



HAL
open science

Modulation de la réponse inflammatoire par les récepteurs LXRs : étude comparative entre les macrophages humains et murins dans le contexte de l'athérosclérose

Louise Ménégaud

► **To cite this version:**

Louise Ménégaud. Modulation de la réponse inflammatoire par les récepteurs LXRs : étude comparative entre les macrophages humains et murins dans le contexte de l'athérosclérose. Autre [q-bio.OT]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCI016 . tel-04697101

HAL Id: tel-04697101

<https://theses.hal.science/tel-04697101>

Submitted on 13 Sep 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'UFR DES SCIENCES SANTE DE DIJON**

Ecole doctorale n°554

Environnement Santé

Doctorat de Biochimie

Par

M^{me} Ménégaud Louise

**Modulation de la réponse inflammatoire par les récepteurs LXRs.
Etude comparative entre les macrophages humains et murins dans le
contexte de l'athérosclérose**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 12 décembre 2018

Composition du Jury :

| | | |
|----------------------|---------------------------------|--------------------|
| Pr. Bart STAELS | Institut Pasteur de Lille | Président |
| Pr. Giulia CHINETTI | Université de Nice | Rapporteur |
| Dr. Philippe LESNIK | INSERM S1166, Paris | Rapporteur |
| Dr. Wilfried LE GOFF | INSERM S1166, Paris | Examineur |
| Dr. Cédric REBE | INSERM 1231, Dijon | Examineur |
| Pr. David MASSON | Université de Bourgogne | Directeur de thèse |

Remerciements

Je remercie sincèrement le Pr. Giulia Chinetti et le Dr. Philippe Lesnik pour l'intérêt qu'ils ont accepté de porter à ce travail et pour leurs remarques enrichissantes qui ont permis de l'améliorer.

Merci au Dr. Wilfried Le Goff et au Dr. Cédric Rebé d'avoir suivi l'évolution de ce travail avec bienveillance et de façon toujours très constructive durant ces trois ans.

Merci au Pr. Bart Staels d'avoir gentiment accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer aujourd'hui mon travail.

Monsieur le Professeur David Masson, merci d'avoir dirigé ces travaux de thèse. Cela fait à présent cinq ans que j'ai le plaisir de travailler avec vous mais surtout d'énormément apprendre à vos côtés. D'abord interne, vous avez su me montrer à quel point le monde de la Recherche pouvait être passionnant. Une fois assistante, c'est donc sans hésitation, et avec un immense plaisir, que je me suis lancée dans la thèse avec vous. Sans surprise, ces trois années se sont très bien passées car j'ai pu à nouveau me reposer sur votre gentillesse, votre bienveillance, votre grande disponibilité et votre constance. Vous m'avez permis d'avancer aussi bien sur le plan hospitalier que sur le plan universitaire, sans manifester la moindre impatience. Si j'ai un grand respect pour votre parcours et votre travail, vous êtes également progressivement devenu une personne de confiance, je vous en remercie. Pour cette chance que j'ai eue de vous croiser, je ne modifierais en rien mon parcours si c'était à refaire. J'espère sincèrement que nous aurons la chance de mener à bien tous les beaux projets professionnels que nous avons initiés.

Je remercie le Dr. Laurent Lagrost qui m'a très bien accueillie lors de mon arrivée au laboratoire, pour ses conseils avisés au cours de cette thèse.

Je remercie toutes les personnes aux compétences et aux savoirs riches et variés, qui ont pris du temps pour m'aider, toujours avec une extrême gentillesse et un grand professionnalisme, ou m'ont simplement soutenue et encouragée :

Tous les membres ,anciens ou actuels, et le secrétariat de l'équipe LIPNESS avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer, la plateforme de lipidomique de l'Université de Bourgogne, la plateforme Cellimap de l'Université de Bourgogne, Serges et la plateforme de cytométrie de l'Université de Bourgogne, l'équipe de recherche clinique de CCVT du CHU de Dijon, le Dr Nicolas Venteclef et Jean-Baptiste Julla, mon amie Louise et son microscope, Georges et le service d'anatomopathologie du CHU de Dijon, l'équipe technique du laboratoire de Biochimie Spécialisée de Dijon qui a toujours été très compréhensive et d'un grand soutien.

Une pensée particulière pour Lorène, ma complice de laboratoire, sans qui tout aurait été bien différent. Tu as fait pleinement partie de cette aventure.

La thèse et l'assistantat sont un beau voyage, au cours duquel on s'enrichit professionnellement et humainement, mais dont le parcours est aussi parfois tortueux. Merci à celles et ceux qui m'ont tenu la main, m'ont écoutée et encouragée. Mes anges gardiens qui me portent et me connaissent si bien et depuis si longtemps pour beaucoup maintenant. Ils se reconnaîtront.

Enfin, je dédie ce travail à ma mère, qui a toujours voulu le meilleur pour ses filles et dont le courage et la force m'ont guidée chaque jour.

Table des matières

| | |
|--|----|
| ABREVIATIONS | 1 |
| LISTE DES FIGURES ET TABLES..... | 6 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 7 |
| PARTIE 1 : ATHEROSCLEROSE | 8 |
| I. Epidémiologie et physiopathologie..... | 8 |
| A. Epidémiologie | 8 |
| B. Physiopathologie | 10 |
| 1) Initiation de la lésion au niveau de l'endothélium vasculaire | 10 |
| a) Mise en place de l'immunité innée..... | 10 |
| b) Mise en place d'une immunité adaptative secondaire | 12 |
| 2) Evolution de la plaque d'athérome : passage à la vulnérabilité | 13 |
| a) Hétérogénéité des macrophages de la lésion | 13 |
| b) Vulnérabilité de la plaque et risque de thrombose vasculaire | 13 |
| i. Nécrose du cœur lipidique..... | 14 |
| ii. Rupture de la plaque d'athérome | 14 |
| II. L'athérosclérose : une maladie liée au cholestérol..... | 15 |
| A. Homéostasie cellulaire du cholestérol..... | 15 |
| B. L'athérosclérose et cholestérol : données physiopathologiques, épidémiologiques et expérimentales | 16 |
| 1) Rappels historiques | 16 |
| 2) L'étude de Framingham | 17 |
| 3) Causes multifactorielles de l'hypercholestérolémie..... | 18 |
| C. Traiter l'hypercholestérolémie pour traiter l'athérosclérose | 18 |
| 1) Les statines | 19 |
| 2) Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol..... | 19 |

| | | |
|--|--|----|
| 3) | Les inhibiteurs de la Proprotéine Convertase Subtilisin/Kexin type 9..... | 20 |
| III. | L'athérosclérose : une maladie inflammatoire chronique | 21 |
| A. | Théorie de l'inflammation dans l'athérosclérose | 21 |
| B. | Rôle des acides gras et des médiateurs lipidiques dans la plaque d'athérome..... | 22 |
| 1) | Synthèse de prostaglandines et de leucotriènes pro-inflammatoires..... | 22 |
| a) | Mobilisation de l'acide arachidonique et synthèse de prostaglandine E ₂ ... | 23 |
| b) | Le thromboxane A ₂ | 24 |
| c) | Le leucotriène B ₄ | 24 |
| 2) | Oxydation des acides gras et inflammation de la plaque d'athérome | 25 |
| 3) | Synthèse de médiateurs lipidiques de résolution de l'inflammation..... | 25 |
| PARTIE 2 : L'INTERLEUKINE-1B AU CŒUR DU PHENOMENE ATHEROMATEUX | | 27 |
| I. | Généralités sur IL-1β..... | 27 |
| A. | La voie de signalisation de IL-1 | 27 |
| B. | L'inflammasome NLRP3 producteur d'IL-1β | 30 |
| II. | Rôles d'IL-1β dans l'athérosclérose..... | 32 |
| A. | IL-1β et athérosclérose : modèles animaux..... | 32 |
| 1) | Rôle d'IL-1β dans la formation des lésions athéromateuses..... | 32 |
| 2) | Rôle d'IL-1β dans le remaniement vasculaire..... | 33 |
| 3) | Rôle d'IL-1β dans l'inflammation et l'évolution de la lésion..... | 33 |
| 4) | Rôle de l'inflammasome dans l'athérosclérose..... | 34 |
| B. | IL-1β et athérosclérose : études chez l'Homme | 35 |
| 1) | Etude de la signalisation d'IL-1β dans l'athérosclérose chez l'Homme..... | 35 |
| 2) | Rôle de l'inflammasome dans l'athérosclérose chez l'Homme | 36 |
| III. | L'étude CANTOS | 37 |
| A. | Rationnel de l'étude CANTOS | 37 |
| B. | Résultats de l'étude CANTOS | 38 |
| C. | Perspectives de l'étude CANTOS | 38 |

| | |
|---|----|
| PARTIE 3 : LE LIVER X RECEPTOR, LIEN ENTRE CHOLESTEROL ET | |
| INFLAMMATION | 40 |
| I. Cholestérol et inflammation | 40 |
| A. Cholestérol intracellulaire et réponse inflammatoire | 40 |
| 1) Le transport inverse du cholestérol | 40 |
| 2) Perturbations de l'efflux cellulaire de cholestérol et inflammation | 41 |
| B. Cholestérol et production de cellules pro-inflammatoires | 41 |
| II. Le Liver X Receptor..... | 43 |
| A. LXR : un récepteur nucléaire | 43 |
| 1) Structure | 43 |
| 2) Mécanismes d'action..... | 44 |
| B. Les ligands du récepteur LXR..... | 46 |
| 1) Les oxystérols..... | 46 |
| 2) Les agonistes synthétiques | 48 |
| 3) Les agonistes naturels..... | 49 |
| 4) Les antagonistes | 49 |
| III. Régulation du récepteur LXR | 51 |
| A. Le récepteur LXR sous le contrôle de récepteurs nucléaires | 51 |
| B. Compétition vis-à-vis du récepteur LXR | 51 |
| C. Régulation hormonale | 52 |
| IV. Rôle du récepteur LXR | 52 |
| A. Contrôle de l'homéostasie du cholestérol | 52 |
| 1) Rôle du récepteur LXR dans le transport inverse du cholestérol..... | 52 |
| a) Efflux cellulaire de cholestérol..... | 52 |
| b) Rôle du récepteur LXR dans la synthèse des acides biliaires..... | 53 |
| 2) Rôle du récepteur LXR dans l'absorption intestinale et l'élimination biliaire du cholestérol | 54 |
| 3) Rôle du récepteur LXR dans la captation cellulaire de cholestérol | 55 |

| | | |
|------|---|-----|
| B. | Régulation de la lipogénèse..... | 57 |
| 1) | Régulation des enzymes de la lipogénèse par LXR | 57 |
| 2) | Le récepteur LXR : un lien entre lipogénèse et métabolisme glucidique | 57 |
| 3) | Stimulation du récepteur LXR et risque de stéatose hépatique..... | 58 |
| C. | Rôle de LXR dans la régulation de l'inflammation | 58 |
| 1) | Effets anti-inflammatoires du récepteur LXR..... | 58 |
| a) | La transrépression..... | 59 |
| b) | Perturbations de la voie de signalisation des TLRs | 60 |
| 2) | Effets pro-inflammatoires du récepteur LXR..... | 62 |
| | ARTICLES..... | 65 |
| | PREMIER ARTICLE..... | 66 |
| I. | Introduction | 66 |
| II. | Specific enrichment of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine in carotid atheroma plaque from tpe 2 diabetic patients..... | 68 |
| III. | Résultats et discussion..... | 80 |
| | DEUXIEME ARTICLE | 84 |
| I. | Introduction | 84 |
| II. | A Liver X-Receptor- Hypoxia inducible factor 1 α interplay potentiates interleukine 1 β production in human macrophages..... | 86 |
| III. | Résultats et discussion..... | 187 |
| | CONCLUSION GENERALE | 191 |
| | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 194 |

Abréviations

11- HETE : acide 11-hydroxy- eicosatétraoïque
15-HETE: acide 15-hydroxy-eicosatétraoïque
AA: acide arachidonique
ABCA1: ATP-Binding cassette A1
ABCG1: ATP-Binding cassette G1
ABCG5: ATP-Binding cassette G5
ABCG8: ATP-Binding cassette G8
ACAT: acylCoA-cholestérol acyltransférase
ACC: acétyl-CoA Carboxylase
ACSL: acyl-CoAsynthétase
AF-1: Activation function 1
AF-2: Activation function 2
AGPI: acides gras polyinsaturés
AP-1 : protéine activatrice-1
APOA1: apoprotéine A1
APOB: apoprotéine B
APOE: apoprotéine E
ARNm : ARN messagers
ASC : adaptateur de la caspase-1
ASC-2: Activating Signal Co-integrator-2
ATP : adénosine tri-phosphate
AVC : accident vasculaire cérébral
CaMKII: calmoduline kinase II
CANTOS: Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study
CARD: caspase recruitment domain
CD36: cluster of differentiation 36
CETP : protéine de transfert des esters du cholestérol
CHOP : C/EBP homologous protein
ChREBP: carbohydrate response element binding protein
COX : cycloxygénase
CpG : cytosine phosphodiester bond guanine

CRP : protéine C-réactive
CYP450: cytochrome P450
CYP7A1 : cholestérol 7-alpha hydroxylase
DAMPs : danger associated molecular patterns
DBD : domaine de liaison de l'ADN
DFG: débit de filtration glomérulaire
DHA: acide docosahexaénoïque
EC50: concentration efficace médiane
EL: endothéliale lipase
Erk : Extracellular signal-regulated kinase
FABP4: fatty acid binding protein 4
FASN : Fatty Acid Synthase
FLAP: protéine activatrice de la 5-lipoxygénase
FXR: farnésyl X recpetor
GM-CSF: granulocyte monocyte colony-stimulating factor
GPS2: G protein pathway suppressor 2
HbA1c: hémoglobine glyquée
HDAC4: histone déacétylase 4
HDL: high density lipoprotein
HIF-1 α : Hypoxia-inducible Factor 1-alpha
HMG-CoA réductase: hydroxy-méthyl-glutary-CoA réductase
HRE: hypoxia response element
ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1
IDM: infarctus du myocarde
IDOL: inducible degrader of low-density lipoprotein receptor
IFN γ : interferon γ
IgG1: immunoglobuline de type 1
IgM: immunoglobuline de type M
IL: interleukine
IL-1Ra: récepteur antagoniste d'IL-1
IL-1RAcP : IL-1 receptor accessory protein
IL-1RI: récepteur de l'interleukine-1 de type I
IL-1RII: récepteur de l'interleukine-1 de type II
IMC : indice de masse corporelle

