therapy 13*, R9.
- Cheung, A.K., Sarnak, M.J., Yan, G., Dwyer, J.T., Heyka, R.J., Rocco, M.V., Teehan, B.P., and Levey, A.S. (2000). Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney international 58*, 353-362.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Torra, I.P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., *et al.* (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med 7*, 53-58.
- Chinetti-Gbaguidi, G., Baron, M., Bouhlef, M.A., Vanhoutte, J., Copin, C., Sebti, Y., Derudas, B., Mayi, T., Bories, G., Tailleux, A., *et al.* (2011). Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRA pathways. *Circ Res 108*, 985-995.
- Chinetti-Gbaguidi, G., Colin, S., and Staels, B. (2015). Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nature reviews Cardiology 12*, 10-17.
- Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2011). Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. *Current opinion in lipidology 22*, 365-372.
- Chistiakov, D.A., Bobryshev, Y.V., and Orekhov, A.N. (2016). Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med 20*, 17-28.

- Chistiakov, D.A., Myasoedova, V.A., Revin, V.V., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2017). The phenomenon of atherosclerosis reversal and regression: Lessons from animal models. *Exp Mol Pathol* 102, 138-145.
- Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current opinion in immunology* 18, 39-48.
- Cho, K.Y., Miyoshi, H., Kuroda, S., Yasuda, H., Kamiyama, K., Nakagawara, J., Takigami, M., Kondo, T., and Atsumi, T. (2013). The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 22, 910-918.
- Clark, R.A., Malech, H.L., Gallin, J.I., Nunoi, H., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Nauseef, W.M., and Curnutte, J.T. (1989). Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *The New England journal of medicine* 321, 647-652.
- Cline, M.J. (1994). Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 84, 2840-2853.
- Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W., and Libby, P. (1992). Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 140, 301-316.
- Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytois and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1649-1657.
- Conroy, R.M., Pyorala, K., Fitzgerald, A.P., Sans, S., Menotti, A., De Backer, G., De Bacquer, D., Ducimetiere, P., Jousilahti, P., Keil, U., *et al.* (2003). Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *European heart journal* 24, 987-1003.
- Cox, M.A., Gomes, B., Palmer, K., Du, K., Wiekowski, M., Wilburn, B., Petro, M., Chou, C.C., Desquitado, C., Schwarz, M., *et al.* (2005). The pyrimidinergic P2Y6 receptor mediates a novel release of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytic cells stimulated with UDP. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 467-473.
- Crane, M.J., Daley, J.M., van Houtte, O., Brancato, S.K., Henry, W.L., Jr., and Albina, J.E. (2014). The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PLoS One* 9, e86660.
- Crauwels, H.M., Van Hove, C.E., Holvoet, P., Herman, A.G., and Bult, H. (2003). Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res* 59, 189-199.
- Crofton, R.W., Diesselhoff-den Dulk, M.M., and van Furth, R. (1978). The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med* 148, 1-17.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., *et al.* (2010). Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386.
- Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 25, 745-785.

- Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., and Funk, C.D. (1999). Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 103, 1597-1604.
- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., *et al.* (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 176, 1387-1398.
- Dacosta, N.A., and Kinare, S.G. (1991). Association of lung carcinoma and tuberculosis. *Journal of postgraduate medicine* 37, 185-189.
- Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright, R.W., Jr., and Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International journal of biological sciences* 5, 474-488.
- Date, D., Das, R., Narla, G., Simon, D.I., Jain, M.K., and Mahabeleshwar, G.H. (2014). Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. *J Biol Chem* 289, 10318-10329.
- Daugherty, A., Dunn, J.L., Rateri, D.L., and Heinecke, J.W. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94, 437-444.
- Davenport, P., and Tipping, P.G. (2003). The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 163, 1117-1125.
- Davidson, N.O., Anant, S., and MacGinnitie, A.J. (1995a). Apolipoprotein B messenger RNA editing: insights into the molecular regulation of post-transcriptional cytidine deamination. *Current opinion in lipidology* 6, 70-74.
- Davidson, N.O., Carlos, R.C., Drewek, M.J., and Parmer, T.G. (1988). Apolipoprotein gene expression in the rat is regulated in a tissue-specific manner by thyroid hormone. *J Lipid Res* 29, 1511-1522.
- Davidson, N.O., Innerarity, T.L., Scott, J., Smith, H., Driscoll, D.M., Teng, B., and Chan, L. (1995b). Proposed nomenclature for the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme: APOBEC-1. *Rna* 1, 3.
- Davidson, W.S., Silva, R.A., Chantepie, S., Lagor, W.R., Chapman, M.J., and Kontush, A. (2009). Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 870-876.
- Davidsson, P., Hulthe, J., Fagerberg, B., and Camejo, G. (2010). Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 156-163.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986-995.
- Davis, B.K. (2013). Evaluation of classical, alternative, and regulatory functions of bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol Biol* 1032, 79-89.
- Davis, M.J., Tsang, T.M., Qiu, Y., Dayrit, J.K., Freij, J.B., Huffnagle, G.B., and Olszewski, M.A. (2013). Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio* 4, e00264-00213.

- De Bandt, J.P., Moinard, C., and Cynober, L. (2006). Polyamine functions and metabolism. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 21, 333-341.
- de Oliveira Fulco, T., Andrade, P.R., de Mattos Barbosa, M.G., Pinto, T.G., Ferreira, P.F., Ferreira, H., da Costa Nery, J.A., Real, S.C., Borges, V.M., Moraes, M.O., *et al.* (2014). Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. *Infect Immun* 82, 3968-3978.
- de Vries, J.E. (1995). Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 27, 537-541.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-1220.
- de Winther, M.P., Gijbels, M.J., van Dijk, K.W., van Gorp, P.J., Suzuki, H., Kodama, T., Frants, R.R., Havekes, L.M., and Hofker, M.H. (1999). Scavenger receptor deficiency leads to more complex atherosclerotic lesions in APOE3Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 144, 315-321.
- Deby-Dupont, G., and Lamy, M. (1999). Neutrophil myeloperoxidase revisited: its role in health and disease. *Intensivmed* 36, 500-513.
- Delerive, P., Furman, C., Teissier, E., Fruchart, J., Duriez, P., and Staels, B. (2000). Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett* 471, 34-38.
- Delporte, C., Franck, T., Noyon, C., Dufour, D., Rousseau, A., Madhoun, P., Desmet, J.M., Serteyn, D., Raes, M., Nortier, J., *et al.* (2012). Simultaneous measurement of protein-bound 3-chlorotyrosine and homocitrulline by LC-MS/MS after hydrolysis assisted by microwave: application to the study of myeloperoxidase activity during hemodialysis. *Talanta* 99, 603-609.
- Delporte, C., Van Antwerpen, P., Vanhamme, L., Roumeguere, T., and Zouaoui Boudjeltia, K. (2013). Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies. *Mediators of inflammation* 2013, 971579.
- Denda-Nagai, K., Aida, S., Saba, K., Suzuki, K., Moriyama, S., Oo-Puthinan, S., Tsuiji, M., Morikawa, A., Kumamoto, Y., Sugiura, D., *et al.* (2010). Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J Biol Chem* 285, 19193-19204.
- Denda-Nagai, K., Kubota, N., Tsuiji, M., Kamata, M., and Irimura, T. (2002). Macrophage C-type lectin on bone marrow-derived immature dendritic cells is involved in the internalization of glycosylated antigens. *Glycobiology* 12, 443-450.
- Desmons, A., Jaisson, S., Pietrement, C., Rieu, P., Wynckel, A., and Gillery, P. (2016). Homocitrulline: a new marker for differentiating acute from chronic renal failure. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 54, 73-79.
- Devaraj, S., Yun, J.M., Duncan-Staley, C., and Jialal, I. (2009). C-reactive protein induces M-CSF release and macrophage proliferation. *J Leukoc Biol* 85, 262-267.
- Di Virgilio, F., and Solini, A. (2002). P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 135, 831-842.

- Di Virgilio, F., and Vuerich, M. (2015). Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci* 191, 117-123.
- Dinauer, M.C., Orkin, S.H., Brown, R., Jesaitis, A.J., and Parkos, C.A. (1987). The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 327, 717-720.
- Ding, Q., Strong, A., Patel, K.M., Ng, S.L., Gosis, B.S., Regan, S.N., Cowan, C.A., Rader, D.J., and Musunuru, K. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res* 115, 488-492.
- Dje N'Guessan, P., Riediger, F., Vardarova, K., Scharf, S., Eitel, J., Opitz, B., Slevogt, H., Weichert, W., Hocke, A.C., Schmeck, B., *et al.* (2009). Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 380-386.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 78, 857-902.
- Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (1998). The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102, 145-152.
- Dranoff, G., Crawford, A.D., Sadelain, M., Ream, B., Rashid, A., Bronson, R.T., Dickersin, G.R., Bachurski, C.J., Mark, E.L., Whitsett, J.A., *et al.* (1994). Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264, 713-716.
- Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25, 452-463.
- Dubick, M.A., Hunter, G.C., Casey, S.M., and Keen, C.L. (1987). Aortic ascorbic acid, trace elements, and superoxide dismutase activity in human aneurysmal and occlusive disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 184, 138-143.
- Duff, C.J., and Hooper, N.M. (2011). PCSK9: an emerging target for treatment of hypercholesterolemia. *Expert opinion on therapeutic targets* 15, 157-168.
- Duzguncinar, O., Yavuz, B., Hazirolan, T., Deniz, A., Tokgozoglul, S.L., Akata, D., and Demirpence, E. (2008). Plasma myeloperoxidase is related to the severity of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 63, 147-152.
- Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otsuka, M., Komatsu, R., Matsuo, T., Itabe, H., Takano, T., *et al.* (2001). Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103, 1955-1960.
- Eiserich, J.P., Baldus, S., Brennan, M.L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., Lusis, A.J., Nauseef, W.M., White, C.R., *et al.* (2002). Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296, 2391-2394.
- Elhelu, M.A. (1983). The role of macrophages in immunology. *Journal of the National Medical Association* 75, 314-317.
- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., *et al.* (2014a). Embryonic and adult-derived resident cardiac

macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* *40*, 91-104.

Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014b). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* *41*, 21-35.

Erridge, C., Attina, T., Spickett, C.M., and Webb, D.J. (2007). A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American journal of clinical nutrition* *86*, 1286-1292.

Escola-Gil, J.C., Julve, J., Marzal-Casacuberta, A., Ordonez-Llanos, J., Gonzalez-Sastre, F., and Blanco-Vaca, F. (2000). Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* *41*, 1328-1338.

Espenshade, P.J., Cheng, D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1999). Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* *274*, 22795-22804.

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* *13*, 341-390.

Exner, M., Schillinger, M., Minar, E., Mlekusch, W., Schlerka, G., Haumer, M., Mannhalter, C., and Wagner, O. (2001). Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with restenosis after percutaneous transluminal angioplasty. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists* *8*, 433-440.

Ezekowitz, R.A., and Gordon, S. (1984). Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. *Contemporary topics in immunobiology* *13*, 33-56.

Fadini, G.P., Cappellari, R., Mazzucato, M., Agostini, C., Vigili de Kreutzenberg, S., and Avogaro, A. (2013a). Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals. *Acta diabetologica* *50*, 977-982.

Fadini, G.P., de Kreutzenberg, S.V., Boscaro, E., Albiero, M., Cappellari, R., Krankel, N., Landmesser, U., Toniolo, A., Bolego, C., Cignarella, A., *et al.* (2013b). An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy. *Diabetologia* *56*, 1856-1866.

Fadini, G.P., Simoni, F., Cappellari, R., Vitturi, N., Galasso, S., Vigili de Kreutzenberg, S., Previato, L., and Avogaro, A. (2014). Pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization imbalance in human hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* *237*, 805-808.

Farnier, M. (2011). The role of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in hyperlipidemia: focus on therapeutic implications. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* *11*, 145-152.

Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., and 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.

Feig, J.E., Parathath, S., Rong, J.X., Mick, S.L., Vengrenyuk, Y., Grauer, L., Young, S.G., and Fisher, E.A. (2011a). Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation* *123*, 989-998.

- Feig, J.E., Rong, J.X., Shamir, R., Sanson, M., Vengrenyuk, Y., Liu, J., Rayner, K., Moore, K., Garabedian, M., and Fisher, E.A. (2011b). HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 7166-7171.
- Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2015). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA)).
- Ferrari, D., Idzko, M., Dichmann, S., Purlis, D., Virchow, C., Norgauer, J., Chiozzi, P., Di Virgilio, F., and Luttmann, W. (2000a). P2 purinergic receptors of human eosinophils: characterization and coupling to oxygen radical production. *FEBS Lett* *486*, 217-224.
- Ferrari, D., La Sala, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Falzoni, S., Girolomoni, G., Idzko, M., Dichmann, S., Norgauer, J., and Di Virgilio, F. (2000b). The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J* *14*, 2466-2476.
- Fioranelli, M., and Grazia, R.M. (2014). Twenty-five years of studies and trials for the therapeutic application of IL-10 immunomodulating properties. From high doses administration to low dose medicine new paradigm. *J Integr Cardiol* *1*, 2-6.
- Fisher, E.A., Pan, M., Chen, X., Wu, X., Wang, H., Jamil, H., Sparks, J.D., and Williams, K.J. (2001). The triple threat to nascent apolipoprotein B. Evidence for multiple, distinct degradative pathways. *J Biol Chem* *276*, 27855-27863.
- Fleetwood, A.J., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2005). Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Critical reviews in immunology* *25*, 405-428.
- Fleetwood, A.J., Dinh, H., Cook, A.D., Hertzog, P.J., and Hamilton, J.A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol* *86*, 411-421.
- Fleetwood, A.J., Lawrence, T., Hamilton, J.A., and Cook, A.D. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* *178*, 5245-5252.
- Fotakis, P., Kuivenhoven, J.A., Dafnis, E., Kardassis, D., and Zannis, V.I. (2015). The Effect of Natural LCAT Mutations on the Biogenesis of HDL. *Biochemistry* *54*, 3348-3359.
- Fournier, N., Atger, V., Paul, J.L., Sturm, M., Duverger, N., Rothblat, G.H., and Moatti, N. (2000). Human ApoA-IV overexpression in transgenic mice induces cAMP-stimulated cholesterol efflux from J774 macrophages to whole serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *20*, 1283-1292.
- Francis, A.A., and Pierce, G.N. (2011). An integrated approach for the mechanisms responsible for atherosclerotic plaque regression. *Exp Clin Cardiol* *16*, 77-86.
- Francone, O.L., Royer, L., Boucher, G., Haghpassand, M., Freeman, A., Brees, D., and Aiello, R.J. (2005). Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in Abca1-deficient macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *25*, 1198-1205.
- Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological reviews* *262*, 193-215.

- Fritz, J. (2009). M1 and M2 macrophage activation. *U-Colorado-HSC*, 1-2.
- Fuhrman, B., Partoush, A., Volkova, N., and Aviram, M. (2008). Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R). *Atherosclerosis* 196, 598-607.
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis research & therapy* 8 *Suppl 2*, S3.
- Gabay, C., Smith, M.F., Eidlen, D., and Arend, W.P. (1997). Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest* 99, 2930-2940.
- Galis, Z.S., Muszynski, M., Sukhova, G.K., Simon-Morrissey, E., and Libby, P. (1995). Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci* 748, 501-507.
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94, 2493-2503.
- Galkina, E., Kadl, A., Sanders, J., Varughese, D., Sarembock, I.J., and Ley, K. (2006). Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J Exp Med* 203, 1273-1282.
- Galkina, E., and Ley, K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* 27, 165-197.
- Gallo, P.M., and Gallucci, S. (2013). The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Frontiers in immunology* 4, 138.
- Galvan-Pena, S., and O'Neill, L.A. (2014). Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Frontiers in immunology* 5, 420.
- Garcia, R.A., Yan, M., Search, D., Zhang, R., Carson, N.L., Ryan, C.S., Smith-Monroy, C., Zheng, J., Chen, J., Kong, Y., *et al.* (2014). P2Y6 receptor potentiates pro-inflammatory responses in macrophages and exhibits differential roles in atherosclerotic lesion development. *PLoS One* 9, e111385.
- Garcia-Lopez, E., Carrero, J.J., Suliman, M.E., Lindholm, B., and Stenvinkel, P. (2007). Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 27 *Suppl 2*, S205-209.
- Gazi, U., and Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214, 554-561.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.
- Geng, Y.J., and Hansson, G.K. (1992). Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 89, 1322-1330.

- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., and Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC cancer* *15*, 577.
- Gent, J., and Braakman, I. (2004). Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol Life Sci* *61*, 2461-2470.
- George, J., Afek, A., Shaish, A., Levkovitz, H., Bloom, N., Cyrus, T., Zhao, L., Funk, C.D., Sigal, E., and Harats, D. (2001). 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* *104*, 1646-1650.
- Gessner, A., Mohrs, K., and Mohrs, M. (2005). Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol* *174*, 1063-1072.
- Getz, G.S., and Reardon, C.A. (2006). Arginine/arginase NO NO NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *26*, 237-239.
- Getz, G.S., and Reardon, C.A. (2012). Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *32*, 1104-1115.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* *25*, 57-70.
- Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W., and Eckhardt, E. (2009). Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* *50*, 90-97.
- Gidding, S.S. (2016). The complexities of homozygous familial hypercholesterolemia management. *Pediatric transplantation* *20*, 1020-1021.
- Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J.L., Steinberg, D., and Quehenberger, O. (2001). Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* *42*, 1474-1482.
- Gilroy, D.W., Lawrence, T., Perretti, M., and Rossi, A.G. (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* *3*, 401-416.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* *330*, 841-845.
- Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* *104*, 503-516.
- Go, G.W., and Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med* *85*, 19-28.
- Godber, B.L., Doel, J.J., Durgan, J., Eisenthal, R., and Harrison, R. (2000). A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett* *475*, 93-96.
- Goerdts, S., and Orfanos, C.E. (1999). Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* *10*, 137-142.
- Goldstein, J.L., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1983). Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods in enzymology* *98*, 241-260.

- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1973). Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2804-2808.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1974). Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249, 5153-5162.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 431-438.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.
- Goodman, W.A., Omenetti, S., Date, D., Di Martino, L., De Salvo, C., Kim, G.D., Chowdhry, S., Bamias, G., Cominelli, F., Pizarro, T.T., *et al.* (2016). KLF6 contributes to myeloid cell plasticity in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 9, 1250-1262.
- Goodman, W.G., Goldin, J., Kuizon, B.D., Yoon, C., Gales, B., Sider, D., Wang, Y., Chung, J., Emerick, A., Greaser, L., *et al.* (2000). Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *The New England journal of medicine* 342, 1478-1483.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
- Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37 *Suppl* 1, S9-17.
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Gordon, S., Pluddemann, A., and Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological reviews* 262, 36-55.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Gotoh, T., and Mori, M. (1999). Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 144, 427-434.
- Grass, D.S., Saini, U., Felkner, R.H., Wallace, R.E., Lago, W.J., Young, S.G., and Swanson, M.E. (1995). Transgenic mice expressing both human apolipoprotein B and human CETP have a lipoprotein cholesterol distribution similar to that of normolipidemic humans. *J Lipid Res* 36, 1082-1091.
- Greaves, D.R., and Gordon, S. (2009). The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 50 *Suppl*, S282-286.
- Groeneweg, M., Kanters, E., Vergouwe, M.N., Duerink, H., Kraal, G., Hofker, M.H., and de Winther, M.P. (2006). Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine macrophages is enhanced by prior exposure to oxLDL. *J Lipid Res* 47, 2259-2267.

- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2014). The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* *14*, 94-108.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* *210*, 1977-1992.
- Gullberg, U., Bengtsson, N., Bulow, E., Garwicz, D., Lindmark, A., and Olsson, I. (1999). Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods* *232*, 201-210.
- Guns, P.J., Hendrickx, J., Van Assche, T., Franssen, P., and Bult, H. (2010). P2Y receptors and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Pharmacol* *159*, 326-336.
- Gusarova, V., Caplan, A.J., Brodsky, J.L., and Fisher, E.A. (2001). Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem* *276*, 24891-24900.
- Halvorsen, B., Waehre, T., Scholz, H., Clausen, O.P., von der Thusen, J.H., Muller, F., Heimli, H., Tonstad, S., Hall, C., Froland, S.S., *et al.* (2005). Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. *J Lipid Res* *46*, 211-219.
- Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* *8*, 533-544.
- Han, K.H., Chang, M.K., Boullier, A., Green, S.R., Li, A., Glass, C.K., and Quehenberger, O. (2000). Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* *106*, 793-802.
- Han, X., Kitamoto, S., Lian, Q., and Boisvert, W.A. (2009). Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J Biol Chem* *284*, 32950-32958.
- Han, Y., Ma, F.Y., Tesch, G.H., Manthey, C.L., and Nikolic-Paterson, D.J. (2013). Role of macrophages in the fibrotic phase of rat crescentic glomerulonephritis. *American journal of physiology Renal physiology* *304*, F1043-1053.
- Hansson, G.K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* *352*, 1685-1695.
- Hansson, M., Olsson, I., and Nauseef, W.M. (2006). Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of biochemistry and biophysics* *445*, 214-224.
- Harbord, M., Novelli, M., Canas, B., Power, D., Davis, C., Godovac-Zimmermann, J., Roes, J., and Segal, A.W. (2002). Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47phox-deficient mice. *J Biol Chem* *277*, 5468-5475.
- Harmankaya, O., Akalin, N., Akay, H., Okuturlar, Y., Erturk, K., Kaptanogullari, H., and Kocoglu, H. (2015). Comparison of risk factors for cardiovascular disease in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Clinics* *70*, 601-605.
- Harris, N., Super, M., Rits, M., Chang, G., and Ezekowitz, R.A. (1992). Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood* *80*, 2363-2373.

- Harris, R.A. (2014). Spatial, Temporal, and Functional Aspects of Macrophages during "The Good, the Bad, and the Ugly" Phases of Inflammation. *Frontiers in immunology* 5, 612.
- Harrison, R. (2004). Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug metabolism reviews* 36, 363-375.
- Hartvigsen, K., Binder, C.J., Hansen, L.F., Rafia, A., Juliano, J., Horkko, S., Steinberg, D., Palinski, W., Witztum, J.L., and Li, A.C. (2007). A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 878-885.
- Hasilik, A., Pohlmann, R., Olsen, R.L., and von Figura, K. (1984). Myeloperoxidase is synthesized as larger phosphorylated precursor. *The EMBO journal* 3, 2671-2676.
- Hasturk, H., Abdallah, R., Kantarci, A., Nguyen, D., Giordano, N., Hamilton, J., and Van Dyke, T.E. (2015). Resolvin E1 (RvE1) Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation in Diet and Inflammation-Induced Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1123-1133.
- Hatley, M.E., Srinivasan, S., Reilly, K.B., Bolick, D.T., and Hedrick, C.C. (2003). Increased production of 12/15 lipoxygenase eicosanoids accelerates monocyte/endothelial interactions in diabetic db/db mice. *J Biol Chem* 278, 25369-25375.
- Hayek, T., Masucci-Magoulas, L., Jiang, X., Walsh, A., Rubin, E., Breslow, J.L., and Tall, A.R. (1995). Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest* 96, 2071-2074.
- Hazell, L.J., and Stocker, R. (1993). Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J* 290 (Pt 1), 165-172.
- Hazell, L.J., van den Berg, J.J., and Stocker, R. (1994). Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. *Biochem J* 302 (Pt 1), 297-304.
- Hazen, S.L., and Heinecke, J.W. (1997). 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99, 2075-2081.
- He, C., and Carter, A.B. (2015). The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization. *J Clin Cell Immunol* 6.
- Hecker, M., Sessa, W.C., Harris, H.J., Anggard, E.E., and Vane, J.R. (1990). The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8612-8616.
- Heine, G.H., Ortiz, A., Massy, Z.A., Lindholm, B., Wiecek, A., Martinez-Castelao, A., Covic, A., Goldsmith, D., Suleymanlar, G., London, G.M., *et al.* (2012). Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nature reviews Nephrology* 8, 362-369.
- Heinecke, J.W. (1997). Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 8, 268-274.
- Heinecke, J.W. (2003). Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91, 12A-16A.

- Heinecke, J.W., Kawamura, M., Suzuki, L., and Chait, A. (1993). Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res* 34, 2051-2061.
- Heinecke, J.W., Rosen, H., and Chait, A. (1984). Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 74, 1890-1894.
- Heo, K.S., Cushman, H.J., Akaike, M., Woo, C.H., Wang, X., Qiu, X., Fujiwara, K., and Abe, J. (2014). ERK5 activation in macrophages promotes efferocytosis and inhibits atherosclerosis. *Circulation* 130, 180-191.
- Herova, M., Schmid, M., Gemperle, C., and Hersberger, M. (2015). ChemR23, the receptor for chemerin and resolvin E1, is expressed and functional on M1 but not on M2 macrophages. *J Immunol* 194, 2330-2337.
- Hersberger, M., and von Eckardstein, A. (2003). Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs* 63, 1907-1945.
- Herz, J. (2001). Deconstructing the LDL receptor--a rhapsody in pieces. *Nature structural biology* 8, 476-478.
- Herzog, C.A., Ma, J.Z., and Collins, A.J. (1998). Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *The New England journal of medicine* 339, 799-805.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J., and Wynn, T.A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167, 6533-6544.
- Hevonoja, T., Pentikainen, M.O., Hyvonen, M.T., Kovanen, P.T., and Ala-Korpela, M. (2000). Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 1488, 189-210.
- Hewing, B., Parathath, S., Barrett, T., Chung, W.K., Astudillo, Y.M., Hamada, T., Ramkhelawon, B., Tallant, T.C., Yusufshaq, M.S., Didonato, J.A., *et al.* (2014). Effects of native and myeloperoxidase-modified apolipoprotein a-I on reverse cholesterol transport and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 779-789.
- Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., and Rachlin, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157, 87-94.
- Hiemstra, P.S. (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society transactions* 30, 116-120.
- Higashi, N., Fujioka, K., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S., Nagai, S., Sato, T., Fujita, Y., Morikawa, A., Tsuiji, M., Miyata-Takeuchi, M., *et al.* (2002). The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *J Biol Chem* 277, 20686-20693.
- Hilgendorf, I., and Swirski, F.K. (2012). Making a difference: monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 14, 450-459.

- Hille, R., and Massey, V. (1981). Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J Biol Chem* 256, 9090-9095.
- Hille, R., and Nishino, T. (1995). Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 9, 995-1003.
- Hirose, K., Iwabuchi, K., Shimada, K., Kiyonagi, T., Iwahara, C., Nakayama, H., and Daida, H. (2011). Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages. *Lipids Health Dis* 10, 1.
- Hobbs, H.H., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human mutation* 1, 445-466.
- Hoekstra, M., and Van Eck, M. (2015). Mouse models of disturbed HDL metabolism. *Handbook of experimental pharmacology* 224, 301-336.
- Hohler, B., Holzapfel, B., and Kummer, W. (2000). NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochemistry and cell biology* 114, 29-37.
- Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., *et al.* (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409, 202-207.
- Holness, C.L., and Simmons, D.L. (1993). Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81, 1607-1613.
- Holvoet, P., De Keyzer, D., and Jacobs, D.R., Jr. (2008). Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol* 3, 637-649.
- Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., Bogaerts, K., Beyens, G., Verhaeghe, R., Collen, D., Muls, E., and Van de Werf, F. (2001). Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 844-848.
- Holzer, M., Gauster, M., Pfeifer, T., Wadsack, C., Fauler, G., Stiegler, P., Koefeler, H., Beubler, E., Schuligoi, R., Heinemann, A., *et al.* (2011). Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid Redox Signal* 14, 2337-2346.
- Hopkins, P.N., Toth, P.P., Ballantyne, C.M., Rader, D.J., and National Lipid Association Expert Panel on Familial, H. (2011). Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of clinical lipidology* 5, S9-17.
- Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2007). Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends in biochemical sciences* 32, 71-77.
- Hou, M., Moller, S., Edvinsson, L., and Erlinge, D. (2000). Cytokines induce upregulation of vascular P2Y(2) receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2064-2069.
- Howell, K.W., Meng, X., Fullerton, D.A., Jin, C., Reece, T.B., and Cleveland, J.C., Jr. (2011). Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells. *The Journal of surgical research* 171, e27-31.

- Hsu, H.Y., Nicholson, A.C., and Hajjar, D.P. (1996). Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J Biol Chem* *271*, 7767-7773.
- Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D., and Glass, C.K. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* *400*, 378-382.
- Huang, W.C., Sala-Newby, G.B., Susana, A., Johnson, J.L., and Newby, A.C. (2012). Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. *PLoS One* *7*, e42507.
- Huby, T., Doucet, C., Dachet, C., Ouzilleau, B., Ueda, Y., Afzal, V., Rubin, E., Chapman, M.J., and Lesnik, P. (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest* *116*, 2767-2776.
- Hume, D.A., and MacDonald, K.P. (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* *119*, 1810-1820.
- Hume, D.A., Summers, K.M., Raza, S., Baillie, J.K., and Freeman, T.C. (2010). Functional clustering and lineage markers: insights into cellular differentiation and gene function from large-scale microarray studies of purified primary cell populations. *Genomics* *95*, 328-338.
- Huo, Y., Hafezi-Moghadam, A., and Ley, K. (2000). Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res* *87*, 153-159.
- Hussain, M.M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Current opinion in lipidology* *25*, 200-206.
- Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* *14*, 81-93.
- Huynh, K.K., Eskelinen, E.L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO journal* *26*, 313-324.
- Ikonen, E. (2006). Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiological reviews* *86*, 1237-1261.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews Molecular cell biology* *9*, 125-138.
- Imai, Y., Akimoto, Y., Mizuochi, S., Kimura, T., Hirano, H., and Irimura, T. (1995). Restricted expression of galactose/N-acetylgalactosamine-specific macrophage C-type lectin to connective tissue and to metastatic lesions in mouse lung. *Immunology* *86*, 591-598.
- Infantino, V., Convertini, P., Cucci, L., Panaro, M.A., Di Noia, M.A., Calvello, R., Palmieri, F., and Iacobazzi, V. (2011). The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem J* *438*, 433-436.
- Irvine, K.M., Andrews, M.R., Fernandez-Rojo, M.A., Schroder, K., Burns, C.J., Su, S., Wilks, A.F., Parton, R.G., Hume, D.A., and Sweet, M.J. (2009). Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J Leukoc Biol* *85*, 278-288.

- Isa, S.A., Ruffino, J.S., Ahluwalia, M., Thomas, A.W., Morris, K., and Webb, R. (2011). M2 macrophages exhibit higher sensitivity to oxLDL-induced lipotoxicity than other monocyte/macrophage subtypes. *Lipids Health Dis* 10, 229.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., and Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92, 883-893.
- Ishibashi, S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Herz, J., and Burns, D.K. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93, 1885-1893.
- Ishikawa, K., Navab, M., Leitinger, N., Fogelman, A.M., and Lusis, A.J. (1997). Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest* 100, 1209-1216.
- Ishikawa, K., Sugawara, D., Goto, J., Watanabe, Y., Kawamura, K., Shiomi, M., Itabe, H., and Maruyama, Y. (2001a). Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 104, 1831-1836.
- Ishikawa, K., Sugawara, D., Wang, X., Suzuki, K., Itabe, H., Maruyama, Y., and Lusis, A.J. (2001b). Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice. *Circ Res* 88, 506-512.
- Itabe, H. (2003). Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* 26, 1-9.
- Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology* 5, 514.
- Italiani, P., Mazza, E.M., Lucchesi, D., Cifola, I., Gemelli, C., Grande, A., Battaglia, C., Biccato, S., and Boraschi, D. (2014). Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PLoS One* 9, e87680.
- Ito, A., Shimokawa, H., Meno, H., and Inou, T. (2004). Possible involvement of macrophage-colony stimulating factor in the pathogenesis of cardiac dysfunction in hemodialysis patients. *Jpn Heart J* 45, 497-503.
- Ivashkiv, L.B. (2013). Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol* 34, 216-223.
- Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado Jde, D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., and Guerau-de-Arellano, M. (2015). Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* 10, e0145342.
- Jacobson, K.A., Ivanov, A.A., de Castro, S., Harden, T.K., and Ko, H. (2009). Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors. *Purinergic signalling* 5, 75-89.
- Jacobson, T.A. (2013). Lipoprotein(a), cardiovascular disease, and contemporary management. *Mayo Clin Proc* 88, 1294-1311.
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular immunology* 281, 51-61.

- Jairam, V., Uchida, K., and Narayanaswami, V. (2012). Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation (InTechOpen).
- Jaqaman, K., Kuwata, H., Touret, N., Collins, R., Trimble, W.S., Danuser, G., and Grinstein, S. (2011). Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function. *Cell* 146, 593-606.
- Jaumouille, V., Farkash, Y., Jaqaman, K., Das, R., Lowell, C.A., and Grinstein, S. (2014). Actin cytoskeleton reorganization by Syk regulates Fcγ receptor responsiveness by increasing its lateral mobility and clustering. *Dev Cell* 29, 534-546.
- Jawien, J. (2012). The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Current pharmaceutical biotechnology* 13, 2435-2439.
- Jawien, J., Nastalek, P., and Korbut, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 55, 503-517.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Thomas, G.D., Hewitson, J.P., Duncan, S., Brombacher, F., Maizels, R.M., Hume, D.A., and Allen, J.E. (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J Exp Med* 210, 2477-2491.
- Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8, 1041-1048.
- Jeon, H., and Blacklow, S.C. (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annual review of biochemistry* 74, 535-562.
- Jessup, W. (1993). Cellular modification of low-density lipoproteins. *Biochemical Society transactions* 21, 321-325.
- Jetten, N., Donners, M.M., Wagenaar, A., Cleutjens, J.P., van Rooijen, N., de Winther, M.P., and Post, M.J. (2013). Local delivery of polarized macrophages improves reperfusion recovery in a mouse hind limb ischemia model. *PLoS One* 8, e68811.
- Jha, A.K., Huang, S.C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., *et al.* (2015). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42, 419-430.
- Jiang, X., Yang, Z., Chandrakala, A.N., Pressley, D., and Parthasarathy, S. (2011). Oxidized low density lipoproteins--do we know enough about them? *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 25, 367-377.
- Jin, J., Dasari, V.R., Sistare, F.D., and Kunapuli, S.P. (1998). Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells. *Br J Pharmacol* 123, 789-794.
- Johnson, R.C., Chapman, S.M., Dong, Z.M., Ordovas, J.M., Mayadas, T.N., Herz, J., Hynes, R.O., Schaefer, E.J., and Wagner, D.D. (1997). Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 99, 1037-1043.
- Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9, 213-219.

- Joshi, S., Singh, A.R., Zulcic, M., Bao, L., Messer, K., Ideker, T., Dutkowski, J., and Durden, D.L. (2014). Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo. *PLoS One* 9, e95893.
- Judkins, C.P., Diep, H., Broughton, B.R., Mast, A.E., Hooker, E.U., Miller, A.A., Selemidis, S., Dusting, G.J., Sobey, C.G., and Drummond, G.R. (2010). Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298, H24-32.
- Junger, W.G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11, 201-212.
- Jungi, T.W., Brcic, M., Eperon, S., and Albrecht, S. (1994). Transforming growth factor-beta and interleukin-10, but not interleukin-4, down-regulate procoagulant activity and tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Thrombosis research* 76, 463-474.
- Kadl, A., Meher, A.K., Sharma, P.R., Lee, M.Y., Doran, A.C., Johnstone, S.R., Elliott, M.R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., *et al.* (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 107, 737-746.
- Kalra, A., Rehman, H., Khera, S., Thyagarajan, B., Bhatt, D.L., Kleiman, N.S., and Yeh, R.W. (2017). New-Generation Coronary Stents: Current Data and Future Directions. *Curr Atheroscler Rep* 19, 14.
- Kane, J.P., Hardman, D.A., and Paulus, H.E. (1980). Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2465-2469.
- Kang, J.W., and Lee, S.M. (2016). Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1861, 1025-1035.
- Kapoor, N., Niu, J., Saad, Y., Kumar, S., Sirakova, T., Becerra, E., Li, X., and Kolattukudy, P.E. (2015). Transcription factors STAT6 and KLF4 implement macrophage polarization via the dual catalytic powers of MCP-1. *J Immunol* 194, 6011-6023.
- Kawagishi, T., Nishizawa, Y., Konishi, T., Kawasaki, K., Emoto, M., Shoji, T., Tabata, T., Inoue, T., and Morii, H. (1995). High-resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney international* 48, 820-826.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7, 131-137.
- Kawamura, A., Baitsch, D., Telgmann, R., Feuerborn, R., Weissen-Plenz, G., Hagedorn, C., Saku, K., Brand-Herrmann, S.M., von Eckardstein, A., Assmann, G., *et al.* (2007). Apolipoprotein E interrupts interleukin-1beta signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1610-1617.
- Kellerman, D.J. (2002). P2Y(2) receptor agonists: a new class of medication targeted at improved mucociliary clearance. *Chest* 121, 201S-205S.
- Kelly, M.E., Clay, M.A., Mistry, M.J., Hsieh-Li, H.M., and Harmony, J.A. (1994). Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cellular immunology* 159, 124-139.

- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 1, 121-131.
- Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A.T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., *et al.* (2010). Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 5, e8852.
- Khanduja, K.L., Kaushik, G., Khanduja, S., Pathak, C.M., Laldinpui, J., and Behera, D. (2011). Corticosteroids affect nitric oxide generation, total free radicals production, and nitric oxide synthase activity in monocytes of asthmatic patients. *Mol Cell Biochem* 346, 31-37.
- Kihara, T., Miyata, Y., Furukawa, M., Noguchi, M., Nishikido, M., Koga, S., and Kanetake, H. (2005). Predictive value of serum macrophage colony-stimulating factor for development of aortic calcification in haemodialysis patients: a 6 year longitudinal study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 20, 1647-1652.
- Kim, J.Y., Kang, S.I., Lee, J.J., Lee, K., Sung, S.R., Erdenebaatar, J., Vanaabaatar, B., Jung, S.C., Park, Y.H., Yoo, H.S., *et al.* (2016). Differential diagnosis of *Brucella abortus* by real-time PCR based on a single-nucleotide polymorphisms. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 78, 557-562.
- Kim, T.W., Febbraio, M., Robinet, P., Dugar, B., Greene, D., Cerny, A., Latz, E., Gilmour, R., Staschke, K., Chisolm, G., *et al.* (2011). The critical role of IL-1 receptor-associated kinase 4-mediated NF-kappaB activation in modified low-density lipoprotein-induced inflammatory gene expression and atherosclerosis. *J Immunol* 186, 2871-2880.
- Kisker, C., Schindelin, H., and Rees, D.C. (1997). Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annual review of biochemistry* 66, 233-267.
- Klebanoff, S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77, 598-625.
- Knutson, K.L., Hmama, Z., Herrera-Velitz, P., Rochford, R., and Reiner, N.E. (1998). Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *J Biol Chem* 273, 645-652.
- Kodama, H., Nose, M., Niida, S., and Yamasaki, A. (1991). Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med* 173, 1291-1294.
- Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318-321.
- Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., Gold, H.K., Yuan, J., Narula, J., Finn, A.V., and Virmani, R. (2001). The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 16, 285-292.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

- Kratzer, A., Giral, H., and Landmesser, U. (2014). High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res* *103*, 350-361.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* *12*, 231-238.
- Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Fredman, G., and Serhan, C.N. (2012). Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *Am J Pathol* *180*, 2018-2027.
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* *409*, 198-201.
- Kubo, T., Imanishi, T., Takarada, S., Kuroi, A., Ueno, S., Yamano, T., Tanimoto, T., Matsuo, Y., Masho, T., Kitabata, H., *et al.* (2007). Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* *50*, 933-939.
- Kuhn, H., Banthiya, S., and van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta* *1851*, 308-330.
- Kuhn, H., Romisch, I., and Belkner, J. (2005). The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Molecular nutrition & food research* *49*, 1014-1029.
- Kuhn, H., and Thiele, B.J. (1999). The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* *449*, 7-11.
- Kuhn, H., Thiele, B.J., Ostareck-Lederer, A., Stender, H., Suzuki, H., Yoshimoto, T., and Yamamoto, S. (1993). Bacterial expression, purification and partial characterization of recombinant rabbit reticulocyte 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* *1168*, 73-78.
- Kumagai, Y., and Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *The Journal of allergy and clinical immunology* *125*, 985-992.
- Kunapuli, S.P., and Daniel, J.L. (1998). P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* *336 (Pt 3)*, 513-523.
- Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and 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.
- Kunnas, T., Maatta, K., and Nikkari, S.T. (2016). Genetic Polymorphisms of Transcription Factor NRF2 and of its Host Gene Sulfiredoxin (SRXN1) are Associated with Cerebrovascular Disease in a Finnish Cohort, the TAMRISK Study. *International journal of medical sciences* *13*, 325-329.
- Kutter, D., Devaquet, P., Vanderstocken, G., Paulus, J.M., Marchal, V., and Gothot, A. (2000). Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta haematologica* *104*, 10-15.
- Kwan, B.C., Kronenberg, F., Beddhu, S., and Cheung, A.K. (2007). Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* *18*, 1246-1261.

- Kwon, N.S., Stuehr, D.J., and Nathan, C.F. (1991). Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 174, 761-767.
- Kzhyshkowska, J., Workman, G., Cardo-Vila, M., Arap, W., Pasqualini, R., Gratchev, A., Krusell, L., Goerdt, S., and Sage, E.H. (2006). Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC. *J Immunol* 176, 5825-5832.
- Labonte, A.C., Tosello-Tramont, A.C., and Hahn, Y.S. (2014). The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Molecules and cells* 37, 275-285.
- Lacraz, S., Nicod, L.P., Chicheportiche, R., Welgus, H.G., and Dayer, J.M. (1995). IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 96, 2304-2310.
- Lafont, A. (2003). Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart* 89, 1262-1267.
- Lagace, T.A. (2014). PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Current opinion in lipidology* 25, 387-393.
- Lagrost, L., Masson, D., and Chapman, J. (2005). Lipoprotéines et métabolisme lipidique.
- Land, W.G. (2012). Emerging role of innate immunity in organ transplantation part II: potential of damage-associated molecular patterns to generate immunostimulatory dendritic cells. *Transplantation reviews* 26, 73-87.
- Land, W.G., Agostinis, P., Gasser, S., Garg, A.D., and Linkermann, A. (2016). Transplantation and Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.
- Landsman, L., Varol, C., and Jung, S. (2007). Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178, 2000-2007.
- Lau, D., and Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & therapeutics* 111, 16-26.
- Laugerette, F., Vors, C., Geloën, A., Chauvin, M.A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., Peretti, N., Alligier, M., Burcelin, R., Laville, M., *et al.* (2011). Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J Nutr Biochem* 22, 53-59.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11, 750-761.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2, 787-795.
- Lazarowski, E.R., and Harden, T.K. (2015). UDP-Sugars as Extracellular Signaling Molecules: Cellular and Physiologic Consequences of P2Y14 Receptor Activation. *Mol Pharmacol* 88, 151-160.
- Lee, T.S., Yen, H.C., Pan, C.C., and Chau, L.Y. (1999). The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 734-742.

- Lee-Rueckert, M., Escola-Gil, J.C., and Kovanen, P.T. (2016). HDL functionality in reverse cholesterol transport--Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochim Biophys Acta* 1861, 566-583.
- Leeuwenburgh, C., Hardy, M.M., Hazen, S.L., Wagner, P., Oh-ishi, S., Steinbrecher, U.P., and Heinecke, J.W. (1997a). Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* 272, 1433-1436.
- Leeuwenburgh, C., Rasmussen, J.E., Hsu, F.F., Mueller, D.M., Pennathur, S., and Heinecke, J.W. (1997b). Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem* 272, 3520-3526.
- Lefevre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olgagnier, D., Authier, H., Duval, C., Dardenne, C., Bernad, J., Lemesre, J.L., *et al.* (2013). The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 38, 1038-1049.
- Leitinger, N., and Schulman, I.G. (2013). Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1120-1126.
- Leiva, A., Verdejo, H., Benitez, M.L., Martinez, A., Busso, D., and Rigotti, A. (2011). Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 217, 299-307.
- Leslie, M.S., and Briggs, L.A. (2016). Preeclampsia and the Risk of Future Vascular Disease and Mortality: A Review. *Journal of midwifery & women's health* 61, 315-324.
- Lesnik, P., Haskell, C.A., and Charo, I.F. (2003). Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* 111, 333-340.
- Levin, R., Grinstein, S., and Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological reviews* 273, 156-179.
- Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H.M., and Packer, M. (1990). Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *The New England journal of medicine* 323, 236-241.
- Levitan, I., Volkov, S., and Subbaiah, P.V. (2010). Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 13, 39-75.
- Ley, K., Miller, Y.I., and Hedrick, C.C. (2011). Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1506-1516.
- Li, H., Meininger, C.J., Hawker, J.R., Jr., Haynes, T.E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S.K., Morris, S.M., Jr., and Wu, G. (2001a). Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E75-82.
- Li, J.M., and Shah, A.M. (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 287, R1014-1030.
- Li, S., Sun, Y., Liang, C.P., Thorp, E.B., Han, S., Jehle, A.W., Saraswathi, V., Pridgen, B., Kanter, J.E., Li, R., *et al.* (2009). Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet. *Circ Res* 105, 1072-1082.

- Li, Y., Cam, J., and Bu, G. (2001b). Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction. *Mol Neurobiol* 23, 53-67.
- Liao, F., Andalibi, A., deBeer, F.C., Fogelman, A.M., and Lusis, A.J. (1993). Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 91, 2572-2579.
- Liao, X., Sharma, N., Kapadia, F., Zhou, G., Lu, Y., Hong, H., Paruchuri, K., Mahabeleshwar, G.H., Dalmas, E., Venteclef, N., *et al.* (2011). Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest* 121, 2736-2749.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V.Z., and Folco, E. (2010). Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 74, 213-220.
- Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325.
- Liberale, L., Dallegri, F., Montecucco, F., and Carbone, F. (2017). Pathophysiological relevance of macrophage subsets in atherogenesis. *Thromb Haemost* 117, 7-18.
- Lin, S.L., Castano, A.P., Nowlin, B.T., Lupher, M.L., Jr., and Duffield, J.S. (2009). Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J Immunol* 183, 6733-6743.
- Linton, M.F., Babaev, V.R., Gleaves, L.A., and Fazio, S. (1999). A direct role for the macrophage low density lipoprotein receptor in atherosclerotic lesion formation. *J Biol Chem* 274, 19204-19210.
- Linton, M.F., and Fazio, S. (1999). Macrophages, lipoprotein metabolism, and atherosclerosis: insights from murine bone marrow transplantation studies. *Current opinion in lipidology* 10, 97-105.
- Liu, X., Li, J., Peng, X., Lv, B., Wang, P., Zhao, X., and Yu, B. (2016). Geraniin Inhibits LPS-Induced THP-1 Macrophages Switching to M1 Phenotype via SOCS1/NF-kappaB Pathway. *Inflammation* 39, 1421-1433.
- Liu, Y.C., Zou, X.B., Chai, Y.F., and Yao, Y.M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International journal of biological sciences* 10, 520-529.
- Llodra, J., Angeli, V., Liu, J., Trogan, E., Fisher, E.A., and Randolph, G.J. (2004). Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11779-11784.
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*.
- Loboda, A., Jazwa, A., Grochot-Przeczek, A., Rutkowski, A.J., Cisowski, J., Agarwal, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2008). Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10, 1767-1812.

- Locksley, R.M., Nelson, C.S., Fankhauser, J.E., and Klebanoff, S.J. (1987). Loss of granule myeloperoxidase during in vitro culture of human monocytes correlates with decay in antiprotozoa activity. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 36, 541-548.
- Lopes-Virella, M.F., Binzafar, N., Rackley, S., Takei, A., La Via, M., and Virella, G. (1997). The uptake of LDL-IC by human macrophages: predominant involvement of the Fc gamma RI receptor. *Atherosclerosis* 135, 161-170.
- Lopez-Castejon, G., Baroja-Mazo, A., and Pelegrin, P. (2010). Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cell Mol Life Sci*.
- Lorkowski, S., and Cullen, P. (2002). ABCG subfamily of human ATP-binding cassette proteins. *Pure Appl Chem* 74, 2057-2081.
- Lowenstein, C.J. (2006). Beneficial effects of neuronal nitric oxide synthase in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1417-1418.
- Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., Wang, Y., Lee, V.W., Zheng, G., Tan, T.K., *et al.* (2013). Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney international* 84, 745-755.
- Lu, L., McCurdy, S., Huang, S., Zhu, X., Peplowska, K., Tiirikainen, M., Boisvert, W.A., and Garmire, L.X. (2016). Time Series miRNA-mRNA integrated analysis reveals critical miRNAs and targets in macrophage polarization. *Scientific reports* 6, 37446.
- Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Lusis, A.J., Weinreb, A., and Drake, T.A. (1998). Genetics of atherosclerosis. Philadelphia, Lippincott-Raven, 2389-2413.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154, 5071-5079.
- Mackness, G.B. (1977). Cellular immunity and the parasite. *Advances in experimental medicine and biology* 93, 65-73.
- Mackay, F., Loetscher, H., Stueber, D., Gehr, G., and Lesslauer, W. (1993). Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 177, 1277-1286.
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 451, 914-918.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M.F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., *et al.* (1999a). Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85, e17-24.
- Mallat, Z., Heymes, C., Ohan, J., Faggin, E., Leseche, G., and Tedgui, A. (1999b). Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 611-616.
- Malle, E., Furtmuller, P.G., Sattler, W., and Obinger, C. (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol* 152, 838-854.