IMPROVE-IT : IMProved Reduction of Outcomes : Vytarin Efficacy International Trial
iNOS : oxyde nitrite synthase
Insig 2: insulin induced gene protein
IR: insuffisance rénale
IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF8: Interferon regulatory factor 8
JNK: Jun-N-terminal kinase
JUPITER: Justification for the Use of Statins in Prevention : an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin
LBD: domaine de liaison du ligand
LCAT: lécithine cholestérol acyl-transférase
LDL: low density lipoprotein
LDL-R: récepteur des LDL
LOX : lipoxygénase
Lp(a): lipoprotéine (a)
LPCAT-3 : lysophosphatidyl-choline acyl-transférase 3
LPL: lipoprotéine lipase
LPS: lipopolysaccharide
LTB1 : récepteur du LTB₄
LTB₄: leucotriène B₄
LXA₄: lipoxine A₄
LXR: Liver X Receptor
LXRE: Liver X Receptor Response Element
MAP-Kinases: Mitogen-Activated Protein kinase
MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF: macrophage colony-stimulating factor
MCV : maladies cardiovasculaires
MERTK: myéloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
mmHg : millimètres de mercure
MMPs: métalloprotéinases
MyD88: Myeloid differentiation primary response
NCoR: Nuclear receptor co-repressor
NF-κB: nuclear factor kappa B

NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3

NPC1: Niemann-Pick C1

NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1

NPC2: Niemann-Pick C2

ox-LDL: particule LDL oxydée

p38: p38 mitogen-activated protein kinase

PAMPs : pathogen associated molecular patterns

PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

PGC-1 α : coactivateur-1 α du récepteur PPAR γ

PGE₂ : prostaglandine E₂

PGH₂ : prostaglandine H₂

PLA1 : phospholipase A1

PLA2 : phospholipase A2

PLs : phospholipides

PLTP: protéine de transfert des phospholipides

PNPLA8 : PLA2 calcium indépendante gamma

PPAR α : peroxisome proliferator-activated-receptor-alpha

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated-receptor-gamma

PPRE: peroxisome proliferator-activated-receptor-alpha response element

PRECISE-IVUS: Plaque Regression with Cholesterol absorption Inhibitor or Synthesis inhibitor

pro-CASP-1: pro-caspase-1

pro-IL-1 β : pro-IL-1 β

PXR: pregnane X receptor

RAGE : receptor for advanced glycation end products

RE : réticulum endoplasmique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RTC: reverse transport cholesterol

RvD1: résolvine D1

RXR: Récepteur X des rétinoïdes

SCD1 : Stéaoryl-CoA Désaturase 1

SHP: small heterodimer partner

SMRT: Silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone receptor

SNP: single nucleotide polymorphisme
SPMs specialized pro-resolving lipid mediators
SRB1: récepteur scavenger B1
SRC-1: co-activateur du récepteur aux stéroïdes-1
SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein 1c
SREBP-2: sterol regulatory element binding protein 2
SUMO-2/3: small ubiquitin-like modifier 2/3
TGF- β : tumor growth factor- β
Th1: lymphocytes T helper de type 1
Th2: lymphocytes T helper de type 2
TLRs: toll-like receptors
TNF α : tumor necrosis factor α
TRAF-6: TNF receptor associated factor 6
Trég: lymphocytes T régulateurs
TXA₂: thromboxane A₂
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule -1
VLDL: very low density lipoprotein
VSMCs: vascular smooth muscle cells
WT: Wild-Type

Liste des figures et tables

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Schéma général de la physiopathologie d'une lésion d'athérosclérose..... | 15 |
| Figure 2 : Voies de biosynthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation..... | 26 |
| Figure 3 : Signalisation et rôles d'IL-1 β dans l'athérosclérose..... | 29 |
| Figure 4 : Production de l'interleukine-1 β par l'inflammasome NLRP3 | 31 |
| Figure 5 : Structure du récepteur LXR..... | 44 |
| Figure 6 : Modèle de transactivation du récepteur LXR..... | 45 |
| Figure 7 : Métabolites intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol | 46 |
| Figure 8 : Métabolite intermédiaire de la stéroïdogénèse | 46 |
| Figure 9 : Acides biliaires et certains de leurs précurseurs | 47 |
| Figure 10 : Dérivés hydroxylés du cholestérol | 47 |
| Figure 11 : Ligands synthétiques du récepteur LXR | 49 |
| Figure 12 : Modulation du transport inverse du cholestérol par le récepteur LXR | 56 |
| Figure 13 : Phénomène de transrépression par le récepteur LXR..... | 59 |
| Figure 14 : Perturbations de la voie de signalisation des TLRs par le récepteur LXR chez la souris | 61 |
| Figure 15 : Potentialisation de la réponse au LPS du récepteur TLR4 par le récepteur LXR chez l'Homme | 63 |
| Figure 16 : Voies de biosynthèse du 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine et de ses métabolites | 83 |
| Figure 17 : Schéma récapitulatif de la sécrétion d'IL-1 β en réponse à une stimulation des récepteurs LXR via un mécanisme dépendant d'HIF-1 α | 190 |
| Table 1 : Concentrations efficaces médianes ou inhibitrice médianes des principaux ligands de LXR..... | 50 |

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : ATHEROSCLEROSE

I. Epidémiologie et physiopathologie

A. Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de mortalité dans le monde et sont responsables de plus de 25% des décès¹. Les MCV résultent essentiellement du phénomène d'athérosclérose, maladie caractérisée par un dépôt lipidique progressif au niveau de l'intima des vaisseaux qui évolue et s'amplifie sur des années voire des décennies. Progressivement, apparaissent des plaques d'athérome qui lorsqu'elles se rompent, provoquent des événements thrombotiques. Chez les patients souffrant d'athérosclérose, plusieurs territoires vasculaires sont souvent atteints simultanément mais les formes les plus courantes sont les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Les artères périphériques peuvent également être touchées comme par exemple dans les artériopathies oblitérantes des membres inférieurs.

Depuis le milieu du XX^{ème} siècle, la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires a fortement chuté et cette diminution s'est particulièrement accélérée à la fin des années 80. Le risque de mourir d'un accident cardiovasculaire avant l'âge de 69 ans est ainsi passé de 16% en 1980 à 4% en 2010, hommes et femmes confondus². L'apparition de nouveaux marqueurs biochimiques diagnostiques de l'infarctus du myocarde, et notamment le dosage de troponine plasmatique, a beaucoup contribué à cette diminution. Néanmoins, si la mortalité due aux MCV ajustée sur l'âge a très nettement diminué, le nombre absolu de décès augmente puisque la population vieillit et que l'âge est le premier facteur de risque cardiovasculaire. D'autres facteurs de risque ont été clairement identifiés dont le tabagisme, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, l'insulino-résistance et l'obésité.

Le tabagisme a explosé au début du XX^{ème} siècle et ce n'est qu'au début des années 50 que ses risques sanitaires ont commencé à être dénoncés. En 1954, une étude rapporte que les fumeurs ont 1,6 fois plus de risque de décéder d'une cardiopathie ischémique ou d'un AVC que les non-fumeurs. Cette majoration du risque s'annule en cas d'arrêt du tabagisme avant l'âge de 30 ans et diminue de moitié en cas d'arrêt avant l'âge de 50 ans³. Le tabagisme favorise également l'hypertension artérielle dont une élévation de 20 mmHg, pour la pression diastolique, ou de 10 mmHg, pour la pression systolique, double le risque de MCV. Là

encore, cette élévation est réversible puisqu'une diminution de 15 mmHg de la pression diastolique correspond à une diminution de 17% du risque cardiovasculaire, quel que soit le traitement anti-hypertenseur prescrit ⁴.

Puisque c'est un dépôt de particules LDL (*low density lipoprotein*) qui est à l'origine de l'athérosclérose, les dyslipidémies représentent un facteur de risque cardiovasculaire majeur, et il existe une association positive entre le taux plasmatique de cholestérol total ou de cholestérol non-HDL (*high density lipoprotein*) et l'incidence des ischémies myocardiques. De plus, de nombreuses études ont démontré qu'une baisse de 1 mmol/L du taux de LDL-cholestérol réduit de 25% le risque d'infarctus du myocarde et de 20% le risque d'AVC ⁵. Enfin, l'apoprotéine B des LDL peut être attachée à une autre protéine, l'apoprotéine (a), formant ainsi la lipoprotéine (a) (Lp(a)), dont l'élévation est reconnue comme étant un facteur aggravant le risque d'AVC ⁶.

Le diabète est associé à des complications majeures comme les dyslipidémies, l'hypertension artérielle ou une inflammation chronique qui multiplient le risque cardiovasculaire par deux ⁷. Quand la maladie est équilibrée, ce risque peut être atténué et une diminution de 0.9% du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) diminue le risque coronarien de 15% ⁸. L'insuffisance rénale (IR) est également associée à une augmentation du risque cardiovasculaire. Cette pathologie chronique augmente la mortalité cardiovasculaire de 40% quand le débit de filtration glomérulaire (DFG) est compris entre 60 et 45 mL/min/1.73 m² et la multiplie par 3 en cas de DFG<30 mL/min/1.73 m². En effet, non seulement l'IR est une cause d'hypertension artérielle et de dyslipidémies, mais elle engendre également des perturbations du métabolisme phosphocalcique. Or, le risque cardiovasculaire augmente de 10% à chaque élévation de 0.3 mmol/L de la phosphatémie et les anomalies phosphocalciques favorisent la calcification de l'intima des vaisseaux ^{9,10}.

Enfin, l'épidémie d'obésité qui touche la planète ne cesse de gagner du terrain et le nombre d'individus atteints a été multiplié par 3 ces trente dernières années. Cette pathologie est caractérisée par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30kg/m². Or, à partir d'un IMC supérieur à 25 kg/m², la mortalité cardiovasculaire augmente de 8% tous les 1kg/m² ¹¹.

B. Physiopathologie

Les connaissances sur la physiopathologie de l'athérosclérose ont beaucoup progressé au cours du XX^{ème} siècle. Dans les années 50, les plaques d'athérome étaient considérées comme une simple obstruction de la lumière vasculaire par une accumulation passive de lipides. Les décennies qui ont suivi ont mis en évidence que ces lésions étaient évolutives et le lieu d'un remaniement vasculaire important. Enfin, à la fin du siècle, les études sur l'athérosclérose se sont progressivement focalisées sur les phénomènes inflammatoires qui sous-tendent la formation et l'évolution des plaques.

1) Initiation de la lésion au niveau de l'endothélium vasculaire

a) Mise en place de l'immunité innée

Les lésions athérosclérotiques se développent préférentiellement au niveau de la bifurcation des artères de moyen et de gros calibre. A cet endroit, des perturbations du flux sanguin laminaire génèrent des forces de cisaillement importantes perçues par les mécanorécepteurs des cellules endothéliales. Via un mécanisme de transduction cellulaire, les cellules endothéliales activent alors la voie NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et acquièrent un phénotype pro-inflammatoire¹². L'hypertension artérielle facilite ces transformations car l'angiotensine II sollicite également la voie NF- κ B via une transactivation cellulaire en cascade¹³. Ces modifications phénotypiques de l'endothélium sont renforcées par la rétention subendothéliale progressive au niveau de l'intima des vaisseaux de particules LDL circulantes¹⁴. Sous l'effet de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et chémoattractantes sécrétées par l'endothélium activé, des monocytes circulants et des polynucléaires neutrophiles affluent au site d'initiation de la lésion¹⁵. En réponse à ces cytokines, les cellules endothéliales expriment également différents facteurs d'adhésion comme VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), les E-sélectine et P-sélectine, qui permettent aux cellules recrutées d'adhérer à l'endothélium¹⁶. En même temps, les neutrophiles sécrètent des facteurs d'adhésion pour les monocytes et génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS)¹⁷. Dans cet environnement pro-inflammatoire et pro-oxydant, les particules LDL amassées vont subir des modifications et se transformer en lipoprotéines oxydées ou ox-LDL.

Les monocytes qui ont adhéré pénètrent la paroi artérielle sous l'influence de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) et se logent dans l'intima du vaisseau où ils se différencient en macrophages sous l'influence du M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*)^{18,19}. Une fois infiltrés, les macrophages expriment des récepteurs membranaires spécifiques, dits *scavengers*, capables de détecter et d'internaliser massivement les ox-LDL. Les particules LDL non modifiées peuvent également être phagocytées par les macrophages par pinocytose¹². Les macrophages se gorgent donc progressivement de cholestérol et deviennent des cellules spumeuses particulièrement pro-athérogènes. Les *Toll-Like Receptors* (TLRs) sont des récepteurs membranaires capables de reconnaître des signaux de danger comme des molécules provenant de micro-organismes infectieux (PAMPs : *pathogen-associated molecular patterns*) ou des composants issus de dommages tissulaires (DAMPs : *danger-associated molecular patterns*) afin d'activer la voie NF-κB et la réponse inflammatoire²⁰. En liant les TLRs macrophagiques, les ox-LDL activent massivement la voie NF-κB et donc la production de TNFα (*Tumor Necrosis Factor alpha*). Ils favorisent également le stress oxydatif mitochondrial qui induit la sécrétion de MCP-1 et le recrutement et l'activation de nouveaux monocytes^{21,22}. Un cercle vicieux se met donc en place : les macrophages recrutés et activés au sein de la lésion entretiennent l'inflammation des cellules endothéliales qui perpétuent le recrutement leucocytaire. La lésion s'amplifie.

Dans ce micro-environnement pro-inflammatoire, les cellules musculaires lisses du vaisseau (VSMCs : *vascular smooth muscle cells*) subissent des modifications phénotypiques et fonctionnelles pour maintenir un flux sanguin le plus laminaire possible. Les cellules passent ainsi d'un état quiescent et contractile à un phénotype pro-inflammatoire. Sous l'influence des particules ox-LDL et de l'angiotensine II qui activent la voie NF-κB, les VSMCs expriment à leur tour VCAM-1 et ICAM-1, et favorisent le recrutement et l'adhésion de nouveaux monocytes. Elles sécrètent aussi de l'interleukine-6 (IL-6) et MCP-1 pour permettre l'extravasation et l'activation des monocytes recrutés. De plus, les VSMCs se mettent à proliférer et à migrer au niveau de la paroi vasculaire. Le but de ce remaniement est d'isoler le cœur lipidique et inflammatoire des éléments thrombogènes du sang. Les VSMCs augmentent ainsi la teneur en collagène de la matrice extracellulaire pour constituer une chape fibreuse^{12,23}.

b) Mise en place d'une immunité adaptative secondaire

A l'instar des monocytes-macrophages et de quelques polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes vont également progressivement gagner la plaque d'athérome. Une réponse immunitaire adaptative se met en place qui participe au développement de la lésion.