- Mantovani, A., Garlanda, C., and Locati, M. (2009). Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1419-1423.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344-346.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 37, 14-16.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Marathe, C., Bradley, M.N., Hong, C., Lopez, F., Ruiz de Galarreta, C.M., Tontonoz, P., and Castrillo, A. (2006). The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *J Biol Chem* 281, 32197-32206.
- Marchetti, V., Yanes, O., Aguilar, E., Wang, M., Friedlander, D., Moreno, S., Storm, K., Zhan, M., Naccache, S., Nemerow, G., *et al.* (2011). Differential macrophage polarization promotes tissue remodeling and repair in a model of ischemic retinopathy. *Scientific reports* 1, 76.
- Marengo, B., Bellora, F., Ricciarelli, R., De Ciucis, C., Furfaro, A., Leardi, R., Colla, R., Pacini, D., Traverso, N., Moretta, A., *et al.* (2016). Oxysterol mixture and, in particular, 27-hydroxycholesterol drive M2 polarization of human macrophages. *BioFactors* 42, 80-92.
- Marotti, K.R., Castle, C.K., Boyle, T.P., Lin, A.H., Murray, R.W., and Melchior, G.W. (1993). Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 364, 73-75.
- Marquart, T.J., Allen, R.M., Ory, D.S., and Baldan, A. (2010). miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12228-12232.
- Marschang, P., and Herz, J. (2003). Mouse models as tools for dissecting disorders of lipoprotein metabolism. *Seminars in cell & developmental biology* 14, 25-35.
- Marsche, G., Zimmermann, R., Horiuchi, S., Tandon, N.N., Sattler, W., and Malle, E. (2003). Class B scavenger receptors CD36 and SR-BI are receptors for hypochlorite-modified low density lipoprotein. *J Biol Chem* 278, 47562-47570.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177, 7303-7311.
- Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27, 451-483.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 453-461.
- Martinez-Pomares, L., Linehan, S.A., Taylor, P.R., and Gordon, S. (2001). Binding properties of the mannose receptor. *Immunobiology* 204, 527-535.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27, 229-265.

- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* *440*, 237-241.
- Mashima, R., and Okuyama, T. (2015). The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox biology* *6*, 297-310.
- Maxfield, F.R., and van Meer, G. (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Current opinion in cell biology* *22*, 422-429.
- McMillen, T.S., Heinecke, J.W., and LeBoeuf, R.C. (2005). Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice. *Circulation* *111*, 2798-2804.
- Mege, J.-L. (2010). La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes? *Médecine/Science* *1*, 83-88.
- Mege, J.L., Mehraj, V., and Capo, C. (2011). Macrophage polarization and bacterial infections. *Curr Opin Infect Dis* *24*, 230-234.
- Mehta, J.L., Chen, J., Hermonat, P.L., Romeo, F., and Novelli, G. (2006). Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* *69*, 36-45.
- Melgert, B.N., ten Hacken, N.H., Rutgers, B., Timens, W., Postma, D.S., and Hylkema, M.N. (2011). More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* *127*, 831-833.
- Melo, L.G., Gnechi, M., Pachori, A.S., Kong, D., Wang, K., Liu, X., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (2004). Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *24*, 1761-1774.
- Merched, A.J., Ko, K., Gotlinger, K.H., Serhan, C.N., and Chan, L. (2008). Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J* *22*, 3595-3606.
- Merino, A., Buendia, P., Martin-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R., and Carracedo, J. (2011). Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J Immunol* *186*, 1809-1815.
- Mesmin, B., and Maxfield, F.R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta* *1791*, 636-645.
- Mestas, J., and Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine* *18*, 228-232.
- Metcalf, D., and Nicola, N.A., eds. (1995). *The hemopoietic colony-stimulating factors: from biology to clinical applications.* (Cambridge, U.K.).
- Metchnikoff, E., and (eds. Gourko, H., Wiliamson, D. I. & Tauber, A. I.), eds. (2000). *The Evolutionary Biology Papers of Elie Metchnikoff* (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers).
- Meuwese, M.C., Stroes, E.S., Hazen, S.L., van Miert, J.N., Kuivenhoven, J.A., Schaub, R.G., Wareham, N.J., Luben, R., Kastelein, J.J., Khaw, K.T., *et al.* (2007). Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* *50*, 159-165.

- Mezdour, H., Jones, R., Dengremont, C., Castro, G., and Maeda, N. (1997). Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem* 272, 13570-13575.
- Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X.M., Malmstrom, V., and Harris, R.A. (2014). An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scandinavian journal of immunology* 79, 305-314.
- Michelsen, K.S., Wong, M.H., Shah, P.K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T.M., Akira, S., Rajavashisth, T.B., and Arditi, M. (2004). Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10679-10684.
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.K., Mack, M., Heikenwalder, M., Bruck, W., Priller, J., and Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nature neuroscience* 10, 1544-1553.
- Miller, R.A., and Britigan, B.E. (1995). Protease-cleaved iron-transferrin augments oxidant-mediated endothelial cell injury via hydroxyl radical formation. *J Clin Invest* 95, 2491-2500.
- Miller, R.A., Rasmussen, G.T., Cox, C.D., and Britigan, B.E. (1996). Protease cleavage of iron-transferrin augments pyocyanin-mediated endothelial cell injury via promotion of hydroxyl radical formation. *Infect Immun* 64, 182-188.
- Miller, Y.I., Choi, S.H., Fang, L., and Harkewicz, R. (2009). Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends in cardiovascular medicine* 19, 227-232.
- Miller, Y.I., Choi, S.H., Fang, L., and Tsimikas, S. (2010). Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem* 51, 229-251.
- Miller, Y.I., Choi, S.H., Wiesner, P., Fang, L., Harkewicz, R., Hartvigsen, K., Boullier, A., Gonen, A., Diehl, C.J., Que, X., *et al.* (2011). Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res* 108, 235-248.
- Miller, Y.I., and Shyy, J.Y. (2017). Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28, 143-152.
- Miller, Y.I., Viriyakosol, S., Worrall, D.S., Boullier, A., Butler, S., and Witztum, J.L. (2005). Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1213-1219.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166-6173.
- Mills, E., and O'Neill, L.A. (2014). Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol* 24, 313-320.
- Mills, E.L., and O'Neill, L.A. (2016). Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *Eur J Immunol* 46, 13-21.
- Ming, X.F., Rajapakse, A.G., Yepuri, G., Xiong, Y., Carvas, J.M., Ruffieux, J., Scerri, I., Wu, Z., Popp, K., Li, J., *et al.* (2012). Arginase II Promotes Macrophage Inflammatory Responses Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Contributing to Insulin Resistance and Atherogenesis. *Journal of the American Heart Association* 1, e000992.

- Mishra, M., Jiang, H., Wu, L., Chawsheen, H.A., and Wei, Q. (2015). The sulfiredoxin-peroxiredoxin (Srx-Prx) axis in cell signal transduction and cancer development. *Cancer letters* 366, 150-159.
- Miyahara, T., Runge, S., Chatterjee, A., Chen, M., Mottola, G., Fitzgerald, J.M., Serhan, C.N., and Conte, M.S. (2013). D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. *FASEB J* 27, 2220-2232.
- Mizuochi, S., Akimoto, Y., Imai, Y., Hirano, H., and Irimura, T. (1997). Unique tissue distribution of a mouse macrophage C-type lectin. *Glycobiology* 7, 137-146.
- Moguilevsky, N., Zouaoui Boudjeltia, K., Babar, S., Delree, P., Legssyer, I., Carpentier, Y., Vanhaeverbeek, M., and Ducobu, J. (2004). Monoclonal antibodies against LDL progressively oxidized by myeloperoxidase react with ApoB-100 protein moiety and human atherosclerotic lesions. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 1223-1228.
- Mohazzab, K.M., Kaminski, P.M., and Wolin, M.S. (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266, H2568-2572.
- Molina y Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brune, B., Di Silvio, M., Billiar, T.R., and Lapetina, E.G. (1992). Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 267, 24929-24932.
- Moore, K.J., and Freeman, M.W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1702-1711.
- Moore, K.J., Kunjathoor, V.V., Koehn, S.L., Manning, J.J., Tseng, A.A., Silver, J.M., McKee, M., and Freeman, M.W. (2005). Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *J Clin Invest* 115, 2192-2201.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 13, 709-721.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
- Morawietz, H., Duerschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., and Holtz, J. (2002). Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clinical science* 103 Suppl 48, 9S-12S.
- Moreira, A.P., and Hogaboam, C.M. (2011). Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31, 485-491.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73, 209-212.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Mozzini, C., Fratta Pasini, A., Garbin, U., Stranieri, C., Pasini, A., Vallerio, P., and Cominacini, L. (2014). Increased endoplasmic reticulum stress and Nrf2 repression in peripheral blood mononuclear cells of patients with stable coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 68, 178-185.

- Muller, G., and Morawietz, H. (2009). Nitric oxide, NAD(P)H oxidase, and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* *11*, 1711-1731.
- Muller, W.A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* *24*, 327-334.
- Mullick, A.E., Tobias, P.S., and Curtiss, L.K. (2005). Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest* *115*, 3149-3156.
- Murphy, J.E., Tedbury, P.R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J.H., and Ponnambalam, S. (2005). Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* *182*, 1-15.
- Murphy, J.E., Vohra, R.S., Dunn, S., Holloway, Z.G., Monaco, A.P., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J.H., and Ponnambalam, S. (2008). Oxidised LDL internalisation by the LOX-1 scavenger receptor is dependent on a novel cytoplasmic motif and is regulated by dynamin-2. *J Cell Sci* *121*, 2136-2147.
- Murray, P.J. (2016). Macrophage Polarization. *Annual review of physiology*.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., *et al.* (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* *41*, 14-20.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* *89*, 557-563.
- Mylonas, K.J., Nair, M.G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D., and Allen, J.E. (2009). Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J Immunol* *182*, 3084-3094.
- Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* *204*, 3037-3047.
- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* *7*, 663-671.
- Nakagawara, A., Nathan, C.F., and Cohn, Z.A. (1981). Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro. *J Clin Invest* *68*, 1243-1252.
- Nakajima, K., Nagamine, T., Fujita, M.Q., Ai, M., Tanaka, A., and Schaefer, E. (2014). Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Advances in clinical chemistry* *64*, 117-177.
- Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., and Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* *14*, 133-140.
- Namekata, T., Suzuki, K., Ishizuka, N., Nakata, M., and Shirai, K. (2012). Association of cardio-ankle vascular index with cardiovascular disease risk factors and coronary heart disease among Japanese urban workers and their families. *J Clin Exp Cardiol* *S1*, 1-7.

- Napoli, C., Quehenberger, O., De Nigris, F., Abete, P., Glass, C.K., and Palinski, W. (2000). Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J* 14, 1996-2007.
- Nappo, F., Esposito, K., Cioffi, M., Giugliano, G., Molinari, A.M., Paolisso, G., Marfella, R., and Giugliano, D. (2002). Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 39, 1145-1150.
- Natarajan, R., Rosdahl, J., Gonzales, N., and Bai, W. (1997). Regulation of 12-lipoxygenase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 30, 873-879.
- Nathan, C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 111, 769-778.
- Nauseef, W.M. (1987). Posttranslational processing of a human myeloid lysosomal protein, myeloperoxidase. *Blood* 70, 1143-1150.
- Nauseef, W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews* 219, 88-102.
- Nayak, D., Roth, T.L., and McGavern, D.B. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32, 367-402.
- Ndrepepa, G., Braun, S., Mehilli, J., von Beckerath, N., Schomig, A., and Kastrati, A. (2008). Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *European journal of clinical investigation* 38, 90-96.
- Negre-Salvayre, A., Auge, N., Camare, C., Bacchetti, T., Ferretti, G., and Salvayre, R. (2017). Dual signaling evoked by oxidized LDLs in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 106, 118-133.
- Newby, A.C. (2008). Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2108-2114.
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480, 104-108.
- Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3030-3034.
- Nicholas, R.A. (2001). Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol Pharmacol* 60, 416-420.
- Nicholls, S.J., and Hazen, S.L. (2005). Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1102-1111.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K.L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C.W., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., *et al.* (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468, 1119-1123.
- Nikpoor, B., Turecki, G., Fournier, C., Theroux, P., and Rouleau, G.A. (2001). A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *American heart journal* 142, 336-339.

- Nishida, M., Ando, M., Iwamoto, Y., Tsuchiya, K., and Nitta, K. (2016). New Insight into Atherosclerosis in Hemodialysis Patients: Overexpression of Scavenger Receptor and Macrophage Colony-Stimulating Factor Genes. *Nephron Extra* 6, 22-30.
- Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B.T., Pai, E.F., and Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *The FEBS journal* 275, 3278-3289.
- Nitta, K., Akiba, T., Kawashima, A., Kimata, N., Miwa, N., Uchida, K., Honda, K., Takei, T., Otsubo, S., Yumura, W., *et al.* (2001). Serum levels of macrophage colony-stimulating factor and aortic calcification in hemodialysis patients. *American journal of nephrology* 21, 465-470.
- Noel, W., Raes, G., Hassanzadeh Ghassabeh, G., De Baetselier, P., and Beschin, A. (2004). Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in parasitology* 20, 126-133.
- Novoselov, V.V., Sazonova, M.A., Ivanova, E.A., and Orekhov, A.N. (2015). Study of the activated macrophage transcriptome. *Exp Mol Pathol* 99, 575-580.
- O'Neill, L.A. (2011). A critical role for citrate metabolism in LPS signalling. *Biochem J* 438, e5-6.
- Obradovic, M.M., Trpkovic, A., Bajic, V., Soskic, S., Jovanovic, A., Stanimirovic, J., Panic, M., and Isenovic, E.R. (2015). Interrelatedness between C-reactive protein and oxidized low-density lipoprotein. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 53, 29-34.
- Ohara, Y., Peterson, T.E., and Harrison, D.G. (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91, 2546-2551.
- Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology* 72, 219-246.
- Olmes, G., Buttner-Herold, M., Ferrazzi, F., Distel, L., Amann, K., and Daniel, C. (2016). CD163+ M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis. *Arthritis research & therapy* 18, 90.
- Olsson, I., Persson, A.M., and Stromberg, K. (1984). Biosynthesis, transport and processing of myeloperoxidase in the human leukaemic promyelocytic cell line HL-60 and normal marrow cells. *Biochem J* 223, 911-920.
- Oram, J.F., Lawn, R.M., Garvin, M.R., and Wade, D.P. (2000). ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* 275, 34508-34511.
- Oram, J.F., and Vaughan, A.M. (2006). ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* 99, 1031-1043.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Orso, E., Matysik, S., Grandl, M., Liebisch, G., and Schmitz, G. (2015). Human native, enzymatically modified and oxidized low density lipoproteins show different lipidomic pattern. *Biochim Biophys Acta* 1851, 299-306.
- Overton, C.D., Yancey, P.G., Major, A.S., Linton, M.F., and Fazio, S. (2007). Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ Res* 100, 670-677.

- Owhashi, M., Arita, H., and Hayai, N. (2000). Identification of a novel eosinophil chemotactic cytokine (ECF-L) as a chitinase family protein. *J Biol Chem* 275, 1279-1286.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., and Szabo, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological reviews* 58, 87-114.
- Pai, J.K., Kraft, P., Cannuscio, C.C., Manson, J.E., Rexrode, K.M., Albert, C.M., Hunter, D., and Rimm, E.B. (2006). Polymorphisms in the CC-chemokine receptor-2 (CCR2) and -5 (CCR5) genes and risk of coronary heart disease among US women. *Atherosclerosis* 186, 132-139.
- Paigen, B. (1995). Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. *The American journal of clinical nutrition* 62, 458S-462S.
- Paigen, B., Havens, M.B., and Morrow, A. (1985a). Effect of 3-methylcholanthrene on the development of aortic lesions in mice. *Cancer Res* 45, 3850-3855.
- Paigen, B., Holmes, P.A., Mitchell, D., and Albee, D. (1987). Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis* 64, 215-221.
- Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., and Holmes, P. (1985b). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57, 65-73.
- Palinski, W., Ord, V.A., Plump, A.S., Breslow, J.L., Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1994). ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14, 605-616.
- Palsson-McDermott, E.M., and O'Neill, L.A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113, 153-162.
- Panasenko, O.M., Evgina, S.A., Aidyraliev, R.K., Sergienko, V.I., and Vladimirov, Y.A. (1994). Peroxidation of human blood lipoproteins induced by exogenous hypochlorite or hypochlorite generated in the system of "myeloperoxidase + H₂O₂ + Cl⁻". *Free Radic Biol Med* 16, 143-148.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., *et al.* (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458.
- Papanikou, E., Karamanou, S., and Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature reviews Microbiology* 5, 839-851.
- Parks, D.A., and Granger, D.N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* 548, 87-99.
- Parsa, R., Andresen, P., Gillett, A., Mia, S., Zhang, X.M., Mayans, S., Holmberg, D., and Harris, R.A. (2012). Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 61, 2881-2892.
- Parthasarathy, S., Fong, L.G., Quinn, M.T., and Steinberg, D. (1990). Oxidative modification of LDL: comparison between cell-mediated and copper-mediated modification. *European heart journal* 11 *Suppl E*, 83-87.