Des fragments d'apoprotéines B100 issues des ox-LDL sont présentés en tant qu'antigènes par les macrophages et les cellules dendritiques aux lymphocytes T CD4 au niveau du noyau lymphatique le plus proche de la lésion ²⁴. Les lymphocytes pénètrent à leur tour dans la lésion grâce aux molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales. Au contact des ox-LDL et en présence d'IL-12 et d'IL-18 sécrétées par les macrophages, ils se différencient en lymphocytes T *helper* de type 1 (Th1). Les Th1 produisent de l'interféron gamma (IFN γ) qui stimule la sécrétion cytokinique pro-inflammatoire des macrophages et l'activation des cellules endothéliales ^{25,26}. Ces cytokines entretiennent la migration et la prolifération des VSMCs ainsi que leur sécrétion d'IL-6 et d'interleukine-1 β (IL-1 β) pro-inflammatoires. En présentant les antigènes issus de la lésion aux lymphocytes T pour favoriser l'activation des Th1, les cellules dendritiques initient l'instauration d'un profil cytokinique pro-inflammatoire dans la lésion. Néanmoins, il a été décrit que les cellules dendritiques ont également la capacité de contrebalancer ces effets pro-athérogènes en contribuant à réguler les taux de cholestérol circulants ²⁷. Les cellules dendritiques peuvent également présenter les antigènes issus des ox-LDL aux lymphocytes T régulateurs (Trég) qui vont sécréter de l'IL-10 anti-inflammatoire et du TGF- β (*tumor growth factor* β) qui stabilisent la lésion ^{16,28,29}. Mais le rôle anti-inflammatoire des Trég au sein de la lésion est finalement insuffisant pour lutter contre le micro-environnement pro-inflammatoire de la plaque d'athérome ³⁰.

Moins nombreux au sein de la plaque, les lymphocytes T *helper* de type 2 (Th2) ont un rôle plus controversé. Ils seraient athéroprotecteurs en sécrétant de l'IL-4 inhibitrice de la production d'IFN γ par les Th1 ³¹. L'IL-4 favorise également la production de lymphocytes B1 et la synthèse d'immunoglobulines de type M (IgM) dirigées contre les apoprotéines B100 des ox-LDL pour bloquer leur entrée dans les macrophages ³². Certaines études ont d'ailleurs cherché à mettre à profit ce phénomène en développant des modèles animaux de vaccination par des ox-LDL pour générer une immunité protectrice qui atténuerait le développement de l'athérosclérose ³³.

Ainsi, au sein des plaques d'athérome, cohabitent des macrophages, des lymphocytes et des cellules vasculaires qui ont acquis un phénotype pro-inflammatoire. Les lésions comportent également des zones acellulaires lipidiques et sont entourées d'une matrice extracellulaire collagénique.

2) Evolution de la plaque d'athérome : passage à la vulnérabilité

a) Hétérogénéité des macrophages de la lésion

Les macrophages présentent des phénotypes distincts en fonction des marqueurs cellulaires qu'ils expriment, des molécules qu'ils sécrètent, et de leur rôle fonctionnel. Les macrophages M1 ont un phénotype pro-inflammatoire et sont activés par le lipopolysaccharide (LPS), l'IFN γ , et le TNF α . Ils sécrètent de l'IL-1 β , de l'IL-6, du TNF α et produisent de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la NADPH oxydase. A l'inverse, les macrophages M2, à l'exception des macrophages M2b, acquièrent un phénotype anti-inflammatoire et sécrètent de l'IL-10, du TGF β et de l'IL-4³⁴. Cette dichotomie reste néanmoins assez schématique et n'est pas aussi marquée chez l'Homme que chez la souris. Au sein d'une plaque d'athérome, les monocytes-macrophages présentent une certaine hétérogénéité. Leur phénotype est en grande partie déterminé par les lipides oxydés de la plaque ainsi que par les stimuli pro-inflammatoires des cellules environnantes. Ainsi, le corps nécrotique est riche en macrophages M1 et les macrophages M2 sont préférentiellement retrouvés dans les régions plus stables de la lésion où ils tentent d'assurer la clairance des cellules apoptotiques et une production de collagène²⁶. La balance M1/M2 évolue au cours du temps et conditionne la stabilité de la lésion.

b) Vulnérabilité de la plaque et risque de thrombose vasculaire

Une plaque d'athérome est le siège d'une inflammation à bas bruit qui évolue sur des mois voire des années. Dans les premiers stades de la maladie, cette inflammation est en partie contrebalancée par la présence de lymphocytes Trég et de macrophages M2 qui sécrètent des cytokines anti-inflammatoires et du TGF β pour consolider la lésion. Néanmoins, avec le temps, les stimuli pro-inflammatoires prennent le dessus. La plaque grossit, s'enflamme et tend à se rompre : on parle de passage à la vulnérabilité de la plaque. La vulnérabilité des plaques d'athérome est conditionnée par deux mécanismes concomitants : i) la nécrose du cœur lipidique et ii) l'amincissement de la chape fibreuse.

i. Nécrose du cœur lipidique

L'accumulation d'ox-LDL provoque un stress oxydatif du reticulum endoplasmique (RE) qui conduit progressivement à l'apoptose des macrophages spumeux. La protéine pro-apoptotique CHOP (*C/EBP homologous protein*) stimule la voie de l'inositol-3-phosphate ce qui induit une augmentation du calcium cytosolique et active la calmomoduline kinase II (CaMKII). La cascade d'activation de la CaMKII génère l'apparition de récepteurs de mort cellulaire. La protéine CHOP est également responsable d'une diminution de l'expression de la protéine de survie bcl-2¹². Une corrélation positive entre le degré de vulnérabilité de plaques d'athérome d'artères coronaires et de carotides et l'expression de CHOP a d'ailleurs été décrite^{35,36}. Dans la plaque, le nombre de cellules apoptotiques augmente et comme leur clairance macrophagique n'est pas fonctionnelle, elles s'accumulent et se nécrosent. C'est le clivage excessif du récepteur MERTK (*myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*) qui est en partie responsable de ce déficit de phagocytose puisque sa partie soluble MER entre en compétition avec les cellules apoptotiques et empêche leur clairance. Une étude a pu mettre en évidence une surexpression de MERTK et des protéines impliquées dans son clivage dans des plaques d'athérome humaines issues d'endartériectomies carotidiennes et relie ainsi défaut d'efférocytose et nécrose de la plaque³⁷.

ii. Rupture de la plaque d'athérome

Tout comme les macrophages du cœur lipidique, les cellules endothéliales et les VSMCs de la plaque d'athérome peuvent entrer en apoptose. Les VSMCs sont les principales cellules productrices de collagène. L'appauvrissement de la lésion en VSMCs s'accompagne donc automatiquement d'un amincissement de la chape fibreuse. Sous l'influence de l'IFN γ produit par les Th1, les macrophages produisent des métalloprotéinases (MMPs) et des collagénases qui sont des enzymes qui digèrent et amenuisent la matrice extracellulaire de la plaque d'athérome. La plaque d'athérome est fragilisée dans sa structure et risque de se rompre. Les phospholipides, le facteur tissulaire et les molécules de la matrice extracellulaire, sont alors autant d'éléments thrombogènes mis à nu qui entrent en contact avec les plaquettes sanguines. L'activation plaquettaire et la mise en place de la cascade de la coagulation aboutissent à la formation d'un thrombus responsable d'une ischémie locale ou d'une embolie à distance³⁸.

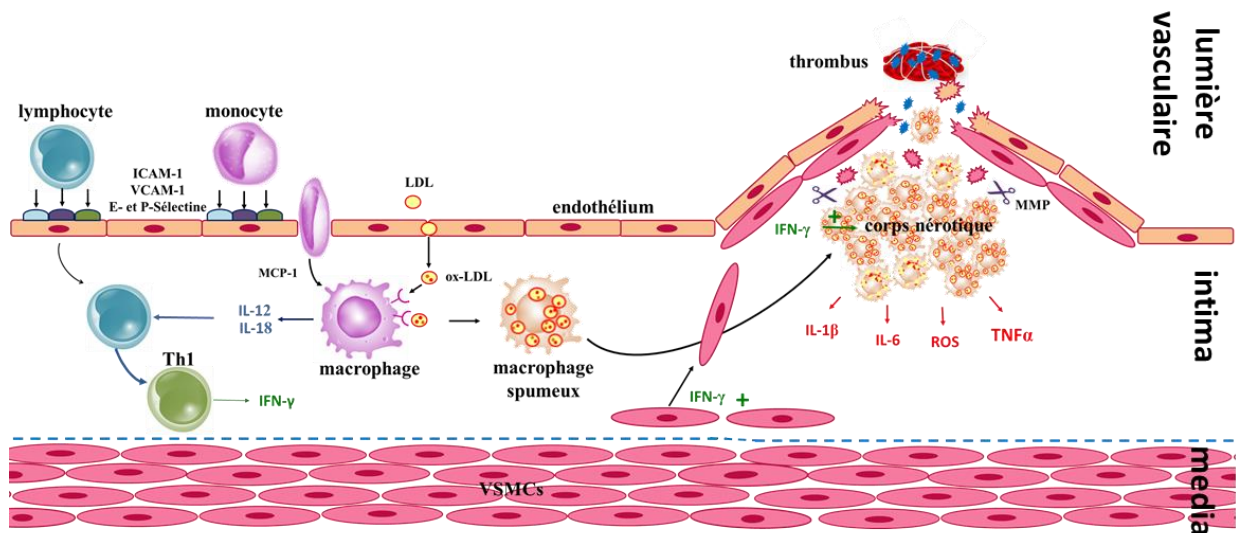


Figure 1 : Schéma général de la physiopathologie d'une lésion d'athérosclérose

Les monocytes circulants adhèrent à l'endothélium activé et transloquent au niveau de l'intima des vaisseaux où ils se gorgent de particules LDL infiltrées et oxydées pour devenir des macrophages spumeux. Les macrophages spumeux s'accumulent, forment le corps nécrotique et sécrètent massivement des cytokines pro-inflammatoires. Sous l'influence de l'IFN γ sécrété par les lymphocytes Th1, les VSMCs migrent et entourent le corps nécrotique. Apparaissent des métalloprotéinases qui déstabilisent la lésion et provoquent la rupture de la plaque et la formation d'un thrombus.

ICAM-1 : intracellular adhesion molecule-1 ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1 ; Th1 : lymphocyte T helper de type 1 ; MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1 ; LDL : low density lipoprotein ; ox-LDL : particule LDL oxydée ; IFN γ : interféron γ ; MMPs : métalloprotéinases ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; TNF α : tumor necrosis factor α ; IL : interleukine ; VSMCs : vascular smooth muscle cells

II. L'athérosclérose : une maladie liée au cholestérol

A. Homéostasie cellulaire du cholestérol

Le cholestérol est essentiel pour l'organisme. Constituant majeur des membranes, il participe également à la stéroïdogénèse, ainsi qu'à la synthèse des acides biliaires et de la vitamine D. Le cholestérol est insoluble dans le plasma où il est transporté au sein de lipoprotéines. Les lipoprotéines comportent un cœur hydrophobe constitué de cholestérol estérifié et de triglycérides, et une enveloppe hydrophile qui regroupe des phospholipides, du

cholestérol libre et des apoprotéines. Les particules LDL sont de grosses lipoprotéines dont le cœur lipidique est riche et entouré essentiellement d'apoprotéine B (APOB).

Les concentrations intracellulaires de cholestérol sont finement régulées. Les particules LDL sont captées par les cellules grâce à leur récepteur membranaire LDL-R. Le complexe LDL-LDL-R est alors internalisé et rejoint l'endosome tardif où le récepteur LDL-R est recyclé et le cholestérol libéré pour diffuser dans les différentes organelles et gagner la membrane plasmique. Au niveau du RE, l'excès de cholestérol est estérifié sous forme de gouttelettes lipidiques. A l'inverse, quand la concentration en cholestérol du RE est inférieure à 5%, le facteur de transcription SREBP-2 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-2*) quitte le RE et gagne l'appareil de Golgi pour être clivé³⁹. Ainsi activé, SREBP-2 induit la transcription de certains gènes contrôlant le métabolisme du cholestérol, notamment le gène de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase) ainsi que le gène *LDLR*. L'internalisation des particules LDL est donc un processus très contrôlé.

B. L'athérosclérose et cholestérol : données physiopathologiques, épidémiologiques et expérimentales

1) Rappels historiques

Léonard de Vinci est le premier à avoir évoqué des lésions d'athérosclérose. Il décrit que chez les personnes âgées, un épaississement de la tunique du vaisseau empêche une bonne circulation du sang⁴⁰. Quelques siècles plus tard, en 1799, Caleb Hillier Parry découvre au cours d'une autopsie la présence d'une substance graveleuse, ressemblant à du plâtre dans des artères coronaires⁴¹. A la fin du XVIII^{ème} siècle, Rudolph Virchow décrit que l'athérosclérose est initiée par une blessure locale au niveau de l'intima du vaisseau, qu'il appelle « *endarteritis deformans* », et suivie d'une fibrose réactionnelle en plusieurs étapes⁴². Par la suite, Ignatowski observe que des lapins nourris avec du lait ou des jaunes d'œuf développent de sévères lésions d'athérosclérose⁴¹. En 1913, Anitschkow approfondit l'étude des effets du régime alimentaire sur le développement des plaques d'athérome et démontre que la sévérité des lésions athérosclérotiques chez des lapins est proportionnelle au taux de cholestérol consommé. Il en conclut que c'est le cholestérol qui provoque des modifications au niveau de l'intima des vaisseaux de lapin et que le processus est très similaire chez l'Homme⁴³.

2) L'étude de Framingham

L'étude Framingham Heart Study (FHS) est une cohorte prospective observationnelle initiée en 1948 au sein de la ville de Framingham par le National Heart Institute. Le but initial de cette étude, réalisée sur autant d'hommes que de femmes tous âgés de 28 à 62 ans, était de pouvoir identifier des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires afin d'établir des politiques de prévention primaire et secondaire. Les sujets de la cohorte sont suivis tous les deux à quatre ans depuis le début de l'étude et les données recueillies au cours des dernières décennies ont permis de mieux caractériser le risque cardiovasculaire. Plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire ont rapidement pu être identifiés : un taux élevé de cholestérol, l'âge, le sexe masculin, l'hypertension artérielle, le diabète et l'hypertrophie ventriculaire ⁴⁴. Il est également apparu que le risque lié à un facteur pouvait très fortement être modulé par les autres facteurs ce qui a introduit la notion de risque multivariable et a permis par la suite la création d'algorithmes prédictifs.

L'analyse des données lipidiques des sujets a permis de mettre en évidence un lien étroit entre taux de cholestérol total et risque cardiovasculaire puisqu'à chaque élévation de 10mg/dL de la cholestérolémie totale, la mortalité cardiovasculaire augmente de 9% ⁴⁵. L'étude des différentes fractions de lipoprotéines a révélé une association positive forte entre le taux de LDL-cholestérol et l'incidence des MCV, et à l'inverse, une association négative entre le taux de HDL-cholestérol et l'incidence des MCV ⁴⁶. Les ratios LDL-cholestérol/HDL-cholestérol et cholestérol total/HDL-cholestérol se sont également avérés être de bons facteurs prédictifs du risque cardiovasculaire ⁴⁷. Le rapport cholestérol total/HDL-cholestérol est d'ailleurs pris en compte dans le calcul du score de Framingham, qui permet d'estimer le risque cardiovasculaire d'un individu à 10 ans et qui a été établi grâce aux différentes données recueillies au cours de l'étude. Ce score prend également en considération l'âge, le sexe, la mesure de la pression artérielle et le tabagisme ^{48,49}.

En 1971 et en 2002, deux nouvelles cohortes ont démarré au sein de l'étude FHS, la première incluant les enfants des participants de la première cohorte et la seconde incluant leurs petits-enfants. Ces nouvelles inclusions et les progrès de la génétique moléculaire au cours des années 2000, ont permis de mettre en évidence le caractère partiellement héréditaire des MCV et d'en étudier les facteurs génétiques. Des études ont ainsi mis en évidence une association entre MCV et plusieurs variants de certains SNP (*single nucleotide polymorphism*) situés sur une trentaine de *loci* impliqués dans l'expression de protéines qui permettent de réguler le métabolisme des lipoprotéines et notamment du LDL-cholestérol. Il semble

également qu'il existe un effet cumulatif de ces variants responsable de dyslipidémies polygéniques^{50,51}.

3) Causes multifactorielles de l'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie est caractérisée par un taux de cholestérol total ≥ 5 mmol/L et concerne 38% de la population adulte mondiale⁵². Cette hypercholestérolémie est classiquement associée à une élévation du taux de LDL-cholestérol plasmatique qui traduit souvent un défaut d'internalisation cellulaire. Dans ce cas, les particules LDL circulantes stagnent dans la circulation et vont s'infiltrer au niveau de la paroi des vaisseaux pour initier la formation de plaques d'athérome. Ces anomalies résultent d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Il arrive en effet que des individus présentent des mutations au niveau des gènes impliqués dans la clairance plasmatique du LDL-cholestérol. Des particules LDL se déposent donc dans les vaisseaux depuis la naissance ce qui s'associe à un risque de développer des maladies cardiovasculaires précoces. On parle d'hypercholestérolémie familiale. Les mutations génétiques les plus fréquemment retrouvées concernent le gène *LDLR* (93%) mais le gène *APOB* peut aussi être touché (5%) ainsi que le gène *PCSK9* et des atteintes polygéniques sont également possibles⁵³. Indépendamment ou parfois surajoutées à ces facteurs génétiques, de mauvaises habitudes alimentaires et une sédentarité excessive, entraînent également une hypercholestérolémie. Si les graisses saturées d'origine alimentaire conditionnent fortement le taux de LDL-cholestérol, elles entraînent aussi une augmentation des acides gras libres. Ces anomalies lipidiques, d'autant plus si elles sont associées à une élévation de l'insulinémie, provoquent un stress du RE avec une activation anormale de SREBP-2 et une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol⁵⁴. Le diabète, l'obésité et le syndrome métabolique, sont donc autant de situations favorables à une hypercholestérolémie et au développement des MCV associées.

C. Traiter l'hypercholestérolémie pour traiter l'athérosclérose

De nombreux essais cliniques ont démontré l'importance et l'efficacité d'une diminution des taux de LDL-cholestérol dans la prévention primaire ou secondaire des MCV. Les particules LDL sont un des éléments constitutifs de la plaque d'athérome puisqu'elles s'infiltrent dans la paroi vasculaire. Une corrélation positive entre la réduction des taux de LDL-cholestérol et de cholestérol non-HDL circulants et la régression de plaques d'athérome coronariennes humaines a d'ailleurs été décrite^{55,56}.

1) Les statines

Les statines sont parmi les premières thérapies hypocholestérolémiantes à avoir été développées à la fin des années 70. La pharmacologie des statines repose sur l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol et plus précisément de la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate. Les statines sont en effet des analogues de substrat pour la HMG-CoA réductase qui modifient légèrement la conformation de l'enzyme et la rendent non fonctionnelle. En diminuant la synthèse *de novo* du cholestérol, les statines entraînent une augmentation compensatoire de l'internalisation des particules LDL circulantes par les LDL-R hépatiques. L'efficacité des statines dans la réduction de la morbi-mortalité cardiovasculaire a largement été démontrée et leur pouvoir hypocholestérolémiant est associé à une stabilisation voire une régression des plaques d'athérome chez des patients atteints de maladie coronarienne ⁵⁷⁻⁵⁹. Néanmoins, certains patients présentent une hypercholestérolémie résistante à un traitement intensif par statines, et conservent un risque élevé de développer des maladies cardiovasculaires ⁶⁰. C'est pourquoi, au cours des dix dernières années, de nouvelles approches thérapeutiques se sont développées. Elles associent nouvelles molécules pharmacologiques hypocholestérolémiantes et recours aux thérapies combinées.

2) Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol

Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol sont des hypocholestérolémiants prescrits seuls ou en bithérapie avec les statines depuis le début des années 2000. En interagissant avec le récepteur NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) au niveau de la membrane apicale des entérocytes du jéjunum proximal, ils empêchent l'absorption des acides biliaires et du cholestérol d'origine alimentaire ⁵². Les inhibiteurs du récepteur NPC1L1, comme l'ézetimibe, peuvent réduire jusqu'à 20% le taux de LDL-cholestérol plasmatique et sont prescrits en prévention primaire ou secondaire des MCV, soit en monothérapie chez les patients intolérants aux statines, soit en bithérapie chez les patients non répondeurs aux statines ⁶¹. En effet, plusieurs études ont démontré une nette diminution du risque cardiovasculaire avec un traitement hypocholestérolémiant qui associe statines et ézetimibe ⁶². Parmi elles, l'essai clinique IMPROVE-IT (IMProved Reduction of Outcomes : Vytorin Efficacy International Trial) met en évidence une réduction supplémentaire de 2% du risque cardiovasculaire et de 0.4 mmol/L du taux de LDL-cholestérol chez des patients hospitalisés pour un syndrome coronarien aigu et traités par statines et ézetimibe par rapport aux patients traités par statines seules ⁶³. La même année, l'étude PRECISE-IVUS (Plaque

REgression with Cholesterol absorption Inhibitor or Synthesis inhibitor Evaluated by Intravascular Ultrasound) démontre une régression supplémentaire de 17% du volume des plaques d'athérome coronariennes chez des patients traités par atorvastatine et ézetimibe par rapport aux patients traités par atorvastatine seule ⁶⁴. Ce gain d'efficacité s'explique par le fait qu'en inhibant l'absorption du cholestérol, l'ézetimibe contrecarre l'augmentation compensatoire de l'absorption des lipides intestinaux provoquée par les statines.

3) Les inhibiteurs de la Proprotéine Convertase Subtilisin/Kexin type 9

En 2003, la découverte de la sérine protéase PCSK9 (*Proprotéine Convertase Subtilisin/Kexin type 9*) permet de mieux appréhender les mécanismes moléculaires à l'origine de la captation cellulaire des particules LDL. La protéine PCSK9 induit des changements conformationnels du récepteur LDL-R qui conduisent à sa dégradation au niveau du lysosome. La diminution du nombre de récepteurs LDL-R disponibles au niveau hépatique et cellulaire entraîne une augmentation du taux de LDL-cholestérol ⁶⁵. Il a ainsi été décrit que des mutations gain de fonction du gène *PCSK9* sont associées à une hypercholestérolémie et à l'inverse, des mutations perte de fonction se traduisent par une diminution du taux de LDL-cholestérol et du risque cardiovasculaire ⁶⁶. La protéine PCSK9 est rapidement apparue comme étant une cible prometteuse dans le traitement des MCV et plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9 ont été développés : alirocumab, evolocumab, et bococizumab. Une étude clinique a ainsi comparé le taux de LDL-cholestérol et le degré de régression de plaques d'athérome coronariennes entre 484 patients traités par statines et evolocumab et 484 patients traités par statines seules. Les résultats indiquent une diminution de 56.5 mg/dL du taux de LDL-cholestérol dans le groupe sous bithérapie alors que ce taux reste inchangé chez les patients traités uniquement par statines. De plus, les patients sous evolocumab et statines présentent une réduction des lésions coronariennes de 60 % contre 47% pour les patients sous statines seules ⁶⁷.

Les nouvelles thérapeutiques hypocholestérolémiantes permettent donc une meilleure protection contre le risque cardiovasculaire fondée essentiellement sur leur capacité à diminuer massivement le taux plasmatique de particules LDL pour limiter leur infiltration vasculaire et le développement des plaques d'athérome. Néanmoins, en dépit d'un contrôle efficace du taux de cholestérol, 2/3 des patients développent malgré tout des évènements cardiovasculaires secondaires ⁶⁸. Les phénomènes inflammatoires qui sous-tendent le développement des plaques d'athérome, et plus particulièrement la constitution du cœur

nécrotique, pourraient expliquer en grande partie qu'une diminution du cholestérol plasmatique ne soit pas suffisante pour contrôler l'évolution de l'athérosclérose.

III. L'athérosclérose : une maladie inflammatoire chronique

A. Théorie de l'inflammation dans l'athérosclérose

Au niveau de la plaque d'athérome, l'inflammation initie le recrutement cellulaire, entretient la croissance de la lésion vasculaire puis favorise la rupture de la plaque et la thrombose. La protéine C-réactive (CRP) est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation majoritairement synthétisée par le foie en réponse à de nombreux stimuli pro-inflammatoires. La CRP est rapidement devenue le principal biomarqueur de l'inflammation d'autant que son dosage en routine est simple et peu coûteux. Les dommages tissulaires causés par la formation de la plaque d'athérome sont responsables d'une augmentation des taux de CRP et plusieurs études au cours des 20 dernières années ont pu mettre en évidence une élévation des concentrations de CRP chez des patients souffrant de syndrome coronarien ^{69,70}. Une élévation de la CRP est donc à présent considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire, au même titre que l'hypertension artérielle ou la dyslipidémie ⁷¹. Certes, la CRP est augmentée dans de nombreuses situations inflammatoires, mais d'une part, les taux de CRP chez un sujet sans infection sont stables au cours du temps, et d'autre part, les patients à risque de développer une maladie cardiovasculaire ont des taux significativement inférieurs à ceux ayant une maladie inflammatoire chronique (lupus, polyarthrite rhumatoïde...) ⁷². Ainsi, en tenant compte du taux de CRP dans l'algorithme de Framingham, et en considérant les taux de CRP parmi les plus élevés, le risque relatif de développer une maladie cardiovasculaire est multiplié par environ 1,5 ⁷¹.

Les statines sont abondamment prescrites dans le traitement des MCV. A la suite de nombreux essais cliniques sur l'efficacité des statines dans la prévention du risque cardiovasculaire, il est progressivement apparu qu'indépendamment de leur effet sur les taux plasmatiques de LDL-cholestérol, les statines diminuaient significativement les taux de CRP ^{73,74}. L'étude JUPITER (Justification for the Use of Statins in Prevention : an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin) réalisée sur 17802 individus avec des taux de CRP supérieurs à 2 mg/L mais des taux de LDL-cholestérol inférieurs à 130mg/dL, a ainsi pu montrer que les statines pouvaient réduire l'incidence d'un premier événement cardiovasculaire de 40% ⁷³.

Une seconde étude a mesuré l'incidence d'évènements cardiovasculaires chez des sujets sans pathologie cardiovasculaire connue mais classés en quatre groupes selon leur taux de CRP, élevés ou normaux, et leur taux de LDL-cholestérol associés, élevés ou normaux. Les résultats démontrent que le traitement par statine est aussi efficace dans la prévention du risque cardiovasculaire chez les patients avec un taux de LDL-cholestérol élevé que chez ceux où seul le taux de CRP est élevé⁷⁵. Un traitement par statines associé à un suivi des taux de CRP est donc efficace dans la prévention du risque cardiovasculaire même en l'absence d'hypercholestérolémie. Néanmoins, ces deux études n'ont pas pu démontrer qu'il existait une réelle réduction du risque cardiovasculaire avec un traitement dont l'unique effet thérapeutique serait anti-inflammatoire.

B. Rôle des acides gras et des médiateurs lipidiques dans la plaque d'athérome

Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées au niveau de la lésion vasculaire sont essentielles pour le développement de la plaque d'athérome. Le rôle d'une cytokine particulièrement importante, l'IL-1 β sera discuté ultérieurement.

La composition en acides gras de la membrane plasmique des cellules de l'inflammation est toute aussi importante et influe beaucoup sur la réponse et les fonctions cellulaires. Non seulement la composition des membranes joue sur l'organisation des rafts lipidiques et la constitution des récepteurs cellulaires, mais les différents acides gras présents sont à l'origine de la synthèse de nombreux médiateurs lipidiques qui modulent la réponse inflammatoire.

1) Synthèse de prostaglandines et de leucotriènes pro-inflammatoires

La première étape de la réponse inflammatoire vise à favoriser l'afflux sanguin des cellules immunitaires et à augmenter la perméabilité vasculaire pour permettre leur extravasation au niveau du site inflammatoire. Les leucocytes sécrètent alors de nombreux médiateurs pro-inflammatoires dont les prostaglandines et les leucotriènes. Ces médiateurs lipidiques sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique (AA) contenu dans les phospholipides (PLs) membranaires. Les monocytes circulants d'un adulte contiennent en moyenne 15 à 20 % d'acide arachidonique par rapport aux acides gras totaux. L'acide arachidonique dérive en grande partie de son précurseur, l'acide linoléique, qui est le principal acide gras polyinsaturé retrouvé dans l'alimentation dans la plupart des régimes occidentaux

⁷⁶. Notre groupe a récemment montré que les macrophages sont capables de synthétiser de manière autonome de l'AA à partir de ce précurseur⁷⁷. En réponse à un stimulus pro-inflammatoire, la phospholipase A2 (PLA2) libère l'AA en position sn-2 des phospholipides membranaires, classiquement des phosphatidylcholines. Une fois libéré, l'AA est transformé en prostaglandine H₂ (PGH₂), précurseur commun de tous les prostanoïdes, par une cycloxygénase (COX1 ou COX2) ou en leucotriènes par une lipoxygénase (LOX).

a) Mobilisation de l'acide arachidonique et synthèse de prostaglandine E₂

Parmi les nombreuses prostaglandines dérivées de l'AA, la prostaglandine E₂ (PGE₂) est un acteur important de la réponse inflammatoire grâce à ses propriétés vasodilatatrices nécessaires à la perméabilité vasculaire. La PGE₂ favorise également la fièvre et la douleur caractéristiques de la réponse inflammatoire, ainsi que la production d'IL-6 qui entretient l'inflammation⁷⁸. Les taux de PGE₂ produits sont directement corrélés à la quantité d'AA libre disponible. Les taux intracellulaires d'AA résultent d'un équilibre entre son entrée dans le métabolisme des prostanoïdes, et son stockage dans les membranes plasmiques cellulaires. Pour être incorporé dans les PLs, l'AA doit au préalable être pris en charge par la protéine FABP4 (*Fatty Acid Binding Protein 4*) puis être activé en arachidonoyl-CoA par une acyl-CoA synthase (ACSL). L'adipokine FABP4 est impliquée dans la physiopathologie de l'athérosclérose et la mesure des taux de FABP4 dans des lésions athéromateuses a révélé une corrélation positive entre les concentrations en FABP4 et la taille du cœur lipidique, le degré d'infiltration macrophagique et les phénomènes hémorragiques. Cette protéine apparaît donc comme un marqueur de vulnérabilité de la plaque d'athérome⁷⁹.