- Parthasarathy, S., Printz, D.J., Boyd, D., Joy, L., and Steinberg, D. (1986). Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 6, 505-510.
- Parthasarathy, S., Quinn, M.T., Schwenke, D.C., Carew, T.E., and Steinberg, D. (1989). Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 9, 398-404.
- Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M.O., and Santanam, N. (2010). Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol* 610, 403-417.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534.
- Pasterkamp, G., Schoneveld, A.H., van der Wal, A.C., Hijnen, D.J., van Wolveren, W.J., Plomp, S., Teepen, H.L., and Borst, C. (1999). Inflammation of the atherosclerotic cap and shoulder of the plaque is a common and locally observed feature in unruptured plaques of femoral and coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 54-58.
- Paszty, C., Maeda, N., Verstuyft, J., and Rubin, E.M. (1994). Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 94, 899-903.
- Patetsios, P., Song, M., Shutze, W.P., Pappas, C., Rodino, W., Ramirez, J.A., and Panetta, T.F. (2001). Identification of uric acid and xanthine oxidase in atherosclerotic plaque. *Am J Cardiol* 88, 188-191, A186.
- Pechlaner, R., Willeit, P., Summerer, M., Santer, P., Egger, G., Kronenberg, F., Demetz, E., Weiss, G., Tsimikas, S., Witztum, J.L., *et al.* (2015). Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with progressive atherosclerosis and incident cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 229-236.
- Pecoits-Filho, R., Stenvinkel, P., Marchlewska, A., Heimbürger, O., Barany, P., Hoff, C.M., Holmes, C.J., Suliman, M., Lindholm, B., Schalling, M., *et al.* (2003). A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney international Supplement*, S172-176.
- Peled, M., and Fisher, E.A. (2014). Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. *Frontiers in immunology* 5, 579.
- Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008). P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* 180, 7147-7157.
- Pello, O.M., De Pizzol, M., Mirolo, M., Soucek, L., Zammataro, L., Amabile, A., Doni, A., Nebuloni, M., Swigart, L.B., Evan, G.I., *et al.* (2012). Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* 119, 411-421.
- Pello, O.M., Silvestre, C., De Pizzol, M., and Andres, V. (2011). A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 216, 1172-1176.
- Pepine, C.J. (2001). Why vascular biology matters. *Am J Cardiol* 88, 5K-9K.

- Pesce, J.T., Ramalingam, T.R., Mentink-Kane, M.M., Wilson, M.S., El Kasmi, K.C., Smith, A.M., Thompson, R.W., Cheever, A.W., Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2009). Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 5, e1000371.
- Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hageman, J.R., Oliver, P.M., and Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4471-4475.
- Pireaux, V., Sauvage, A., Bihin, B., Van Steenbrugge, M., Rousseau, A., Van Antwerpen, P., Zouaoui Boudjeltia, K., and Raes, M. (2016). Myeloperoxidase-oxidized LDLs enhance an antiinflammatory M2 and antioxidant phenotype in murine macrophages. *Mediators of inflammation* 2016, 20.
- Pluddemann, A., Neyen, C., and Gordon, S. (2007). Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43, 207-217.
- Plump, A.S., and Breslow, J.L. (1995). Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annual review of nutrition* 15, 495-518.
- Plump, A.S., Scott, C.J., and Breslow, J.L. (1994). Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9607-9611.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.
- Podrez, E.A., Abu-Soud, H.M., and Hazen, S.L. (2000a). Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 28, 1717-1725.
- Podrez, E.A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R.L., Hajjar, D.P., Cohen, P.A., Frazier, W.A., Hoff, H.F., and Hazen, S.L. (2000b). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 105, 1095-1108.
- Podrez, E.A., Hoppe, G., O'Neil, J., and Hoff, H.F. (2003). Phospholipids in oxidized LDL not adducted to apoB are recognized by the CD36 scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* 34, 356-364.
- Podrez, E.A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P.J., Shan, L., Febbraio, M., Hajjar, D.P., *et al.* (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, E.A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P.J., Shan, L., Gugiu, B., Fox, P.L., *et al.* (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.
- Poeckel, D., Zemski Berry, K.A., Murphy, R.C., and Funk, C.D. (2009). Dual 12/15- and 5-lipoxygenase deficiency in macrophages alters arachidonic acid metabolism and attenuates peritonitis and atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Biol Chem* 284, 21077-21089.
- Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 259-270.

- Pope, N.H., Salmon, M., Davis, J.P., Chatterjee, A., Su, G., Conte, M.S., Ailawadi, G., and Upchurch, G.R., Jr. (2016). D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization. *FASEB J* 30, 4192-4201.
- Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A.C., Leone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D., and Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 142, 481-489.
- Potteaux, S., Ait-Oufella, H., and Mallat, Z. (2007). Mouse models of atherosclerosis. *Drug discovery today* 4, 165-170.
- Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R.J., Edwards, Y.H., Knott, T.J., and Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.
- Powell-Braxton, L., Veniant, M., Latvala, R.D., Hirano, K.I., Won, W.B., Ross, J., Dybdal, N., Zlot, C.H., Young, S.G., and Davidson, N.O. (1998). A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nat Med* 4, 934-938.
- Qiao, J.H., Xie, P.Z., Fishbein, M.C., Kreuzer, J., Drake, T.A., Demer, L.L., and Lusis, A.J. (1994). Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14, 1480-1497.
- Rader, D.J., and Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451, 904-913.
- Raes, G., Brys, L., Dahal, B.K., Brandt, J., Grooten, J., Brombacher, F., Vanham, G., Noel, W., Bogaert, P., Boonefaes, T., *et al.* (2005a). Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 77, 321-327.
- Raes, G., Van den Bergh, R., De Baetselier, P., Ghassabeh, G.H., Scotton, C., Locati, M., Mantovani, A., and Sozzani, S. (2005b). Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol* 174, 6561; author reply 6561-6562.
- Rahim, A., Nafi-valencia, E., Siddiqi, S., Basha, R., Runyon, C.C., and Siddiqi, S.A. (2012). Proteomic analysis of the very low density lipoprotein (VLDL) transport vesicles. *Journal of proteomics* 75, 2225-2235.
- Rajavashisth, T.B., Xu, X.P., Jovinge, S., Meisel, S., Xu, X.O., Chai, N.N., Fishbein, M.C., Kaul, S., Cercek, B., Sharifi, B., *et al.* (1999). Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* 99, 3103-3109.
- Ramasamy, I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 52, 1695-1727.
- Randolph, G.J. (2014). Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res* 114, 1757-1771.
- Randolph, G.J., Jakubzick, C., and Qu, C. (2008). Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Current opinion in immunology* 20, 52-60.

- Reddick, R.L., Zhang, S.H., and Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14, 141-147.
- Reilly, K.B., Srinivasan, S., Hatley, M.E., Patricia, M.K., Lannigan, J., Bolick, D.T., Vandenhoff, G., Pei, H., Natarajan, R., Nadler, J.L., *et al.* (2004). 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem* 279, 9440-9450.
- Rekhter, M., Staschke, K., Estridge, T., Rutherford, P., Jackson, N., Gifford-Moore, D., Foxworthy, P., Reidy, C., Huang, X.D., Kalbfleisch, M., *et al.* (2008). Genetic ablation of IRAK4 kinase activity inhibits vascular lesion formation. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 642-648.
- Remaley, A.T., Norata, G.D., and Catapano, A.L. (2014). Novel concepts in HDL pharmacology. *Cardiovasc Res* 103, 423-428.
- Ricciardolo, F.L., Sterk, P.J., Gaston, B., and Folkerts, G. (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological reviews* 84, 731-765.
- Ricote, M., and Glass, C.K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771, 926-935.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.
- Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P., and Hennekens, C.H. (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *The New England journal of medicine* 336, 973-979.
- Ridker, P.M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., and Braunwald, E. (2000). Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 101, 2149-2153.
- Riegel, A.K., Faigle, M., Zug, S., Rosenberger, P., Robaye, B., Boeynaems, J.M., Idzko, M., and Eltzschig, H.K. (2011). Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation. *Blood* 117, 2548-2555.
- Rieger, M.A., and Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Rigotti, A., Acton, S.L., and Krieger, M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270, 16221-16224.
- Robbins, C.S., Hilgendorf, I., Weber, G.F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J.L., Gorbатов, R., Sukhova, G.K., Gerhardt, L.M., Smyth, D., *et al.* (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 19, 1166-1172.
- Roberts, A., and Thompson, J.S. (1976). Inbred mice and their hypbrids as an animal model for atherosclerosis research. *Advances in experimental medicine and biology* 67, 313-327.
- Roberts, R.L., Barbieri, M.A., Ullrich, J., and Stahl, P.D. (2000). Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *J Leukoc Biol* 68, 627-632.
- Rogacev, K.S., Cremers, B., Zawada, A.M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Grosse-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., *et al.* (2012). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict

- cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* *60*, 1512-1520.
- Rogacev, K.S., Zawada, A.M., Emrich, I., Seiler, S., Bohm, M., Fliser, D., Woollard, K.J., and Heine, G.H. (2014). Lower Apo A-I and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *34*, 2120-2127.
- Rogacev, K.S., Zawada, A.M., Hundsdorfer, J., Achenbach, M., Held, G., Fliser, D., and Heine, G.H. (2015). Immunosuppression and monocyte subsets. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *30*, 143-153.
- Roselaar, S.E., Kakkanathu, P.X., and Daugherty, A. (1996). Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE ^{-/-} and LDL receptor ^{-/-} mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *16*, 1013-1018.
- Rosen, H., Klebanoff, S.J., Wang, Y., Brot, N., Heinecke, J.W., and Fu, X. (2009). Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 18686-18691.
- Rosenfeld, M.E., Polinsky, P., Virmani, R., Kauser, K., Rubanyi, G., and Schwartz, S.M. (2000). Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *20*, 2587-2592.
- Rosol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., and Wagner, U. (2012). The CD14(bright) CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and rheumatism* *64*, 671-677.
- Roszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of inflammation* *2015*, 816460.
- Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (2010). High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Current opinion in lipidology* *21*, 229-238.
- Rothe, G., Gabriel, H., Kovacs, E., Klucken, J., Stohr, J., Kindermann, W., and Schmitz, G. (1996). Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *16*, 1437-1447.
- Rothe, G., Herr, A.S., Stohr, J., Abletshaus, C., Weidinger, G., and Schmitz, G. (1999). A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* *144*, 251-261.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* *364*, 798-802.
- Routledge, M.N., Mirsky, F.J., Wink, D.A., Keefer, L.K., and Dipple, A. (1994). Nitrite-induced mutations in a forward mutation assay: influence of nitrite concentration and pH. *Mutation research* *322*, 341-346.
- Rubartelli, A., and Lotze, M.T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* *28*, 429-436.

- Rueckschloss, U., Duerrschmidt, N., and Morawietz, H. (2003). NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 5, 171-180.
- Russell, D.W. (1992). Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 6, 103-110.
- Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J.N., Wynn, T.A., and Murray, P.J. (2001). Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 166, 2173-2177.
- Ryoo, S.W., Kim, D.U., Won, M., Chung, K.S., Jang, Y.J., Oh, G.T., Park, S.K., Maeng, P.J., Yoo, H.S., and Hoe, K.L. (2004). Native LDL induces interleukin-8 expression via H₂O₂, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 62, 185-193.
- Sabbah, A., Chang, T.H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P.H., Xiang, Y., and Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol* 10, 1073-1080.
- Saito, T., Hasegawa-Moriyama, M., Kurimoto, T., Yamada, T., Inada, E., and Kanmura, Y. (2015). Resolution of Inflammation by Resolvin D1 Is Essential for Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma-mediated Analgesia during Postincisional Pain Development in Type 2 Diabetes. *Anesthesiology* 123, 1420-1434.
- Salvemini, D., Radziszewski, W., Mollace, V., Moore, A., Willoughby, D., and Vane, J. (1991). Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation. *European journal of pharmacology* 199, 15-18.
- Sanan, D.A., Newland, D.L., Tao, R., Marcovina, S., Wang, J., Mooser, V., Hammer, R.E., and Hobbs, H.H. (1998). Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4544-4549.
- Sanders, S.A., Eisenthal, R., and Harrison, R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *European journal of biochemistry / FEBS* 245, 541-548.
- Sanz, J., and Fayad, Z.A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451, 953-957.
- Sarnak, M.J., and Levey, A.S. (2000). Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 35, S117-131.
- Sarnak, M.J., Levey, A.S., Schoolwerth, A.C., Coresh, J., Culleton, B., Hamm, L.L., McCullough, P.A., Kasiske, B.L., Kelepouris, E., Klag, M.J., *et al.* (2003). Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108, 2154-2169.
- Sartipy, P., Camejo, G., Svensson, L., and Hurt-Camejo, E. (1999). Phospholipase A₂ modification of low density lipoproteins forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 274, 25913-25920.
- Sathyamoorthy, M., de Mendez, I., Adams, A.G., and Leto, T.L. (1997). p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 272, 9141-9146.

- Sato, M., Kawakami, K., Osawa, T., and Toyoshima, S. (1992). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin on mouse tumoricidal macrophages. *J Biochem* *111*, 331-336.
- Savage, T., Clarke, A.L., Giles, M., Tomson, C.R., and Raine, A.E. (1998). Calcified plaque is common in the carotid and femoral arteries of dialysis patients without clinical vascular disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *13*, 2004-2012.
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T., *et al.* (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* *386*, 73-77.
- Sawyer, R.T., Strausbauch, P.H., and Volkman, A. (1982). Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *46*, 165-170.
- Schaer, D.J., Boretti, F.S., Hongegger, A., Poehler, D., Linnscheid, P., Staeger, H., Muller, C., Schoedon, G., and Schaffner, A. (2001). Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics* *53*, 170-177.
- Schif-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C.N., and Ariel, A. (2011). Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol* *41*, 366-379.
- Schindhelm, R.K., van der Zwan, L.P., Teerlink, T., and Scheffer, P.G. (2009). Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clinical chemistry* *55*, 1462-1470.
- Schnoor, M., Cullen, P., Lorkowski, J., Stolle, K., Robenek, H., Troyer, D., Rauterberg, J., and Lorkowski, S. (2008). Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol* *180*, 5707-5719.
- Schroepfer, G.J., Jr. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological reviews* *80*, 361-554.
- Schuett, H., Luchtefeld, M., Grothusen, C., Grote, K., and Schieffer, B. (2009). How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* *102*, 215-222.
- Segal, A.W., and Jones, O.T. (1980). Rapid incorporation of the human neutrophil plasma membrane cytochrome b into phagocytic vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun* *92*, 710-715.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* *7*, 311-317.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* *19*, 59-70.
- Serhan, C.N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* *510*, 92-101.
- Sevanian, A., and Asatryan, L. (2002). LDL modification during hemodialysis. Markers for oxidative stress. *Contributions to nephrology*, 386-395.

- Seye, C.I., Yu, N., Jain, R., Kong, Q., Minor, T., Newton, J., Erb, L., Gonzalez, F.A., and Weisman, G.A. (2003). The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 278, 24960-24965.
- Shafritz, D.A. (2007). A human hepatocyte factory. *Nature biotechnology* 25, 871-872.
- Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., Montoro-Garcia, S., Drayson, M.T., and Lip, G.Y. (2011). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9, 1056-1066.
- Sharma, N., Lu, Y., Zhou, G., Liao, X., Kapil, P., Anand, P., Mahabeleshwar, G.H., Stamler, J.S., and Jain, M.K. (2012). Myeloid Kruppel-like factor 4 deficiency augments atherogenesis in ApoE^{-/-} mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2836-2838.
- Shen, J., Herderick, E., Cornhill, J.F., Zsigmond, E., Kim, H.S., Kuhn, H., Guevara, N.V., and Chan, L. (1996). Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *J Clin Invest* 98, 2201-2208.
- Shi, W., Wang, N.J., Shih, D.M., Sun, V.Z., Wang, X., and Lusis, A.J. (2000). Determinants of atherosclerosis susceptibility in the C3H and C57BL/6 mouse model: evidence for involvement of endothelial cells but not blood cells or cholesterol metabolism. *Circ Res* 86, 1078-1084.
- Shimokawa, H., and Tsutsui, M. (2010). Nitric oxide synthases in the pathogenesis of cardiovascular disease: lessons from genetically modified mice. *Pflugers Arch* 459, 959-967.
- Shulman, N.B., Ford, C.E., Hall, W.D., Blaurock, M.D., Simon, D., Langford, H.G., and Schneider, K.A. (1989). Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. *Hypertension* 13, 180-93.
- Shyy, Y.J., Wickham, L.L., Hagan, J.P., Hsieh, H.J., Hu, Y.L., Telian, S.H., Valente, A.J., Sung, K.L., and Chien, S. (1993). Human monocyte colony-stimulating factor stimulates the gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 and increases the adhesion of monocytes to endothelial monolayers. *J Clin Invest* 92, 1745-1751.
- Sica, A., Erreni, M., Allavena, P., and Porta, C. (2015). Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci* 72, 4111-4126.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in cancer biology* 18, 349-355.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787-795.
- Siddiqi, S., Mani, A.M., and Siddiqi, S.A. (2010). The identification of the SNARE complex required for the fusion of VLDL-transport vesicle with hepatic cis-Golgi. *Biochem J* 429, 391-401.
- Siddiqi, S.A., Gorelick, F.S., Mahan, J.T., and Mansbach, C.M., 2nd (2003). COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 116, 415-427.

- Siddiqi, S.A., Siddiqi, S., Mahan, J., Peggs, K., Gorelick, F.S., and Mansbach, C.M., 2nd (2006). The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J Biol Chem* 281, 20974-20982.
- Sieweke, M.H., and Allen, J.E. (2013). Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342, 1242974.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., and Pryjma, J. (2008). Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian journal of immunology* 67, 152-159.
- Smith, J.D., and Breslow, J.L. (1997). The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med* 242, 99-109.
- Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., and Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8264-8268.
- Smith, R.C., and Reed, V.D. (1992). Inhibition by thiols of copper(II)-induced oxidation of oxyhemoglobin. *Chem Biol Interact* 82, 209-217.
- Soran, H., and Durrington, P.N. (2011). Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation. *Current opinion in lipidology* 22, 254-261.
- Spickett, C.M., Jerlich, A., Panasenko, O.M., Arnhold, J., Pitt, A.R., Stelmaszynska, T., and Schaur, R.J. (2000). The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta biochimica Polonica* 47, 889-899.
- Spiller, K.L., Wrona, E.A., Romero-Torres, S., Pallotta, I., Graney, P.L., Witherel, C.E., Panicker, L.M., Feldman, R.A., Urbanska, A.M., Santambrogio, L., *et al.* (2015). Differential Gene Expression in Human, Murine, and Cell Line-derived Macrophages upon Polarization. *Exp Cell Res*.
- Stachon, P., Geis, S., Peikert, A., Heidenreich, A., Michel, N.A., Unal, F., Hoppe, N., Dufner, B., Schulte, L., Marchini, T., *et al.* (2016). Extracellular ATP Induces Vascular Inflammation and Atherosclerosis via Purinergic Receptor Y2 in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36, 1577-1586.
- Stachon, P., Peikert, A., Michel, N.A., Hergeth, S., Marchini, T., Wolf, D., Dufner, B., Hoppe, N., Ayata, C.K., Grimm, M., *et al.* (2014). P2Y6 deficiency limits vascular inflammation and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 2237-2245.
- Stanley, E.R., Berg, K.L., Einstein, D.B., Lee, P.S., Pixley, F.J., Wang, Y., and Yeung, Y.G. (1997). Biology and action of colony--stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev* 46, 4-10.
- Steidl, C., Lee, T., Shah, S.P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S.J., Iqbal, J., Weisenburger, D.D., *et al.* (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine* 362, 875-885.
- Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res* 50 Suppl, S376-381.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England journal of medicine* 320, 915-924.

- Stenvinkel, P., Heimbürger, O., Paultre, F., Diczfalusy, U., Wang, T., Berglund, L., and Jogestrand, T. (1999). Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney international* 55, 1899-1911.
- Stephen, S.L., Freestone, K., Dunn, S., Twigg, M.W., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J.H., Wheatcroft, S.B., and Ponnambalam, S. (2010). Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *International journal of hypertension* 2010, 646929.
- Stocker, R., and Keaney, J.F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews* 84, 1381-1478.
- Stoger, J.L., Gijbels, M.J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C.M., Biessen, E.A., Daemen, M.J., Lutgens, E., and de Winther, M.P. (2012). Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225, 461-468.
- Stoger, J.L., Goossens, P., and de Winther, M.P. (2010). Macrophage heterogeneity: relevance and functional implications in atherosclerosis. *Current vascular pharmacology* 8, 233-248.
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175, 342-349.
- Sun, L.P., Li, L., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem* 280, 26483-26490.
- Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., *et al.* (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292-296.
- Suzuki, M., Betsuyaku, T., Ito, Y., Nagai, K., Nasuhara, Y., Kaga, K., Kondo, S., and Nishimura, M. (2008). Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 39, 673-682.
- Swarnakar, S., Beers, J., Strickland, D.K., Azhar, S., and Williams, D.L. (2001). The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 276, 21121-21128.
- Swift, L.L. (1996). Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 271, 31491-31495.
- Swirski, F.K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 117, 195-205.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616.

- Tabas, I. (2009). Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal* *11*, 2333-2339.
- Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* *10*, 36-46.
- Tabas, I., Garcia-Cardena, G., and Owens, G.K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* *209*, 13-22.
- Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., *et al.* (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* *117*, 185-194.
- Takahashi, K., and Naito, M. (1993). Development, differentiation, and proliferation of macrophages in the rat yolk sac. *Tissue & cell* *25*, 351-362.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2011). Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur J Immunol* *41*, 2490-2493.
- Tall, A.R. (1990). Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* *86*, 379-384.
- Tallone, T., Turconi, G., Soldati, G., Pedrazzini, G., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2011). Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *Journal of cardiovascular translational research* *4*, 211-219.
- Tangirala, R.K., Rubin, E.M., and 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.
- Tangirala, R.K., Tsukamoto, K., Chun, S.H., Usher, D., Pure, E., and Rader, D.J. (1999). Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* *100*, 1816-1822.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., and Goeddel, D.V. (1993a). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* *74*, 845-853.
- Tartaglia, L.A., Goeddel, D.V., Reynolds, C., Figari, I.S., Weber, R.F., Fendly, B.M., and Palladino, M.A., Jr. (1993b). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* *151*, 4637-4641.
- Tavian, M., and Peault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *The International journal of developmental biology* *49*, 243-250.
- Taye, A., and El-Sheikh, A.A. (2013). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways. *European journal of clinical investigation* *43*, 740-745.
- Taye, A., Saad, A.H., Kumar, A.H., and Morawietz, H. (2010a). Effect of apocynin on NADPH oxidase-mediated oxidative stress-LOX-1-eNOS pathway in human endothelial cells exposed to high glucose. *European journal of pharmacology* *627*, 42-48.
- Taye, A., Sawamura, T., and Morawietz, H. (2010b). Aldosterone augments LOX-1-mediated low-density lipoprotein uptake in human umbilical artery endothelial cells. *Pharmacological reports* : PR *62*, 311-318.

- Taylor, A.M., Hanchett, R., Natarajan, R., Hedrick, C.C., Forrest, S., Nadler, J.L., and McNamara, C.A. (2005a). The effects of leukocyte-type 12/15-lipoxygenase on Id3-mediated vascular smooth muscle cell growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2069-2074.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005b). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 901-944.
- Teupser, D., Burkhardt, R., Wilfert, W., Haffner, I., Nebendahl, K., and Thiery, J. (2006). Identification of macrophage arginase I as a new candidate gene of atherosclerosis resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 365-371.
- Teupser, D., Persky, A.D., and Breslow, J.L. (2003). Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1907-1913.
- Theilmeyer, G., Lenaerts, T., Remacle, C., Collen, D., Vermylen, J., and Hoylaerts, M.F. (1999). Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoid/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood* 94, 2725-2734.
- Thompson, J.S. (1969). Atheromata in an inbred strain of mice. *Journal of atherosclerosis research* 10, 113-122.
- Thorp, E., Cui, D., Schrijvers, D.M., Kuriakose, G., and Tabas, I. (2008). MERTK receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1421-1428.
- Thorp, E., and Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 86, 1089-1095.
- Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J., John, S., and Taams, L.S. (2007). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19446-19451.
- Tiruppathi, C., Naqvi, T., Wu, Y., Vogel, S.M., Minshall, R.D., and Malik, A.B. (2004). Albumin mediates the transcytosis of myeloperoxidase by means of caveolae in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7699-7704.
- Titos, E., Rius, B., Gonzalez-Periz, A., Lopez-Vicario, C., Moran-Salvador, E., Martinez-Clemente, M., Arroyo, V., and Claria, J. (2011). Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol* 187, 5408-5418.
- Tiwari, S., and Siddiqi, S.A. (2012). Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 1079-1086.
- Torre, D., Ferrario, G., Speranza, F., Orani, A., Fiori, G.P., and Zeroli, C. (1996). Serum concentrations of nitrite in patients with HIV-1 infection. *Journal of clinical pathology* 49, 574-576.
- Tran, K., Thorne-Tjomsland, G., DeLong, C.J., Cui, Z., Shan, J., Burton, L., Jamieson, J.C., and Yao, Z. (2002). Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* 277, 31187-31200.

- Trebus, F., Heydeck, D., Schimke, I., Gerth, C., and Kuhn, H. (2002). Transient experimental anemia in cholesterol-fed rabbits induces systemic overexpression of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase and protects from aortic lipid deposition. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* *67*, 419-428.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* *3*, 133-146.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* *7*, 179-190.
- Trogan, E., Feig, J.E., Dogan, S., Rothblat, G.H., Angeli, V., Tacke, F., Randolph, G.J., and Fisher, E.A. (2006). Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3781-3786.
- Tsai, M.H., Chang, C.L., Yu, Y.S., Lin, T.Y., Chong, C.P., Lin, Y.S., Su, M.Y., Yang, J.Y., Shu, T.Y., Lu, X., *et al.* (2012). Chemical analysis of C-reactive protein synthesized by human aortic endothelial cells under oxidative stress. *Analytical chemistry* *84*, 9646-9654.
- Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* *117*, 902-909.
- Tsukano, H., Gotoh, T., Endo, M., Miyata, K., Tazume, H., Kadomatsu, T., Yano, M., Iwawaki, T., Kohno, K., Araki, K., *et al.* (2010). The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *30*, 1925-1932.
- Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Hayashi, N., Mizutani, H., and Nakanishi, K. (2004). Induction of allergic inflammation by interleukin-18 in experimental animal models. *Immunological reviews* *202*, 115-138.
- Turunen, S., Koivula, M.-K., Nicholas, A., Risteli, L., and Risteli, J. (2014). Homocitrulline: an analog and confounder related to citrulline. In *Protein deimination in human health and disease*, A. Nicholas, and S. Bhattacharya, eds. (Springer Science + Business Media LLC), pp. 367-376.
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., and Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience* *16*, 543-551.
- Ulrich, C., Heine, G.H., Garcia, P., Reichart, B., Georg, T., Krause, M., Kohler, H., and Girndt, M. (2006). Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *21*, 1596-1602.
- Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* *12*, 492-502.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* *20*, 825-852.
- Uratsuji, H., Tada, Y., Kawashima, T., Kamata, M., Hau, C.S., Asano, Y., Sugaya, M., Kadono, T., Asahina, A., Sato, S., *et al.* (2012). P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J Immunol* *188*, 436-444.

USRDS (2015). 2015 United States Renal Data System annual data report.

Uyemura, K., Demer, L.L., Castle, S.C., Jullien, D., Berliner, J.A., Gately, M.K., Warriar, R.R., Pham, N., Fogelman, A.M., and Modlin, R.L. (1996). Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest* 97, 2130-2138.

Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P.S., Gharib, S.A., Hoofnagle, A.N., Cheung, M.C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., *et al.* (2007a). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 117, 746-756.

Vaisar, T., Shao, B., Green, P.S., Oda, M.N., Oram, J.F., and Heinecke, J.W. (2007b). Myeloperoxidase and inflammatory proteins: pathways for generating dysfunctional high-density lipoprotein in humans. *Curr Atheroscler Rep* 9, 417-424.

van den Berg, J.J., Winterbourn, C.C., and Kuypers, F.A. (1993). Hypochlorous acid-mediated modification of cholesterol and phospholipid: analysis of reaction products by gas chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res* 34, 2005-2012.

Van Der Giet, M., Giebing, G., Tolle, M., and Schmidt, S. (2002). The Role of P2Y Receptors in the Control of Blood Pressure. *Drug news & perspectives* 15, 640-646.

van der Poll, T., Keogh, C.V., Guirao, X., Buurman, W.A., Kopf, M., and Lowry, S.F. (1997). Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 176, 439-444.

van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Halliwell, B., and Cross, C.E. (1997). Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 272, 7617-7625.

van der Weyden, L., Conigrave, A.D., and Morris, M.B. (2000). Signal transduction and white cell maturation via extracellular ATP and the P2Y₁₁ receptor. *Immunology and cell biology* 78, 369-374.

Van Eck, M., Herijgers, N., Vidgeon-Hart, M., Pearce, N.J., Hoogerbrugge, P.M., Groot, P.H., and Van Berkel, T.J. (2000). Accelerated atherosclerosis in C57Bl/6 mice transplanted with ApoE-deficient bone marrow. *Atherosclerosis* 150, 71-80.

van Furth, R., Raeburn, J.A., and van Zwet, T.L. (1979). Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood* 54, 485-500.

Van Genderachter, J.A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., and De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211, 487-501.

van Oostrom, A.J., Sijmonsma, T.P., Verseyden, C., Jansen, E.H., de Koning, E.J., Rabelink, T.J., and Castro Cabezas, M. (2003). Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res* 44, 576-583.

Van Overmeire, E., Laoui, D., Keirsse, J., Van Genderachter, J.A., and Sarukhan, A. (2014). Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallels with other tissues. *Frontiers in immunology* 5, 127.

van Tits, L.J., Stienstra, R., van Lent, P.L., Netea, M.G., Joosten, L.A., and Stalenhoef, A.F. (2011). Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis* 214, 345-349.

- Varin, A., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* 214, 630-641.
- Vazquez, E., Sanchez-Perales, C., Garcia-Garcia, F., Garcia-Cortes, M.J., Torres, J., Borrego, F., Salas, D., Liebana, A., and Fernandez-Guerrero, J.C. (2014). Sudden death in incident dialysis patients. *American journal of nephrology* 39, 331-336.
- Venneri, M.A., De Palma, M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C., and Naldini, L. (2007). Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109, 5276-5285.
- Veremeyko, T., Siddiqui, S., Sotnikov, I., Yung, A., and Ponomarev, E.D. (2013). IL-4/IL-13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. *PLoS One* 8, e81774.
- VerHague, M.A., Cheng, D., Weinberg, R.B., and Shelness, G.S. (2013). Apolipoprotein A-IV expression in mouse liver enhances triglyceride secretion and reduces hepatic lipid content by promoting very low density lipoprotein particle expansion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2501-2508.
- Verschoor, C.P., Puchta, A., and Bowdish, D.M. (2012). The macrophage. *Methods Mol Biol* 844, 139-156.
- Vesselinovitch, D., and Wissler, R.W. (1968). Experimental production of atherosclerosis in mice. 2. Effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice. *Journal of atherosclerosis research* 8, 497-523.
- Vesselinovitch, D., Wissler, R.W., and Doull, J. (1968). Experimental production of atherosclerosis in mice. 1. Effect of various synthetic diets and radiation on survival time, food consumption and body weight in mice. *Journal of atherosclerosis research* 8, 483-495.
- Vidal, B., Serrano, A.L., Tjwa, M., Suelves, M., Ardite, E., De Mori, R., Baeza-Raja, B., Martinez de Lagran, M., Lafuste, P., Ruiz-Bonilla, V., *et al.* (2008). Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev* 22, 1747-1752.
- Vieira, O.V., Bucci, C., Harrison, R.E., Trimble, W.S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A.D., Stahl, P.D., and Grinstein, S. (2003). Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 23, 2501-2514.
- Viita, H., Sen, C.K., Roy, S., Siljamaki, T., Nikkari, T., and Yla-Herttuala, S. (1999). High expression of human 15-lipoxygenase induces NF-kappaB-mediated expression of vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and T-cell adhesion on human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 1, 83-96.
- Viola, J., and Soehnlein, O. (2015). Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol* 27, 184-193.
- Viola, J.R., Lemnitzer, P., Jansen, Y., Csaba, G., Winter, C., Neideck, C., Silvestre-Roig, C., Dittmar, G., Doring, Y., Drechsler, M., *et al.* (2016). Resolving Lipid Mediators Maresin 1 and Resolvin D2 Prevent Atheroprogession in Mice. *Circ Res* 119, 1030-1038.
- Vlaminck, B., Calay, D., Genin, M., Sauvage, A., Ninane, N., Zouaoui Boudjeltia, K., Raes, M., and Michiels, C. (2014). Effects of copper sulfate-oxidized or myeloperoxidase-modified LDL on lipid loading and programmed cell death in macrophages under hypoxia. *Hypoxia (Auckl)* 2, 153-169.