En favorisant le *turn-over* de l'AA dans les PLs membranaire, ACSL1 est particulièrement impliquée dans la réponse inflammatoire de la cellule. Une étude démontre que des macrophages murins traités par du LPS, de l'IFN γ ou du TNF α présentent une induction de ACSL1 secondaire à la stimulation des complexes TLR4 et à l'activation de JNK1 et JNK2 (*Jun-N-terminal kinases 1 et 2*)⁸⁰. Le diabète est une maladie inflammatoire chronique associée à un risque accru de maladies cardiovasculaires. Or, des monocytes de patients atteints de diabète de type 1 présentent une augmentation significative des ARN messagers (ARNm) codants pour *ACSL1*. Des monocytes de souris diabétiques présentent la même élévation des ARNm d'*Acs11* et également un taux intracellulaire d'AA accru et une augmentation de la sécrétion de PGE₂⁸¹. La synthèse de PGE₂ semble donc particulièrement

active au sein des plaques d'athérome où elle participe largement à l'entretien du foyer inflammatoire et à la croissance du cœur nécrotique.

b) Le thromboxane A₂

La thromboxane synthase transforme la PGH₂ en thromboxane A₂ (TXA₂), élément thrombogène qui active l'agrégation plaquettaire. Les propriétés antiagrégants plaquettaires de l'aspirine lui sont conférées par sa capacité à bloquer la synthèse de TXA₂ en inhibant en amont l'activité enzymatique de la COX. Le TXA₂ agit via un récepteur cellulaire à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Une étude réalisée sur des souris *Ldlr*^{-/-} a mis en évidence que bloquer le récepteur du TXA₂ par un antagoniste ralentissait significativement la progression de l'athérosclérose⁸². Les monocytes-macrophages humains circulants expriment la TXA₂ synthase et sont capables de sécréter du TXA₂. La présence de TXA₂ synthase a d'ailleurs été décrite dans des plaques d'athérome issues de patients ayant subi une endartériectomie carotidienne. Le marquage immunohistochimique de la TXA₂ synthase était plus important dans les lésions des patients ayant récemment eu un évènement thrombotique⁸³. Il semble donc qu'il y ait formation de TXA₂ au sein de la plaque d'athérome en développement lequel peut alors participer activement à la formation du thrombus lors de la rupture de la plaque.

c) Le leucotriène B₄

Le leucotriène B₄ (LTB₄) provient de la voie des lipoxygénases et notamment de l'action de l'enzyme LOX-5 sur l'AA. Le LTB₄ est présent dans les plaques d'athérome et une élévation de la protéine activatrice de LOX-5 (FLAP), qui favorise la production de LTB₄, a été mesurée dans des macrophages de plaques d'athérome de souris *Apoe*^{-/-}⁸⁴. Des patients présentant un variant du gène *ALOX5AP* ont également été décrits comme ayant plus de risque d'avoir un infarctus du myocarde ou un AVC⁸⁵. En agissant via son récepteur cellulaire LTB1, le LTB₄, massivement produit par les macrophages et les polynucléaires, favorise le chémotactisme et l'adhésion leucocytaires qui contribuent à la croissance et à l'inflammation de la lésion vasculaire⁷⁸. La présence du récepteur LTB1 a été mise en évidence dans des plaques d'athérome carotidien humaines où il est colocalisé avec les macrophages, les cellules endothéliales et les VSMCs de la lésion⁸⁶.

2) Oxydation des acides gras et inflammation de la plaque d'athérome

Les prostaglandines et les leucotriènes ne sont pas les seules espèces lipidiques oxydées qui interviennent dans la physiopathologie des lésions athéromateuses. En effet, la formation d'une plaque d'athérome est en grande partie initiée par une infiltration progressive de particules LDL qui subissent des phénomènes d'oxydation dans la paroi vasculaire. La plaque d'athérome contient donc de nombreux acides gras oxydés. Une étude réalisée sur une dizaine de plaques d'athérome carotidien humaines a ainsi cherché à extraire puis à doser ces espèces lipidiques oxydées. Les résultats révèlent que les plaques d'athérome contiennent des taux élevés d'acide hydroxy-octadécanoïque, dérivé oxydé de l'acide linoléique, et d'acides 15-hydroxy- et 11-hydroxy-eicosatétranoïque (15-HETE et 11-HETE), dérivés oxydés de l'AA. Ces composés possèdent des propriétés chémoattractantes sur les polynucléaires neutrophiles et favorisent l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Les plaques d'athérome contiennent également de l'acide 11-oxo-eicosatétranoïque qui facilite le recrutement et la stimulation des monocytes circulants. Si ces lipides oxydés proviennent en grande partie des particules ox-LDL internalisées, le fait que les énantiomères des molécules soient présents en proportions égales laisse à penser qu'ils pourraient également résulter d'une oxydation des acides gras présents dans la lésion par les ROS ⁸⁷.

3) Synthèse de médiateurs lipidiques de résolution de l'inflammation

La réponse inflammatoire se décompose classiquement en trois étapes : une phase pro-inflammatoire, une phase de résolution et une phase de guérison. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) jouent un rôle majeur dans ces différents processus puisqu'ils sont non seulement à l'origine de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires majoritairement issus de l'AA comme le LTB₄ ou la PGE₂, mais sont également responsables de la production de médiateurs lipidiques dits de résolution de l'inflammation (SPMs : *specialized pro-resolving lipid mediators*) tels les lipoxines issues de l'AA ou les résolvines issues de l'acide docosahexaénoïque (DHA) ⁸⁸. Le passage entre la phase pro-inflammatoire et la phase de résolution de l'inflammation est directement conditionné par la balance entre ces deux grandes catégories de médiateurs lipidiques aux effets opposés. Cet équilibre dépend d'un véritable *switch* métabolique puisque c'est la même enzyme, la 5-LOX, qui est responsable de la synthèse de certains eicosanoïdes pro-inflammatoires ou des SPMs selon sa localisation : nucléaire *versus* cytoplasmique ⁸⁹. Une fois synthétisés, les SPMs ont pour rôle de stabiliser les lésions athérosclérotiques en favorisant l'efférocytose des cellules apoptotiques, en

inhibant le recrutement leucocytaire et en diminuant la migration des VSMCs ^{90,91}. Quand un déséquilibre des voies métaboliques des AGPI en défaveur des SPMs apparaît, s'installe une incapacité à passer en phase résolutive et l'athérosclérose progresse. Ainsi, une récente étude a mis en évidence que les taux sériques de résolvine D1 (RvD1) et de DHA issus de patients présentant des lésions symptomatiques d'athérome carotidien étaient significativement plus bas que ceux de patients asymptomatiques ⁹². De plus, une seconde étude démontre que le ratio RvD1/LTB₄ mesuré dans des plaques d'athérome est significativement plus faible dans les zones vulnérables que dans des zones stables de la plaque ⁹³. Enfin, il a récemment été démontré que des plaques d'athérome carotidiennes issues de patients présentant des symptômes neurologiques avaient des taux intra-plaques de DHA diminués, et que cette diminution était associée à un phénotype pro-inflammatoire de la plaque ⁹⁴. Ces trois études confirment donc qu'il y a un lien direct entre diminution des taux de SPMs et vulnérabilité des plaques.

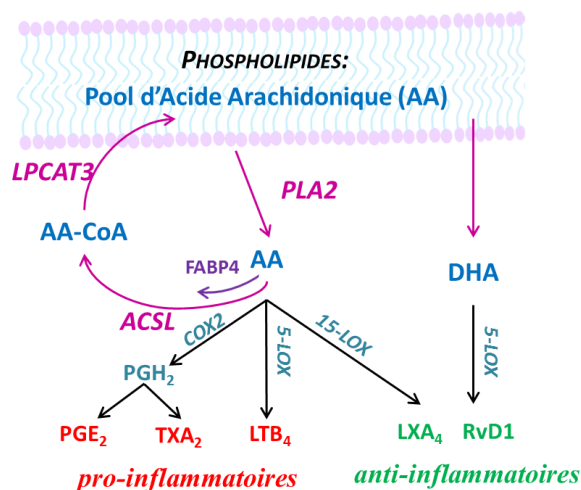


Figure 2 : Voies de biosynthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation

Les phospholipides membranaires constituent un pool d'acide arachidonique hydrolysable par la PLA2. Ce pool est entretenu par l'activation de l'acide arachidonique en arachidonoyl-CoA par ACSL1 pour son incorporation membranaire par LPCAT3. L'acide arachidonique peut également être métabolisé en médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (PGE₂, LTB₄) via les enzymes COX-2 et 5-LOX ou en médiateurs lipidiques de résolution de l'inflammation (LXA₄) via l'enzyme 15-LOX. L'acide docosahexaénoïque membranaire peut également être métabolisé en résolvine D1 anti-inflammatoire par l'enzyme 5-LOX. Un déséquilibre entre médiateurs pro-inflammatoires et de résolution de l'inflammation favorise le passage à la vulnérabilité de la plaque d'athérome.

AA : acide arachidonique ; PLA2 : phospholipase A2 ; FABP4 : Fatty Acid Binding Protein ; ACSL : acyl-CoA synthase ; LPCAT3 : lysophosphatidylcholine acyl-transférase 3 ; PGH₂ : prostaglandine H₂ ; PGE₂ : prostaglandine E₂ ; LTB₄ : leucotriène B₄ ; COX2 : cyclooxygénase 2 ; LOX : lipoxygénase ; LXA₄ : lipoxine A₄ ; DHA : acide docosahexaénoïque ; RvD1 : résolvine D1

PARTIE 2 : L'INTERLEUKINE-1B AU CŒUR DU PHENOMENE ATHEROMATEUX

I. Généralités sur IL-1 β

A. La voie de signalisation de IL-1

L'interleukine-1 (IL-1) est la première interleukine à avoir été décrite. Cette cytokine est un important médiateur de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire et existe sous deux formes codées par deux gènes différents mais avec une activité biologique similaire : IL-1 α et IL-1 β . Les deux formes IL-1 α et IL-1 β peuvent lier le récepteur de IL-1 de type 1 (IL-1RI) qui s'associe alors à la protéine IL-1RAcP (*IL-1 receptor accessory protein*) pour permettre la transduction du signal. Cette signalisation implique une succession de phosphorylations intracellulaires initiée par le domaine à activité tyrosine kinase TIR (*Toll/interleukin-1 receptor domain*) du récepteur IL-1RI qui nécessite le recrutement de l'adaptateur MyD88 (*Myeloid differentiation primary response*). Une fois leurs résidus thréonine et sérine phosphorylés, les protéines de signalisation intracellulaire deviennent des cibles pour les MAP-Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). La phosphorylation de l'inhibiteur I κ B entraîne sa dégradation au niveau du protéasome ce qui permet au facteur de transcription NF- κ B de transloquer au niveau nucléaire. La cascade de signalisation d'IL-1 provoque également la liaison du facteur de transcription AP-1 (protéine activatrice-1) au niveau de l'ADN. Les deux facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 induisent alors la transcription de nombreux gènes de chémokines et de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion, de facteurs de croissance et d'enzymes comme COX2 ou l'oxyde nitrite synthase (iNOS) ^{95,96}.

Les deux molécules IL-1 α et IL-1 β sont produites sous la forme de précurseurs. Majoritairement associée à la membrane plasmique des monocytes-macrophages et de quelques cellules épithéliales, IL-1 α exerce une action pro-inflammatoire locale. Aussi bien son précurseur que sa forme clivée par la calpaïne sont actifs. En cas de nécrose et de mort cellulaire, les molécules d'IL-1 α libérées peuvent également jouer le rôle d'alarmine. A l'inverse, IL-1 β est sécrétée par les monocytes-macrophages ou les cellules dendritiques pour

agir à distance de ses cellules cibles ce qui la rend plus active dans les maladies inflammatoires⁹⁷. Son précurseur, la pro-IL-1 β , n'est pas exprimé de façon constitutive mais en réponse à un signal pro-inflammatoire. Ce signal passe par la voie des TLRs mais aussi par celle d'IL-1RI, ce qui permet à IL-1 β et IL-1 α d'exercer un rétrocontrôle positif sur la transcription et la production d'IL-1 β . La forme active d'IL-1 β résulte du clivage de son précurseur, la pro-IL-1 β , par la caspase-1. D'autres protéases comme la métallopeptidase-9, l'élastase neutrophile ou le granzyme-A peuvent également cliver la pro-IL-1 β ^{97,95,98}.

La voie de signalisation d'IL-1 est régulée en grande partie par l'existence d'un récepteur antagoniste IL-1Ra qui est capable de lier le récepteur IL-1RI mais sans provoquer de transduction cellulaire du signal. Ce ligand agit alors comme un agoniste compétitif vis-à-vis d'IL-1 α et d'IL-1 β . Autre élément régulateur d'IL-1, le récepteur IL-1RII est capable lui aussi de lier IL-1 α et IL-1 β mais il ne possède pas de motif d'activation intracellulaire et ne sert donc qu'à capturer IL-1 α ou IL-1 β ^{95,96}.