- Volkman, A., and Gowans, J.L. (1965). The Production of Macrophages in the Rat. *British journal of experimental pathology* 46, 50-61.
- von Kugelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & therapeutics* 110, 415-432.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* 10, 45-65.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A., and Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends in neurosciences* 36, 209-217.
- Walter, R., Mischak, H., and Haller, H. (2002). Haemodialysis, atherosclerosis and inflammation-identifying molecular mechanisms of chronic vascular disease in ESDR patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 17 Suppl 3, 24-29.
- Wang, L.J., Lee, T.S., Lee, F.Y., Pai, R.C., and Chau, L.Y. (1998). Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 152, 711-720.
- Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in immunology* 5, 614.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I., Egan, R.W., and Billah, M.M. (1995). Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 270, 9558-9563.
- Wang, Z., Nicholls, S.J., Rodriguez, E.R., Kummu, O., Horkko, S., Barnard, J., Reynolds, W.F., Topol, E.J., DiDonato, J.A., and Hazen, S.L. (2007). Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 13, 1176-1184.
- Warny, M., Aboudola, S., Robson, S.C., Sevigny, J., Communi, D., Soltoff, S.P., and Kelly, C.P. (2001). P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276, 26051-26056.
- Watford, M. (2008). Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation. *The Journal of nutrition* 138, 2003S-2007S.
- Watson, A.D., Leitinger, N., Navab, M., Faull, K.F., Horkko, S., Witztum, J.L., Palinski, W., Schwenke, D., Salomon, R.G., Sha, W., *et al.* (1997). Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 272, 13597-13607.
- Watson, K.E., Bostrom, K., Ravindranath, R., Lam, T., Norton, B., and Demer, L.L. (1994). TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 93, 2106-2113.
- Way, K.J., Dinh, H., Keene, M.R., White, K.E., Clanchy, F.I., Lusby, P., Roiniotis, J., Cook, A.D., Cassady, A.I., Curtis, D.J., *et al.* (2009). The generation and properties of human macrophage populations from hemopoietic stem cells. *J Leukoc Biol* 85, 766-778.
- Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Strobel, M., Ziegler-Heitbrock, H.W., and Weber, P.C. (1994). Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate

radicals. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14, 1665-1673.

Weber, O., Bischoff, H., Schmeck, C., and Bottcher, M.F. (2010). Cholesteryl ester transfer protein and its inhibition. *Cell Mol Life Sci* 67, 3139-3149.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.

Weiss, M., Byrne, A.J., Blazek, K., Saliba, D.G., Pease, J.E., Perocheau, D., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2015). IRF5 controls both acute and chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11001-11006.

Wijffels, J.F., de Rover, Z., Beelen, R.H., Kraal, G., and van Rooijen, N. (1994). Macrophage subpopulations in the mouse spleen renewed by local proliferation. *Immunobiology* 191, 52-64.

Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4828-4832.

Wink, D.A., Hines, H.B., Cheng, R.Y., Switzer, C.H., Flores-Santana, W., Vitek, M.P., Ridnour, L.A., and Colton, C.A. (2011). Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 89, 873-891.

Wittwer, J., and Hersberger, M. (2007). The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 77, 67-77.

Wolfs, I.M., Donners, M.M., and de Winther, M.P. (2011). Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thromb Haemost* 106, 1-9.

Wong, H.S., Jaumouille, V., Freeman, S.A., Doodnauth, S.A., Schlam, D., Canton, J., Mukovozov, I.M., Saric, A., Grinstein, S., and Robinson, L.A. (2016). Chemokine Signaling Enhances CD36 Responsiveness toward Oxidized Low-Density Lipoproteins and Accelerates Foam Cell Formation. *Cell reports* 14, 2859-2871.

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

Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53, 41-57.

Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews Cardiology* 7, 77-86.

Wu, G., Bazer, F.W., Satterfield, M.C., Li, X., Wang, X., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Dai, Z., Wang, J., and Wu, Z. (2013). Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino acids* 45, 241-256.

Wustner, D., and Solanko, K. (2015). How cholesterol interacts with proteins and lipids during its intracellular transport. *Biochim Biophys Acta* 1848, 1908-1926.

- Xavier, M.N., Winter, M.G., Spees, A.M., den Hartigh, A.B., Nguyen, K., Roux, C.M., Silva, T.M., Atluri, V.L., Kerrinnes, T., Keestra, A.M., *et al.* (2013). PPARgamma-mediated increase in glucose availability sustains chronic *Brucella abortus* infection in alternatively activated macrophages. *Cell Host Microbe* *14*, 159-170.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.F., and Achong, M.K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* *101*, 311-320.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* *112*, 1821-1830.
- Yamaguchi, M., Sato, H., and Bannai, S. (1993). Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* *193*, 1198-1201.
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., and Saito, T. (2008). Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol* *9*, 1179-1188.
- Yan, M., Mehta, J.L., Zhang, W., and Hu, C. (2011). LOX-1, oxidative stress and inflammation: a novel mechanism for diabetic cardiovascular complications. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* *25*, 451-459.
- Yancey, P.G., Blakemore, J., Ding, L., Fan, D., Overton, C.D., Zhang, Y., Linton, M.F., and Fazio, S. (2010). Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *30*, 787-795.
- Yancey, P.G., Ding, Y., Fan, D., Blakemore, J.L., Zhang, Y., Ding, L., Zhang, J., Linton, M.F., and Fazio, S. (2011). Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent. *Circulation* *124*, 454-464.
- Yang, R., and Liang, B.T. (2012). Cardiac P2X(4) receptors: targets in ischemia and heart failure? *Circ Res* *111*, 397-401.
- Yang, Z., and Ming, X.F. (2014). Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Frontiers in immunology* *5*, 533.
- Ying, W., Cheruku, P.S., Bazer, F.W., Safe, S.H., and Zhou, B. (2013). Investigation of macrophage polarization using bone marrow derived macrophages. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Yla-Herttuala, S., Bentzon, J.F., Daemen, M., Falk, E., Garcia-Garcia, H.M., Herrmann, J., Hofer, I., Jukema, J.W., Krams, R., Kwak, B.R., *et al.* (2011). Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb Haemost* *106*, 1-19.
- Yla-Herttuala, S., Luoma, J., Viita, H., Hiltunen, T., Sisto, T., and Nikkari, T. (1995). Transfer of 15-lipoxygenase gene into rabbit iliac arteries results in the appearance of oxidation-specific lipid-protein adducts characteristic of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* *95*, 2692-2698.
- Yla-Herttuala, S., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Sigal, E., Sarkioja, T., Witztum, J.L., and Steinberg, D. (1991). Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-

lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 87, 1146-1152.

Yona, S., and Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current opinion in hematology* 17, 53-59.

Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillems, M., Misharin, A., *et al.* (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79-91.

Yoshida, H., and Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 411, 1875-1882.

Yoshikawa, M., Yabuuchi, H., Kuroiwa, A., Ikegami, Y., Sai, Y., Tamai, I., Tsuji, A., Matsuda, Y., Yoshida, H., and Ishikawa, T. (2002). Molecular and cytogenetic characterization of the mouse ATP-binding cassette transporter *Abcg4*. *Gene* 293, 67-75.

Younis, N., Sharma, R., Soran, H., Charlton-Menys, V., Elseweidy, M., and Durrington, P.N. (2008). Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Current opinion in lipidology* 19, 378-384.

Yuasa-Kawase, M., Masuda, D., Yamashita, T., Kawase, R., Nakaoka, H., Inagaki, M., Nakatani, K., Tsubakio-Yamamoto, K., Ohama, T., Matsuyama, A., *et al.* (2012). Patients with CD36 deficiency are associated with enhanced atherosclerotic cardiovascular diseases. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 19, 263-275.

Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., Welch, C., and Tall, A.R. (2007). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 117, 3900-3908.

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

Zarev, S., Bonnefont-Rousselot, D., Jedidi, I., Cosson, C., Couturier, M., Legrand, A., Beaudeux, J.L., and Therond, P. (2003). Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization. *Archives of biochemistry and biophysics* 420, 68-78.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50-61.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Schirmer, S.H., Sester, M., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G.H. (2012). Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 217, 1273-1284.

Zeiger, R.S., Schatz, M., Zhang, F., Crawford, W.W., Kaplan, M.S., Roth, R.M., and Chen, W. (2011). Elevated exhaled nitric oxide is a clinical indicator of future uncontrolled asthma in asthmatic patients on inhaled corticosteroids. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128, 412-414.

Zelenski, N.G., Rawson, R.B., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 274, 21973-21980.

- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* *258*, 468-471.
- Zhang, X., Goncalves, R., and Mosser, D.M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al] *Chapter 14*, Unit 14 11.
- Zhao, B., Li, Y., Buono, C., Waldo, S.W., Jones, N.L., Mori, M., and Kruth, H.S. (2006). Constitutive receptor-independent low density lipoprotein uptake and cholesterol accumulation by macrophages differentiated from human monocytes with macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF). *J Biol Chem* *281*, 15757-15762.
- Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2010). Liver X receptor in cholesterol metabolism. *The Journal of endocrinology* *204*, 233-240.
- Zhao, Y., Black, A.S., Bonnet, D.J., Maryanoff, B.E., Curtiss, L.K., Leman, L.J., and Ghadiri, M.R. (2014). In vivo efficacy of HDL-like nanolipid particles containing multivalent peptide mimetics of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* *55*, 2053-2063.
- Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M.L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M., Schmitt, D., Fu, X., Thomson, L., Fox, P.L., *et al.* (2004). Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* *114*, 529-541.
- Zhou, M., Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (1998). Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J Biol Chem* *273*, 24649-24653.
- Zhou, X., Stemme, S., and Hansson, G.K. (1996). Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol* *149*, 359-366.
- Zhu, H., Takahashi, Y., Xu, W., Kawajiri, H., Murakami, T., Yamamoto, M., Iseki, S., Iwasaki, T., Hattori, H., and Yoshimoto, T. (2003). Low density lipoprotein receptor-related protein-mediated membrane translocation of 12/15-lipoxygenase is required for oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *J Biol Chem* *278*, 13350-13355.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelzer, F., Schutt, C., Passlick, B., and Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* *23*, 2053-2058.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., *et al.* (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74-80.
- Ziouzenkova, O., Sevanian, A., Abuja, P.M., Ramos, P., and Esterbauer, H. (1998). Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms. *Free Radic Biol Med* *24*, 607-623.
- Zizzo, G., Hilliard, B.A., Monestier, M., and Cohen, P.L. (2012). Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* *189*, 3508-3520.

Webographie

Figure I.1.8. Présentation des antigènes aux lymphocytes T :
www.apsubiology.org

Figure I.1.17. Voie de signalisation de Nrf2 :
www.caymanchem.com/article/2168

Figure I.1.28. Voie de signalisation de l'IFN γ :
<http://www.biologicscorp.com>

Figure I.2.1. Les 10 causes principales de mort dans le monde (dernier recensement de l'OMS en mai 2014) :
www.who.int/nmh/publications

Figure I.2.5. Evolution d'une lésion athéroscléreuse, au cours du temps :
<http://www.healio.com/cardiology/learn-the-heart/cardiology-review/topic-reviews/atherosclerosis>

Figure I.2.6. Structure moléculaire du cholestérol :
www.facbio.com

Figure I.2.10. Représentation schématique générale d'une lipoprotéine :
www.medicine.academic.ru

Figure I.2.11. Représentation schématique de la composition des lipoprotéines :
<http://www.robertbarrington.net/wp-content/uploads/2013/03/Lipoprotein-Classes.jpg>

Figure I.2.12. Structure d'un chylomicron :
http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html

Figure I.2.14. Structure d'une particule de VLDL :
what-when-how.com

Figure I.2.16. Structure d'une particule de LDL :
<https://www.britannica.com/science/low-density-lipoprotein>

Figure I.2.17. Structure d'une particule de HDL :
www.diabetesandglucoseworld.com

Figure I.3.15. Edition du génome par le système CRISPR-Cas9 :
<https://www.aati-us.com/instruments/fragment-analyzer/crispr>

Figure I.3.19. Récepteurs purinergiques P2Y et voies de signalisation associées :
<https://www.qiagen.com>

Figure I.3.20. Molécule d'UDP :
<http://oregonstate.edu/dept/biochem/hhmi/hhmiclasses/bb450/winter2002/molex/udp.htm>

Annexes

VI. ANNEXES

ANNEXE 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES.

Immunohistofluorescence et coloration HES sur coupes de cœur et d'aorte de souris *ApoE*^{-/-} (KO) et *ApoE*^{-/-} x *P2y6*^{-/-} (DKO)

Les cœurs de souris ont été coupés au moyen d'un microtome par D. Fokan (IRIBHM, ULB, Gosselies), en sections de L1 à L5 (points de repère) jusqu'à atteindre l'aorte (coupe L5). Les cryosections (épaisseur : 10 µm) ont été congelées à - 80°C pour ensuite être dégelées et fixées avec du PFA 4 % (Merck, Billerica, MA, USA) pendant 20 minutes, perméabilisées pendant 5 minutes avec du PBS-Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) et ensuite lavées dans un bain de PBS-glycine 0,1 M (Merck, Billerica, MA, USA) pendant 5 minutes. Elles sont incubées avec du PBS-BSA 2 % (Europa Bioproducts Ltd, Wicken, UK) pendant 45 minutes, puis avec les anticorps primaires une nuit, à 4°C (anticorps monoclonal de rat anti-CD68 murin (dilution 100 x) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) et anticorps monoclonal de souris anti-iNOS murin (dilution 200 x) (Abcam, Cambridge, UK) ou anticorps polyclonal de lapin anti-ARG1 de souris (H-52) (dilution 25 x) (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) ou anticorps monoclonal de souris anti-HO-1 murin (dilution 100 x) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)). Les anticorps secondaires sont soit l'anticorps anti-IgG de rat-Alexa 488, l'anticorps anti-IgG de souris-Alexa 568, soit l'anticorps anti-IgG de lapin-Alexa 568 (dilution 1000 x) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Les cryosections sont incubées pendant 15 minutes avec la sonde fluorescente Hoechst Fluoro Pure Grade (dilution 1/100) (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) afin de marquer les noyaux. Les coupes sont ensuite montées dans un mélange de PBS et glycérol afin d'acquies les images avec le microscope Olympus BX-63 (lentille : 10 ou 20 x) et sont finalement colorées avec un HES (hématoxyline-éosine-safran). Le DPX New (Merck, Billerica, MA, USA) est utilisé comme agent de montage permanent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Détermination de la cytotoxicité due au LPS (Annexe 2)

Les cellules RAW (75 x 10³ cellules/puits) ont étéensemencées en plaques 24 puits (Corning-Costar, Lowell, MA, USA) et traitées, pendant 18 ou 24 heures avec un mélange de LPS (0,1, 1, 10, 50 et 100 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) et d'IFN γ (20 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La mesure de la cytotoxicité est réalisée avec le kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay, selon les instructions données (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé via la formule mathématique suivante :

$$\% \text{ cytotoxicité} = 100 * (C\text{-blc}) + ((S\text{-blc}) * 4 (C\text{-blc}) + ((S\text{-blc}) * 4 + ((L\text{-blc}) * 20)$$

Test MTT de viabilité cellulaire (Annexe 2)

Les cellules RAW (75 000 cellules/puits) sont traitées ou non avec un mélange de LPS (0,1, 1, 10, 50 et 100 ng/ml) et d'IFN γ (20 ng/ml) ou avec un mélange d'IL-4 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) et d'IL-13 (20 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), dans 1 ml de DHG-L1 + 10 % HIS dans des plaques 24 puits (Corning-Costar, Lowell, MA, USA). Après 18 heures de polarisation, 500 µl de milieu de culture sont enlevés et remplacés par 500 µl de solution de coloration dans lequel les cellules sont mises à

incuber pour 2 heures et demi, à 37°C et dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Ce temps d'incubation est nécessaire afin que les cellules incorporent le MTT (Bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) et le clivent en dérivé formazan. La solution est ensuite enlevée et remplacée par 1 ml de solution de lyse (SDS (« Sodium Dodecyl Sulfate ») 30 % (2 volumes) (MP Biochemicals, LLC, USA) et N,N-diméthyl-formamide (1 volume) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 4,7), permettant de lyser les cellules et solubiliser les cristaux de formazan. Après 1 heure d'incubation, la viabilité des cellules est mesurée en lisant la D.O. (densité optique) à 570 nm, en utilisant un lecteur de plaque multi-puits (Bio-Rad Laboratoires, Hercules, CA USA).