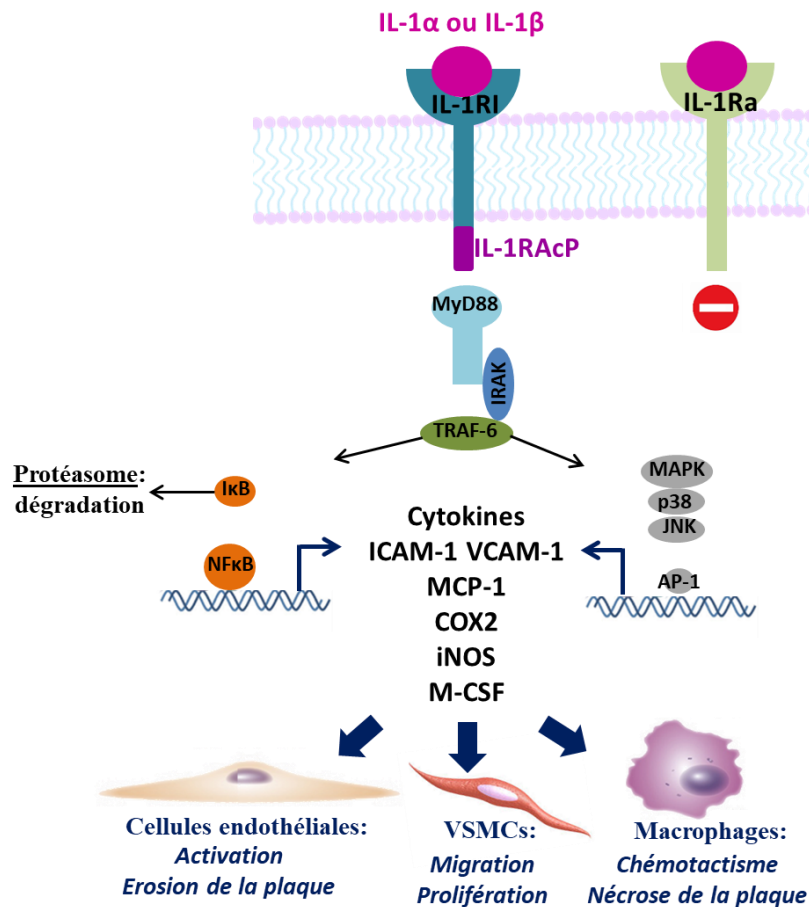


Figure 3 : Signalisation et rôles d'IL-1β dans l'athérosclérose

La liaison d'IL-1α ou IL-1β sur le récepteur IL-1RI induit le recrutement d'IL-1RAcP puis de MyD88 pour activer secondairement la voie NF-κB ou la voie des MAPKinases. S'en suit une production de médiateurs pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion, d'enzymes et de facteurs de croissance, qui activent les cellules endothéliales et les macrophages et favorisent la migration des cellules musculaires lisses.

IL-1RI: récepteur de l'interleukine-1 de type I ; *IL-1Ra*: récepteur antagoniste d'IL-1 ; *IL-1RII*: récepteur de l'interleukine-1 de type II ; *IL-1RAcP* : IL-1 receptor accessory protein ; *MyD88*: Myeloid differentiation primary response ; *TRAF-6*:TNF receptor associated factor 6 ; *IRAK*: interleukin-1 receptor-associated kinase ; *NF-κB*: nuclear factor kappa B; *MAPK*: Mitogen-Activated Protein Kinase; *p38*: p38 mitogen-activated protein kinase *JNK*: Jun-N-terminal kinase; *AP-1*: protéine activatrice-1 ; *ICAM-1*: intracellular adhesion molecule-1; *VCAM-1*: vascular cell adhesion molecule 1; *MCP-1*: monocyte chemoattractant protein-1 ; *COX2* : cycloxygénase 2 ; *iNOS* : oxyde nitrite synthase ; *M-CSF*: macrophage colony-stimulating factor ; *VSMCs*: vascular smooth muscle cells

B. L'inflammasome NLRP3 producteur d'IL-1 β

La forme active d'IL-1 β résulte du clivage de son précurseur, la pro-IL-1 β , par la caspase-1 qui a une activité cystéine protéase. Cette enzyme est portée par un important complexe protéique cytoplasmique appelé inflammasome. La mobilisation de l'inflammasome se déroule en deux phases : d'abord la reconnaissance d'un stimulus pro-inflammatoire par TLR4 ou IL-1RI, puis l'assemblage et l'activation du complexe protéique. Cet assemblage répond à différents signaux cellulaires perçus par un récepteur particulier NLRP3 (*nucleotide-binding oligomerization domaine-like receptor (NLR) family pyrin domain containing 3*), on parle donc d'inflammasome NLRP3 ⁹⁹.

Le stimulus pro-inflammatoire initial active la transcription des gènes *IL1B* et *NLRP3* via la voie NF- κ B. Ensuite, pendant que la pro-IL-1 β s'accumule, l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et le recrutement de la caspase-1 débutent sous la gouvernance de différents stimuli cellulaires. Il peut s'agir de l'excrétion massive d'ATP (adénosine triphosphate) par les cellules en apoptose du corps nécrotique mais aussi de ROS mitochondriaux ou encore d'un efflux membranaire de potassium. La cathepsine B produite par les lysosomes quand ils sont déstabilisés dans leur structure est également un puissant activateur de l'inflammasome ¹⁰⁰. Cette sécrétion lysosomale est stimulée par des phospholipides oxydés mais surtout par des cristaux de cholestérol qui activent l'inflammasome au même titre que les cristaux d'acide urique dans le contexte de la goutte ^{101,102}. Ainsi, les particules ox-LDL interviennent à deux niveaux dans l'activation de l'inflammasome : d'abord en stimulant les récepteurs TLR4 et, une fois internalisées, en favorisant la formation de cristaux de cholestérol. Une fois activé, l'inflammasome NLRP3 peut alors cliver la pro-IL-1 β en IL-1 β active. L'inflammasome NLRP3 peut également former des agrégats qui sont éliminés dans le milieu extracellulaire. Lorsque ces agrégats sont ingérés par les cellules avoisinantes, ils activent à leur tour l'inflammasome et amplifient ainsi la production d'IL-1 β dans la plaque d'athérome ¹⁰³.

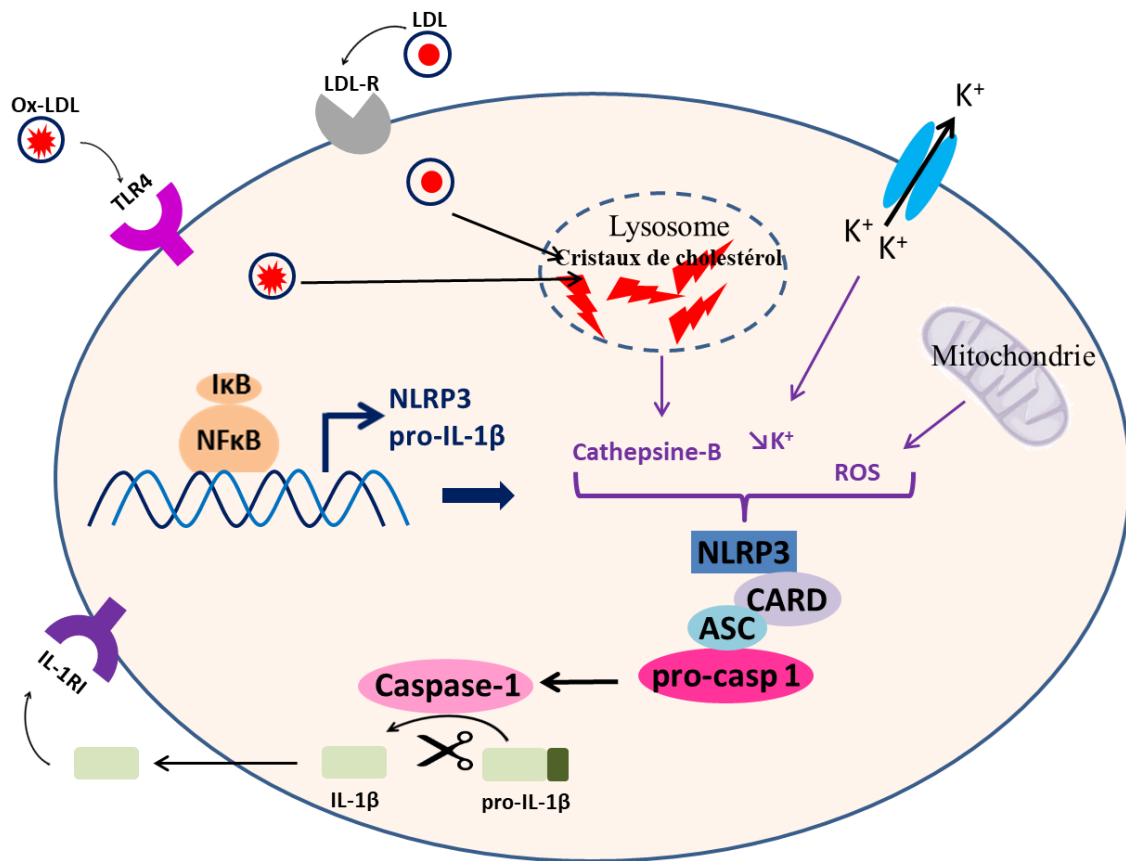


Figure 4 : Production de l'interleukine-1β par l'inflammasome NLRP3

La stimulation des récepteurs TLR4 et IL1-RI active la voie NF-κB et la transcription de *NLRP3* et *IL1B*. Les particules LDL ou LDL-oxydées qui s'accumulent forment des cristaux de cholestérol toxiques pour le lysosome qui libère de la cathepsine B. La sécrétion de cette enzyme mais aussi la diminution de l'efflux potassique membranaire, et la production de ROS mitochondriaux, constituent divers signaux cellulaires pour l'assemblage des protéines NLRP3, CARD et ASC qui constituent l'inflammasome NLRP3 capable de recruter la pro-caspase-1 afin de l'activer en caspase-1. La caspase-1 peut alors cliver la pro-IL-1β en IL-1β qui une fois sécrétée peut stimuler à son tour le récepteur IL1-RI.

TLR4: toll-like receptor 4; *IL-1RI*: récepteur de l'interleukine-1 de type 1; *NF-κB*: nuclear factor kappa B; *CD36*: cluster of differentiation 36; *LDL*: low density lipoprotein; *ox-LDL*: particule LDL oxydée; *ROS*: espèces réactives de l'oxygène; *NLRP3*: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3; *ASC*: adaptateur de la caspase-1; *CARD*: caspase recruitment domain; *pro-casp 1*: pro-caspase 1; *IL-1β*: interleukine-1β; *LDL-R*: récepteur des LDL

II. Rôles d'IL-1 β dans l'athérosclérose

De nombreuses études *in vivo* chez l'Homme ou sur des modèles animaux ont mis en évidence le rôle majeur d'IL-1 β dans le développement et l'évolution des plaques d'athérome. Ces études ont notamment cherché à bloquer la voie de signalisation d'IL-1 β que ce soit au niveau de l'inhibiteur IL-1Ra, du récepteur IL-1RI ou directement la production d'IL-1 β , et à en évaluer l'impact sur le processus athéromateux.

A. IL-1 β et athérosclérose : modèles animaux

1) Rôle d'IL-1 β dans la formation des lésions athéromateuses

Différentes études ont décrit le rôle de la voie de signalisation d'IL-1 β dans la formation des lésions d'athérosclérose. Une première étude a utilisé un modèle de souris *Apoe*^{-/-} croisées avec des souris *Il1rn*^{-/-}. Après 16 semaines d'un régime classique, les souris *Il1rn*^{+/-} *Apoe*^{-/-} présentent une augmentation de la taille des lésions athérosclérotiques au niveau de l'aorte sinusale associée à une diminution de 15% du marquage pour l' α -actine par rapport aux souris *Il1rn*^{+/+} *Apoe*^{-/-}. Les souris *Il1rn*^{-/-} *Apoe*^{-/-} ont été exclues de l'étude car associées à un phénotype trop chétif ¹⁰⁴. Une seconde étude s'est focalisée sur la formation des stries lipidiques qui initient la lésion au niveau de l'aorte sinusale de souris *Apoe*^{-/-}. Pendant 60 jours, les souris ont reçu 25mg/kg/j de protéine IL-1Ra recombinante humaine ou un placebo. Après deux mois de traitement, les souris ont été mises sous régime athérogène durant un mois avant sacrifice et prélèvement des aortes. La mesure de la taille des plaques d'athérome révèle que les souris traitées par IL-1Ra présentent des lésions 2,5 fois plus petites que les souris qui ont reçu le placebo ¹⁰⁵.

Toujours dans le but d'éclaircir le rôle d'IL-1Ra dans le contrôle de la croissance de la plaque, une étude a évalué l'influence d'un régime enrichi en cholestérol/cholate sur la taille de la lésion. Ce régime est d'abord administré à des souris *Il1rn*^{-/-} en regard de souris *Wild-Type* (WT) pendant 3 mois. Les souris *Il1rn*^{-/-} présentent des taux de cholestérol non-HDL trois fois moins élevés que les souris WT et tendent à avoir des lésions aortiques plus importantes. A l'inverse, des souris transgéniques *Il1rn/ldlr*^{-/-} nourries pendant 4 semaines avec un régime enrichi en cholestérol/cholate, présentent des lésions aortiques environs 1,5 fois moins importantes que les souris *ldlr*^{-/-} simples ¹⁰⁶. Ces études témoignent donc du rôle essentiel d'IL-1 β dans l'initiation et le développement des lésions d'athérosclérose chez la souris.

2) Rôle d'IL-1 β dans le remaniement vasculaire

En favorisant la migration et la prolifération des VSMCs, IL-1 β est particulièrement active sur le remodelage vasculaire. Dans un modèle de souris *Il1rn*^{-/-}, le remaniement vasculaire est induit par une incision réalisée au niveau de l'artère fémorale. Trois semaines plus tard, la mesure de l'épaisseur des vaisseaux révèle que l'intima des souris *Il1rn*^{-/-} mesure 31,8 μ m alors que celle du groupe contrôle ne fait que 9,1 μ m. En revanche, l'épaisseur de la média ne diffère pas entre les deux groupes ¹⁰⁷. Afin de mieux caractériser le rôle d'IL-1 β dans la formation de la néo-intima, une équipe a proposé deux modèles de souris *Il1r1*^{-/-} ou *Il1b*^{-/-} chez qui une ligation en dessous de la bifurcation carotidienne mime la pose d'un stent ou d'un ballonnet cardiaque. Après 4 semaines, la mesure de la néo-intima du vaisseau révèle un épaississement 19 fois moins important chez les souris *Il1r1*^{-/-} que chez les souris WT ainsi qu'un rétrécissement de la lumière vasculaire 3 à 4 fois moindre. Des résultats similaires sont obtenus avec les souris *Il1b*^{-/-} ou lorsque des souris *Il1r1*^{+/-} sont traitées par 25mg/kg/jour d'IL-1Ra en infusion continue pendant toute la durée de l'étude ¹⁰⁸. La même équipe a précédemment décrit qu'une angioplastie percutanée coronaire transluminale chez des porcs provoque une augmentation d'IL-1 β au niveau des cellules endothéliales du vaisseau dès 1 heure post-chirurgie avec un pic observé entre 3 et 7 jours post-chirurgie. Ce pic n'est pas retrouvé dans les artères contrôle. De plus, il existe une colocalisation d'IL-1 β et de la caspase-1 dans les cellules endothéliales à 6 heures post-chirurgie, dans les cellules de l'adventice à partir de 3 jours post-chirurgie, et enfin, dans les cellules de la néo-intima à partir de 7 jours post-chirurgie ¹⁰⁹. Ces études confirment donc une activation de la voie de signalisation d'IL-1 β dans la paroi vasculaire au niveau des plaques d'athérome.