Evaluation des mobilités électrophorétiques des LDLs natives et oxydées par électrophorèse sur gel d'agarose

Les LDLs natives (Nat-LDLs), les LDLs oxydées au cuivre (Ox-LDLs) ou à la myéloperoxydase (Mox-LDLs) possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. Les modifications des résidus lysine de l'APOB100 des LDLs provoquent une migration plus ou moins importante des lipoprotéines modifiées par rapport aux LDLs natives. Elles peuvent être facilement distinguées en utilisant la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose.

Après polymérisation d'un gel d'agarose 0,8 %, les échantillons de LDLs natives ou oxydées purifiées, dilués à une concentration de 500 µg/ml dans du TBE 1 x (TBE 10x : 108 g de Tris, 55 g d'acide borique, 9,3 g de Titriplex III, EDTA disodique (Invitrogen, UK)) et dans du bleu de charge 5 x sans SDS (10 ml de Tris 2 M pH 6,8 (Merck, Germany), 12,5 ml de β-mercaptoéthanol (FlukaChemi AG, Switzerland), 25 ml de glycérol (Merck, Germany), 50 mg de bleu de bromophénol (Janssens Chemicals)), sont chargés. La migration dure 2 heures, de 80 à 100 volts et à ampérage maximum.

Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (100 ml d'eau milli-Q (Millipore, USA), 80 ml de méthanol (Accros Organic, USA), 20 ml d'acide acétique, 0,3 g de bleu de Coomassie) pendant 20 minutes, ce qui permet de visualiser nettement les protéines. Le gel coloré est lavé 4 à 5 fois dans la solution de décoloration (500 ml d'eau milli-Q (Millipore, USA), 400 ml de méthanol (Accros Organics, USA), 100 ml d'acide acétique) et est baigné toute une nuit dans cette solution, afin d'enlever le surplus de colorant.

Enfin, le gel est scanné et numérisé grâce au logiciel Image Master Labscan.

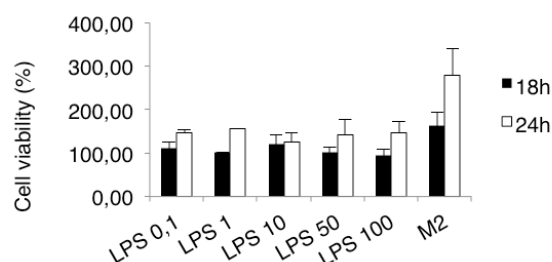
ANNEXE 2. ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DU LPS.

A.

Conditions (ng/ml)	% cytotoxicité (18h)
Contrôle	2,35
LPS 0,1	2,34
LPS 1	4,01
LPS 10	5,09
LPS 50	6,63
LPS 100	6,64

Conditions (ng/ml)	% cytotoxicité (24h)
Contrôle	5,38
LPS 0,1	3,42
LPS 1	4,15
LPS 10	5,98
LPS 50	5,43
LPS 100	6,27

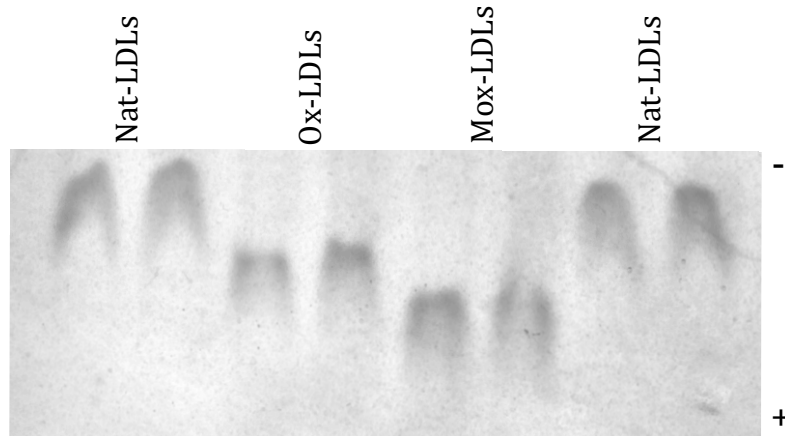
B.

**Annexe 2. Mesure de la cytotoxicité due au LPS dans les macrophages M1 et de la viabilité cellulaire dans des cellules M1 et M2.**

(A) La cytotoxicité due au LPS a été mesurée par un test LDH dans les macrophages M1, stimulées avec des concentrations croissantes de LPS pendant 18 heures et 24 heures (0,1 ng/ml à 100 ng/ml).

(B) Mesure de la viabilité cellulaire de macrophages M1 et M2, estimée par un test MTT. Les cellules ont été incubées en présence d'IFN γ (20 ng/ml) et de concentrations croissantes de LPS (de 0,1 à 100 ng/ml), pour la polarisation M1. Pour la polarisation M2, les macrophages ont été incubés en présence d'IL-4 (20 ng/ml) et d'IL-13 (20 ng/ml), tandis que les cellules contrôles n'ont pas été polarisées.

La polarisation est maintenue pendant 18 et 24 heures pour chacune des conditions. Les cellules sont traitées avec le test MTT après les 18 et 24 heures de polarisation. Les résultats sont exprimés en % de viabilité, par rapport aux cellules contrôles (soit M0 18 heures, soit M0 24 heures) et comme moyenne de triplicats ($n = 3 \pm SD$).

ANNEXE 3. CARACTERISATION DES LDLs OXYDEES PAR LE SULFATE DE CUIVRE ET PAR LA MYELOPEROXYDASE.**Annexe 3. Mobilités électrophorétiques des Nat-LDLs, Ox-LDLs et Mox-LDLs sur gel d'agarose.**

Les LDLs natives (Nat-LDLs), les LDLs oxydées au cuivre (Ox-LDLs) ou à la myéloperoxydase (Mox-LDLs) possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. Les modifications des résidus lysine de l'APOB100 des LDLs provoquent une migration plus ou moins importante des lipoprotéines modifiées par rapport aux LDLs natives. Elles peuvent être facilement distinguées en utilisant la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose : les Mox-LDLs étant celles pour lesquelles les lysines de l'APO100 sont le plus modifiées, sont celles qui migrent le plus.

Les matériels et méthodes sont décrits dans l'Annexe 1.

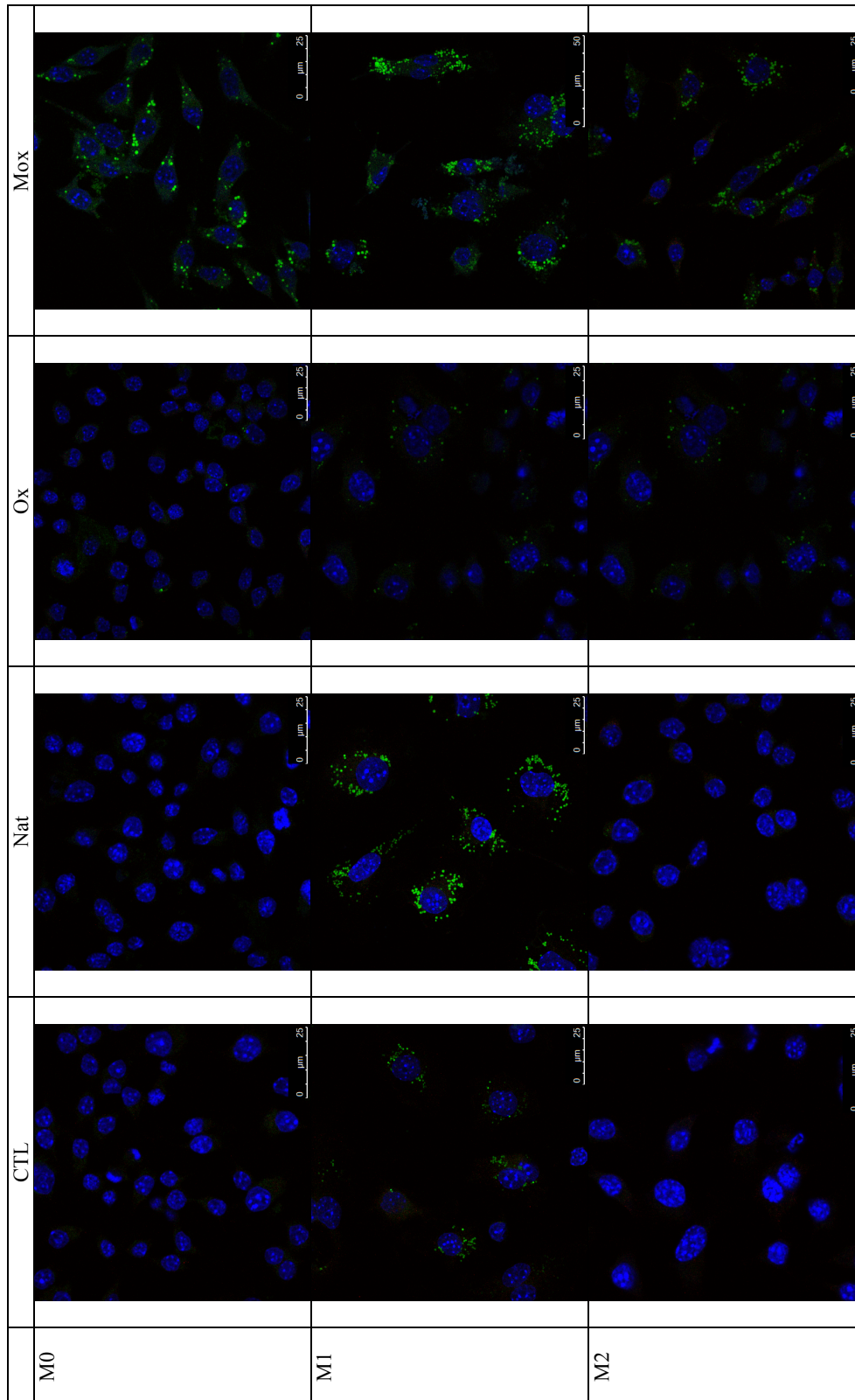
ANNEXE 4. AUTRES METHODES DE CARACTERISATION DES MOX-LDLs.

En plus d'évaluer leurs mobilités électrophorétiques, d'autres méthodes de vérification de la qualité de l'oxydation des LDLs par la myéloperoxydase sont réalisées régulièrement par le laboratoire de Médecine Expérimentale (Prof. K. Zouaoui Boudjeltia).

Voici les différentes méthodes utilisées :

- Vérification de l'activité de la MPO et mesure de traces résiduelles d'endotoxines dans les solutions de rhMPO (voir (Delporte et al., 2012)) ;
- Utilisation de la spectrométrie de masse pour détecter la présence de modifications au niveau des LDLs telles que la chloro-tyrosine (voir (Delporte et al., 2012)) ;
- Evaluation d'une réponse biologique : stimulation de cellules endothéliales HAEC avec des Mox-LDLs (100 µg/ml) et mesure de la sécrétion d'IL-8 (voir (Boudjeltia et al., 2008)).

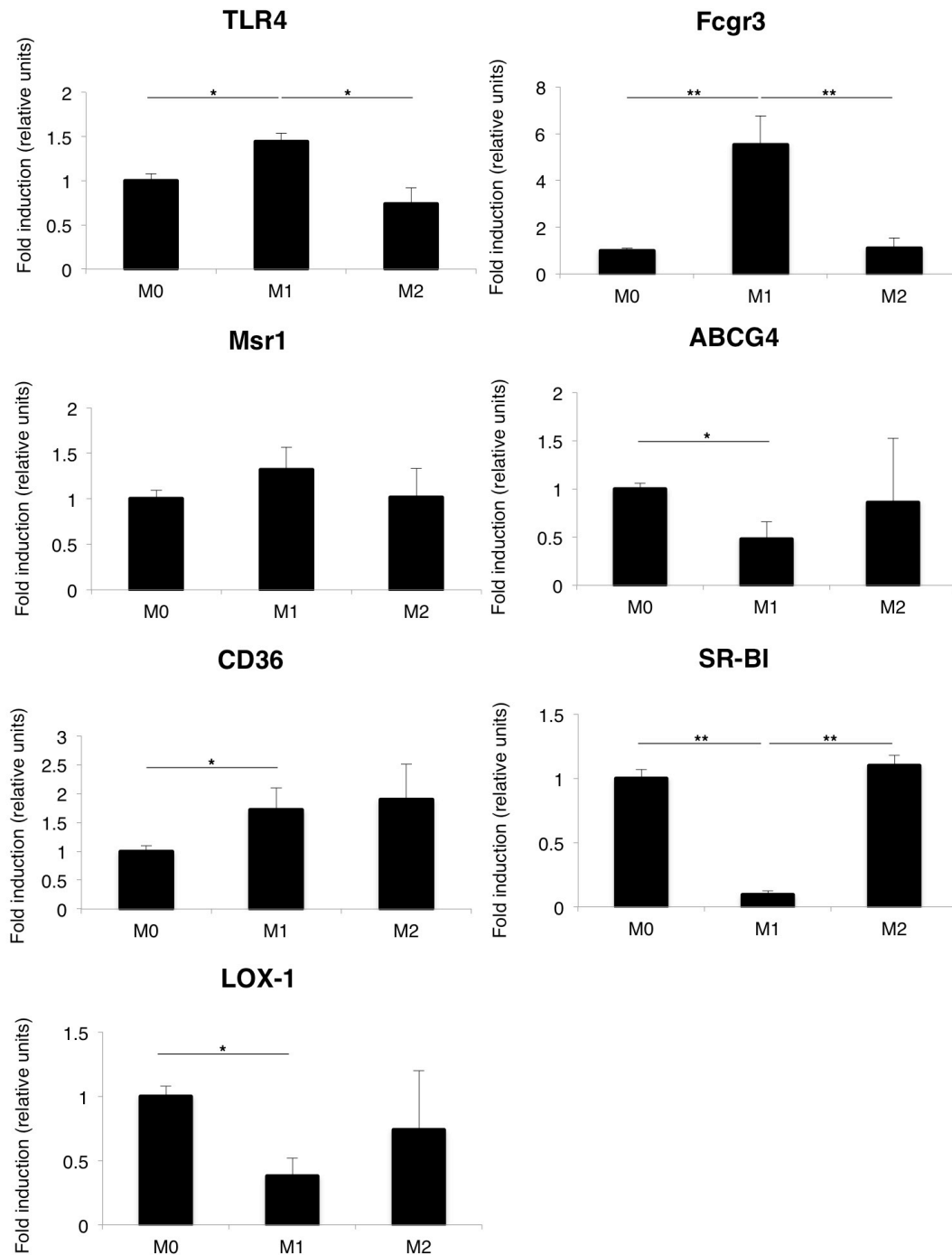
ANNEXE 5. INTERNALISATION DES LDLs NATIVES ET OXYDEES PAR LES MACROPHAGES (NON-) POLARISES.



Annexe 5. Marquage au BODIPY 493/503 de gouttelettes lipidiques présentes au sein de macrophages RAW 264.7 M0, M1 et M2 stimulés ou non avec des LDLs natives et oxydées (Ox- et Mox-LDLs) (100 µg/ml) (n = 1).

(Lipides : BODIPY 493/503 – Noyaux : To-PRO)

ANNEXE 6. POLARISATION DES MACROPHAGES ET EXPRESSION DES RECEPTEURS DE TYPE « SCAVENGER » ET DES PRR.



Annexe 6. Effet de la polarisation M1 (LPS + IFN γ) et M2 (IL-4 + IL-13) sur l'expression de plusieurs récepteurs « scavenger » et de PRR. Les cellules ont été polarisées comme décrit dans les Matériels et Méthodes de l'article de Pireaux et al. (2016).

L'expression des récepteurs « scavenger », dans les macrophages M0, M1 et M2, a été analysée par RT-qPCR. Les données ont été normalisées avec la β -actine, utilisée comme gène invariant et sont exprimées comme moyenne de « fold induction », par rapport aux cellules M0 \pm SD ($n = 3$). ANOVA 1 : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.