3) Rôle d'IL-1 β dans l'inflammation et l'évolution de la lésion

L'inflammation au niveau de la plaque est entretenue par IL-1 β tout au long du processus athéromateux. Ce phénomène est mis en évidence chez des souris *Apoe*^{-/-} *Il1b*^{-/-} qui soumises à un régime classique pendant 12 ou 24 semaines, présentent des plaques d'athérome au niveau des aortes proximales dont la taille est diminuée de 30% par rapport aux souris contrôle. En parallèle, les taux d'ARNm de *Ccl2* et *Vcam1* au niveau des lésions athéromateuses sont diminués de 58% et 39% respectivement chez les souris *Apoe*^{-/-} *Il1b*^{-/-} par rapport aux souris contrôle. ¹¹⁰. Plus récemment, une étude décrit le blocage d'IL-1 β grâce à un anticorps monoclonal (XOMA 052) dans un modèle *in vitro* de cocultures de macrophages, cellules endothéliales et VSMCs. L'anticorps inhibe la sécrétion d'IL-6, d'IL-8,

de MCP-1 et de TNF α , par les cellules ce qui confirme le rôle prépondérant d'IL-1 β dans l'entretien du foyer inflammatoire et la progression de la plaque ¹¹¹.

La rupture de la plaque n'arrête pas l'inflammation au niveau de la lésion, bien au contraire. Après la thrombose, tout un processus de reperfusion et de remodelage vasculaire se met en place. Mal maîtrisées, ces modifications vasculaires peuvent s'avérer délétères pour le vaisseau et favoriser la survenue d'évènements cardiovasculaires secondaires. De nombreuses cytokines continuent ainsi à être sécrétées et parmi elles, IL-1 β est particulièrement active. Le rôle d'IL-1 β dans les heures ou les jours qui suivent un infarctus du myocarde a été décrit dans une étude réalisée sur des souris *Il1r1*^{-/-} ayant eu un infarctus du myocarde et sacrifiées de 6 heures à 7 jours après le début du phénomène de reperfusion. L'analyse histologique des cœurs révèle que l'infiltrat de polynucléaires neutrophiles et de macrophages dans la zone infarctée est 4 fois moins important chez les souris *Il1r1*^{-/-} que chez les souris WT à 24 heures et 48 heures. De plus, après 7 jours de reperfusion, les taux protéiques de MMP-2 et MMP-3 sont fortement diminués chez les souris *Il1r1*^{-/-} en regard des souris contrôle. Enfin, non seulement les taux d'ARNm de *Ccl2* et *Il1b* mesurés après 6 heures de reperfusion sont significativement diminués chez les souris *Il1r1*^{-/-}, mais ces souris présentent un taux de mortalité de 1,1% *versus* 7,2 % chez les souris contrôle ⁹⁶. La signalisation IL-1 β est donc particulièrement impliquée dans la rupture de la plaque et dans la réponse inflammatoire associée.

4) Rôle de l'inflammasome dans l'athérosclérose

Différentes études se sont focalisées sur l'impact de l'inflammasome, essentiel dans la sécrétion d'IL-1 β active, dans la réponse inflammatoire au sein de la plaque. Dans une première étude, des souris *Ldlr*^{-/-} ont été irradiées puis transplantées avec de la moelle osseuse murine déficiente en NLRP3 ou ASC, adaptateur spécifique de la caspase-1. Les cellules sanguines circulantes n'expriment donc plus certains composants de l'inflammasome nécessaires à son activité. Après 8 semaines de régime enrichi en cholestérol, les souris *Ldlr*^{-/-} dont les cellules circulantes n'expriment pas NLRP3 présentent des lésions d'athérome au niveau de l'aorte réduites de 69% par rapport aux souris contrôle *Ldlr*^{-/-} avec une moelle issue de souris WT ¹⁰¹. Ciblant plus spécifiquement la caspase-1, une seconde étude compare des souris *Apoe*^{-/-} avec ou sans un gène fonctionnel pour la caspase-1. Les souris sont nourries avec un régime pauvre en graisses pendant 26 semaines ou bien avec un régime enrichi en cholestérol et en acides gras saturés pendant 8 semaines. Si le profil lipidique reste inchangé

entre les deux groupes, quel que soit le régime, l'analyse de la paroi des aortes révèle des différences significatives dans la progression des lésions d'athérosclérose. Les plaques d'athérome dans l'aorte ascendante des souris sont 35% à 45% moins développées chez les souris *ApoE^{-/-} Casp-1^{-/-}* que chez les souris *ApoE^{-/-} Casp-1^{+/+}*. Les souris femelles *ApoE^{-/-} Casp-1^{-/-}* présentent également une diminution de l'expression de IFN γ dans leurs lésions d'athérosclérose. Cette étude souligne que la caspase-1 favorise la progression athéromateuse et l'activation des cellules immunitaires au niveau de la plaque ¹¹². Enfin, dans une dernière étude chez des souris *ApoE^{-/-}*, NLRP3 est neutralisé grâce à l'administration d'un lentivirus vecteur d'un ARN inhibiteur de l'ARNm de *Nlrp3*. Les souris subissent une première injection virale au niveau de la queue après 4 semaines de régime riche en graisses et une seconde deux semaines plus tard. Les aortes sont prélevées pour analyse 4 semaines après la première injection. Les souris traitées par lentivirus présentent une diminution de 22% des macrophages, 33% des lipides, 39% des VSMCs au niveau de la plaque d'athérome et à l'inverse une augmentation de 46% de son contenu en collagène en regard des souris contrôle non traitées. Des différences apparaissent également au niveau transcriptionnel au sein des plaques avec une diminution des ARNm des *Mmp2* et *Mmp9* pour les souris où NLRP3 est inactif ¹¹³. L'inflammasome, nécessaire à l'activité d'IL-1 β , est donc déterminant dans le développement de l'athérosclérose.

B. IL-1 β et athérosclérose : études chez l'Homme

1) Etude de la signalisation d'IL-1 β dans l'athérosclérose chez l'Homme

L'existence d'un lien entre IL-1 β et athérosclérose a aussi été démontrée chez l'Homme. Une première étude a tout d'abord mis en évidence que dans les premières minutes qui suivent un infarctus du myocarde (IDM), les taux sériques d'IL-1 β sont particulièrement élevés. Si cette augmentation diminue de moitié au bout de 2 heures, elle semble néanmoins être responsable d'une élévation des taux d'IL-6 4 heures après le début de l'infarctus. Cette augmentation est suivie d'une élévation des taux de CRP, acteur majeur de la phase aiguë de l'inflammation ¹¹⁴. Par la suite, des travaux démontrent une augmentation de l'immunomarquage d'IL-1 β dans les cellules endothéliales luminales ou de l'adventice ainsi que dans les macrophages dans des artères coronaires issues de patients souffrant d'IDM par rapport à des patients atteints de cardiomyopathie dilatée. Plus le marquage est important, plus la pathologie athéromateuse est avancée ¹¹⁵. Une autre étude qui compare également des

coupes d'artères coronaires issues de patients atteints d'athérosclérose avec des coupes issues de patients atteints de cardiomyopathie dilatée, met cette fois en évidence une élévation du marquage semi-quantitatif des ARNm d'*IL-1RN* dans les lésions athéromateuses par rapport au groupe contrôle. De plus, les auteurs décrivent que non seulement IL-1Ra est présent au niveau intracellulaire dans les VSMCs des artères coronaires humaines, mais que son expression protéique est fortement accrue lorsque les cellules sont stimulées par du LPS ou du phorbol-myristate-acétate ¹¹⁶. Ces résultats laissent à penser que IL-1Ra pourrait être un marqueur d'instabilité des lésions d'athérosclérose. C'est l'hypothèse d'une étude prospective où les taux plasmatiques d'IL-1Ra chez des patients devant subir une angiographie sont mesurés. Les résultats révèlent que les patients souffrant d'angor ont des taux plus élevés que les patients avec des douleurs thoraciques atypiques. De plus, les patients atteints d'angor instable ont des taux environ 1,5 fois plus élevés que les patients avec un angor stable ¹¹⁷. Ceci peut en partie s'expliquer par le fait qu'IL-1Ra est produit par les hépatocytes en réponse à une stimulation par les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β mais peut également être sécrété par les monocytes au site de la lésion sûrement dans le but de réguler l'inflammation. Comme IL-1Ra a une demi-vie courte, son accumulation serait alors le reflet d'une inflammation chronique. Enfin, il existe plusieurs polymorphismes pour le gène *IL-1RN* particulièrement décrits et étudiés dans une étude où 1850 patients subissent une angiographie 6 mois après la pose d'un stent. Il s'avère que les 8,3% des patients homozygotes pour un SNP particulier situé au niveau de l'exon 2 présentent une diminution du risque de resténose de 22% ¹¹⁸.

2) Rôle de l'inflammasome dans l'athérosclérose chez l'Homme

Plusieurs études récentes se sont intéressées au rôle de l'inflammasome dans l'athérosclérose chez l'Homme. Une première étude révèle la présence des protéines NLRP3, ASC, caspase-1 et des deux cytokines IL-1 β et IL-18 dans des prélèvements carotidiens issus de 30 patients ayant subi une endartériectomie carotidienne. Ces mêmes protéines sont absentes d'échantillons d'artères mésentériques issus de patients atteints de cancer de l'intestin. Si la protéine NLRP3 est aussi bien détectée dans les plaques d'athérome vulnérables que dans les plaques non vulnérables, elle est essentiellement retrouvée au niveau du cytoplasme des macrophages et des cellules spumeuses qui contiennent des cristaux de cholestérol. Les taux sériques d'IL-1 β et d'IL-18 sont également significativement plus élevés chez les patients souffrant d'athérosclérose que chez les patients contrôle ¹¹⁹. Une seconde étude se focalise sur le niveau d'expression de NLRP3 et le degré de sévérité des plaques

d'athérome chez des patients avec un syndrome coronarien aigu. L'analyse par cytométrie en flux des taux de NLRP3 dans les monocytes circulants de 123 sujets, environ 6 heures après le début des douleurs thoraciques, révèle que l'expression protéique est corrélée à la sévérité de l'atteinte coronarienne ainsi qu'au nombre de plaques c'est-à-dire au nombre de vaisseaux touchés. Enfin, les taux plasmatiques d'IL-1 β et d'IL-18 sont augmentés chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu par rapport à des sujets contrôle ¹²⁰. L'inflammasome est donc actif au sein des plaques d'athérome, particulièrement quand elles sont responsables de symptômes cliniques cardiovasculaires.

III. L'étude CANTOS

A. Rationnel de l'étude CANTOS

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique dont la physiopathologie est de mieux en mieux appréhendée. Le rôle central d'IL-1 β dans le développement de l'athérosclérose a largement été décrit et cibler spécifiquement cette cytokine est progressivement apparu comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour la prise en charge et la prévention des MCV. Le canakinumab est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 (immunoglobuline de type 1) dirigé contre IL-1 β pour empêcher sa liaison sur le récepteur IL-1RI. Cet anticorps est couramment prescrit pour la prise en charge de certains syndromes fébriles auto-immuns, comme le syndrome de Muckle-Wells caractérisé par une urticaire fébrile, ou encore pour soigner les crises de goutte ¹²¹. L'hypothèse de la récente étude CANTOS (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study), était que l'administration de canakinumab, en inhibant l'activité d'IL-1 β , pouvait prévenir la survenue ou la récurrence d'événements cardiovasculaires. L'étude CANTOS est une étude randomisée en double aveugle où 10061 sujets ayant déjà eu un infarctus du myocarde et à risque de récurrence car présentant un taux de CRP > 2 mg/L, ont reçu soit du canakinumab soit un placebo. La moyenne d'âge des sujets était de 61 ans et ils étaient majoritairement de sexe masculin. Le canakinumab a été administré par voie sous-cutanée tous les trois mois à la dose de 50 mg, 150 mg ou 300 mg. Le critère de jugement principal de l'étude était la survenue d'un infarctus du myocarde ou d'un AVC, qu'il soit fatal ou non ¹²².

B. Résultats de l'étude CANTOS

Les résultats de l'étude CANTOS mettent en évidence une diminution des taux d'IL-6 et de CRP chez les patients traités par canakinumab par rapport aux patients recevant le placebo quelle que soit la dose mais de façon dose-dépendante. Les paramètres lipidiques restent quant à eux inchangés quel que soit le groupe. Après environ 4 ans d'observation, il apparaît qu'à la dose de 150mg ou 300mg, le canakinumab réduit de 15% le risque de récurrence d'infarctus du myocarde, d'apparition d'accident vasculaire cérébral ou de décès des suites d'un événement cardiovasculaire. Une dose de 50mg reste en revanche sans effet par rapport au placebo ¹²³. Il semble important de préciser que 90% des patients participant à cet essai étaient traités par statines mais celles-ci restaient néanmoins inefficaces vis-à-vis de l'élévation des taux de CRP ^{71,124}.

Une nouvelle exploitation des données, toujours en cours, mais chez les patients de l'essai avec un taux de CRP < 2mg/L semble indiquer cette fois une réduction de 27% de l'incidence d'événements cardiovasculaires et de 31% du taux de décès associés ¹²⁵. Cibler spécifiquement IL-1 β diminue donc significativement le risque de récurrence d'événements cardiovasculaires, indépendamment de toute modification du profil lipidique, et semble lutter efficacement contre l'inflammation chronique évoluant à bas bruit au cours de l'athérosclérose.

C. Perspectives de l'étude CANTOS

L'étude CANTOS relie directement le rôle biologique d'IL-1 β dans la constitution des lésions athéromateuses et la survenue d'événements cliniques comme les infarctus du myocarde ou les AVC. Ceci laisse envisager un changement conceptuel de la prise en charge thérapeutique des MCV qui ne serait plus uniquement focalisée sur le contrôle du métabolisme lipidique, mais beaucoup plus ciblée sur l'inflammation au cours de l'athérosclérose. Le canakinumab vise spécifiquement IL-1 β car cette cytokine est particulièrement active dans la nécrose des plaques d'athérome. Mais de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires participent à la progression des lésions. Compte tenu des résultats de l'étude CANTOS, les nouvelles approches thérapeutiques par immunomodulation dans le cadre de l'athérosclérose semblent prometteuses et pourraient alors être étendues à d'autres cytokines pro-inflammatoires. Un petit essai clinique démontre ainsi l'efficacité d'un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6, le tocilizumab, dans le contrôle des

niveaux de CRP chez des patients atteints d'un syndrome coronarien aigu ¹²⁶. Le MABp1, anticorps monoclonal dirigé contre IL-1 α , a principalement été étudié dans le cadre de pathologies cancéreuses, mais pourrait éventuellement être également étudié dans le cadre de l'athérosclérose ¹²⁷.

Il semble cependant important de garder à l'esprit que les cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans de nombreuses pathologies inflammatoires très diverses, qu'elles soient aiguës ou chroniques. Bloquer les voies de signalisation de l'immunité innée peut ne pas être sans conséquence notamment en ce qui concerne les mécanismes de défense de l'hôte. Ceci s'est illustré au cours de l'étude CANTOS où il est apparu que le canakinumab pouvait augmenter les risques infectieux, certains patients de l'étude étant décédés des suites d'un sepsis. Ces nouvelles thérapies, aussi prometteuses soient-elles, devront donc être envisagées d'une façon la plus individualisée possible, en s'appuyant sur des biomarqueurs du phénomène athéromateux, existants comme la CRP, ou à venir.

PARTIE 3 : LE LIVER X RECEPTOR, LIEN ENTRE CHOLESTEROL ET INFLAMMATION

I. Cholestérol et inflammation

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique évolutive. Si le cholestérol est responsable d'une obstruction mécanique du vaisseau en s'infiltrant dans la paroi artérielle, il est aussi à l'origine directe de différents processus inflammatoires qui favorisent le développement des lésions ¹²⁸.

A. Cholestérol intracellulaire et réponse inflammatoire

En cas d'hypercholestérolémie, les membranes plasmiques des cellules, notamment des macrophages, s'enrichissent en cholestérol ce qui facilite la formation des complexes TLRs membranaires et favorise la réponse à un stimulus pro-inflammatoire ^{128,129}. Les particules ox-LDL sont capables de lier le récepteur TLR4 ce qui explique que les cellules spumeuses présentent une activation importante des gènes de l'inflammation et des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires issues de la voie des TLRs^{130,131}. Les particules ox-LDL, une fois internalisées par les macrophages, sont également responsables de la formation de cristaux de cholestérol qui activent massivement l'inflammasome et concourent à la production d'IL-1 β pro-inflammatoire dans la plaque. L'accumulation intracellulaire de cholestérol est donc favorisée lors de la mise en place d'une réponse inflammatoire. A l'inverse, l'efflux de cholestérol des cellules est inhibé.

1) Le transport inverse du cholestérol

L'efflux cellulaire du cholestérol initie le phénomène de transport inverse du cholestérol (RTC : *reverse cholesterol transport*) qui permet de ramener le cholestérol des tissus périphériques au foie. Cet export cellulaire est possible grâce à l'action de deux transporteurs : ABCA1 et ABCG1 (*ATP-binding cassette transporters A1 et G1*) ^{132,133}. Le cholestérol est alors pris en charge par des particules pré-HDL et par l'apoprotéine A1 (APOA1) pour être estérifié par la lécithine cholestérol acyl-transférase (LCAT). Le cholestérol est ensuite capté au niveau hépatique par les récepteurs SRB1 (*scavenger receptor*

BI) pour être excrété dans la bile ou utilisé pour la synthèse de particule VLDL (*very low density lipoprotein*)¹³⁴. La mise en place d'une réponse inflammatoire après l'activation des TLRs est associée à une inhibition du RTC qui se manifeste par une augmentation de la triglycéridémie et par une diminution des taux de HDL et d'APOA1 sériques¹³⁵. Si cette inhibition du RTC est nécessaire et bénéfique lors d'une infection, il arrive qu'à l'inverse, un dysfonctionnement de l'efflux cellulaire de cholestérol engendre à terme une inflammation chronique délétère.

2) Perturbations de l'efflux cellulaire de cholestérol et inflammation

Plusieurs maladies inflammatoires chroniques comme le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis, sont associées à des perturbations lipidiques. Il s'agit essentiellement d'une augmentation des lipoprotéines athérogènes au détriment du taux de HDL-cholestérol¹³⁶. Dans ces pathologies, les particules HDL acquièrent également un phénotype pro-inflammatoire et perdent leur capacité à participer à l'efflux de cholestérol. Il a en effet été décrit que des particules HDL issues de patients sains et exposés à de faibles doses de LPS (3ng/kg), perdent *ex vivo* leur capacité d'efflux et présentent une diminution de leur contenu en LCAT et en phospholipides alors que les taux sériques de HDL et d'APOA1 des sujets sont restés inchangés par l'injection de LPS¹³⁷. Dans l'athérosclérose, le phénotype des particules HDL est particulièrement modifié car elles subissent des phénomènes d'oxydation sous l'influence des myéloperoxydases des macrophages. C'est essentiellement l'APOA1 qui est oxydée au niveau du tryptophane en position 72 (oxTrp72-APOA1) ce qui altère fortement la capacité d'efflux de la lipoprotéine. Cette APOA1 oxydée représente seulement 20% de l'APOA1 totale chez des patients atteints de maladie coronarienne mais cela suffit à diminuer la capacité d'efflux des HDL *ex vivo*^{138,139}.

B. Cholestérol et production de cellules pro-inflammatoires

Si le cholestérol favorise l'inflammation et le recrutement cellulaire au niveau de la plaque d'athérome, l'hypercholestérolémie provoque également une leucocytose secondaire caractérisée par une augmentation des monocytes et des polynucléaires neutrophiles circulants. Ces anomalies hématologiques sont très fréquentes au cours de la maladie athéromateuse et il est admis depuis plusieurs décennies que l'importance de la leucocytose est corrélée à la sévérité et à la morbi-mortalité des MCV¹⁴⁰. Plusieurs modèles murins ont

décrit qu'en l'absence d'ABCA1 et ABCG1, des souris *ApoE*^{-/-} ou *Ldlr*^{-/-} soumises à un régime hypercholestérolémiant présentent non seulement une augmentation des lésions athérosclérotiques mais également une monocytose et une neutrophilie ¹⁴¹. Parallèlement, des enfants issus de familles atteintes d'hypercholestérolémie familiale présentent des taux de monocytes d'autant plus élevés que leurs taux de HDL-cholestérol sont bas ^{142,143}.

Plusieurs raisons expliquent cette leucocytose secondaire en cas d'hypercholestérolémie. Tout d'abord, au contact de taux élevés de cholestérol, la composition de la membrane plasmique des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse change ce qui impacte directement l'expression du récepteur commun à l'IL-3, l'IL-5 et au GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Les cellules souches hématopoïétiques, sous l'influence de ces cytokines et facteurs de croissance prolifèrent et se différencient alors en monocytes et polynucléaires neutrophiles qui peuvent gagner les lésions athéromateuses ¹²⁸. Il semble également que le cholestérol favorise des modifications épigénétiques au niveau des promoteurs des gènes de certains facteurs de régulation de l'hématopoïèse. Une étude retrouve ainsi une hypométhylation des îlots CpG (*cytosine phosphodiester bond guanine*) des gènes de Pu.1 et IRF8 (*Interferon regulatory factor 8*), deux régulateurs de la prolifération des monocytes et de leur différenciation en macrophages, dans la moelle osseuse de souris nourries par un régime enrichi en cholestérol ¹⁴⁴. Enfin, l'accumulation de cholestérol au niveau de la rate contribue largement à stimuler la myélopoïèse. Les cellules dendritiques et les macrophages spléniques gorgés de cholestérol sécrètent des concentrations élevées d'IL-17, d'IL-23 et de G-CSF qui vont stimuler les progéniteurs myéloïdes de la moelle. Une hématopoïèse extra-médullaire se développe également au niveau de la pulpe rouge de la rate. Les cellules souches hématopoïétiques gagnent la rate où elles sont stimulées par du GM-CSF et produisent des monocytes qui rejoignent à leur tour la plaque d'athérome ¹⁴¹.

Une accumulation intracellulaire excessive de cholestérol génère de nombreux stimuli pro-inflammatoires délétères pour les cellules. Contrôler l'homéostasie du cholestérol est donc un enjeu clef pour la maîtrise de la réponse inflammatoire au cours de l'athérosclérose. Le récepteur LXR (*Liver X Receptor*) est un récepteur nucléaire particulièrement impliqué dans la régulation des entrées et des sorties de cholestérol de la cellule, mais également dans la lipogénèse et l'inflammation. Ce récepteur semble donc tout particulièrement disposé à jouer un rôle central dans le processus athéromateux.

II. Le Liver X Receptor

A. LXR : un récepteur nucléaire

Les *Liver X Receptors* (LXRs) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires de type deux et sont représentés par deux protéines chez les mammifères : LXR α (NR1H3) et LXR β (NR1H2) ^{145,146}. Ces deux isoformes correspondent à deux gènes distincts et présentent 80% d'homologie dans leur structure en acides aminés, néanmoins leur distribution tissulaire diffère. Ainsi, LXR α est majoritairement exprimé dans le foie, l'intestin, les macrophages, la rate et le rein, alors que LXR β est ubiquitaire mais exprimé à des taux plus faibles ^{147,148}. Il existe trois transcrits différents pour LXR α (LXR α 1, LXR α 2 et LXR α 3) issus des phénomènes d'épissage alternatif mais LXR α 1 est la forme majoritaire ¹⁴⁹.

1) Structure

Le récepteur LXR est structuré en quatre parties. Le domaine d'activation de la transcription indépendant du ligand (AF-1 : *Activation function 1*) est situé au niveau de la partie N-terminale du récepteur. A sa suite, le domaine de liaison de l'ADN (DBD : *DNA Binding Domain*) est constitué de deux motifs hautement conservés en doigts de zinc. Enfin, au niveau de la partie C-terminale, cohabitent le domaine de liaison du ligand (LBD : *ligand binding domain*) et un domaine d'activation de la transcription dépendant du ligand (AF-2: *Activation function 2*) ¹⁵⁰. Grâce à une région charnière flexible, LXR peut subir des changements conformationnels qui facilitent la liaison à l'ADN et permettent une hétérodimérisation avec le récepteur RXR (Récepteur X des Rétinoïdes). En effet, lors de l'activation de LXR, c'est le complexe LXR-RXR qui va pouvoir moduler l'expression génique en se fixant sur l'ADN au niveau du promoteur des gènes cibles ^{145,151}.

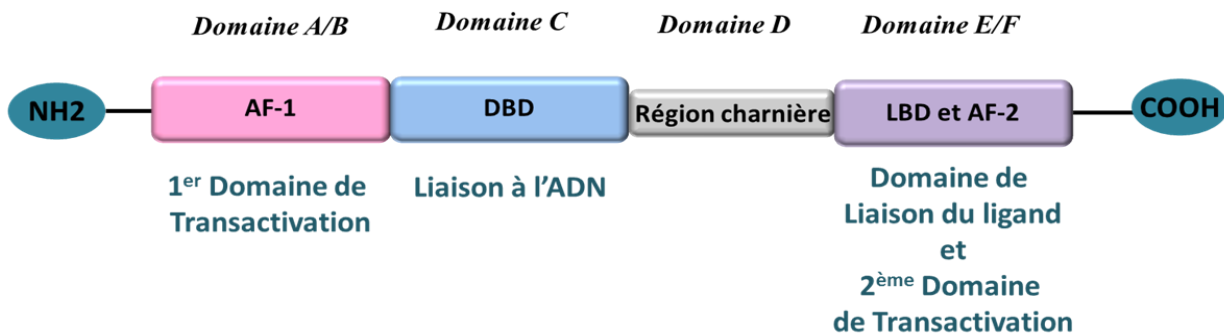


Figure 5 : Structure du récepteur LXR

Côté N-terminal, un domaine de transactivation indépendant du ligand (AF-1) est suivi d'un domaine de liaison de l'ADN (DBD) constitué de deux motifs en doigts de zinc hautement conservés. La région charnière permet de faciliter les changements conformationnels lors de la liaison à l'ADN et de l'hétérodimérisation avec RXR. Le dernier domaine côté C-terminal comporte à la fois un deuxième domaine de transactivation dépendant du ligand (AF-2) et le domaine de liaison du ligand (LBD).

LXR: liver X receptor; RXR: retinoic X receptor; DBD: DNA Binding Domain; LBD: Ligand Binding Domain; AF-1: Activation function 1; AF-2: Activation function 2

Le site de liaison de LXR sur l'ADN est appelé LXRE (*Liver X Receptor Response Element*) et se compose de deux séquences hexanucléotidiques directes conservées et séparées par 4 nucléotides de type DR4. Les deux isoformes LXR α et LXR β se lient sur les sites LXRE avec la même affinité. Par contre, certains sites de liaison dits « non-idéaux » peuvent présenter quelques variations nucléotidiques qui induisent parfois des variations d'affinité entre LXR α et LXR β ^{147,152}. L'hétérodimère LXR-RXR peut aussi bien être activé par un ligand de LXR ou par l'acide 9-cis-rétinoïc, ligand de RXR : on parle d'hétérodimère permissif. La liaison simultanée des deux ligands a par contre un effet synergique ¹⁵³.

2) Mécanismes d'action

Une fois constitué, l'hétérodimère LXR-RXR se fixe au niveau du site de liaison LXRE sur le promoteur des gènes cibles de LXR. Ainsi positionné et même en l'absence de ligand, LXR-RXR permet de maintenir les co-répresseurs NCoR (*Nuclear receptor co-repressor*) ou SMRT (*Silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone receptor*), au

niveau du promoteur du gène. La liaison du ligand provoque un changement conformationnel du récepteur et la libération du co-répresseur. Si le départ du co-répresseur induit déjà une activation modérée de la transcription, c'est surtout le recrutement d'un co-activateur au niveau du promoteur du gène qui permet une activation maximale de la transcription ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Parmi les co-activateurs qui peuvent interagir avec LXR, on note : PGC-1 α (coactivateur-1 α du récepteur PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated-receptor-gamma*)), SRC-1 (co-activateur du récepteur aux stéroïdes-1) et ASC-2 (*activating signal co-integrator-2*). Dans certains cas, la seule présence de LXR-RXR en l'absence de co-répresseur suffit à activer la transcription qui est nettement amplifiée lors de la liaison du ligand et du recrutement du co-activateur ¹⁵⁷. Ce processus d'activation de la transcription des gènes par LXR est appelé phénomène de transactivation. Il s'oppose au mécanisme de transrépression qui inhibe l'activité des gènes cible de NF- κ B et qui sera décrit plus loin.

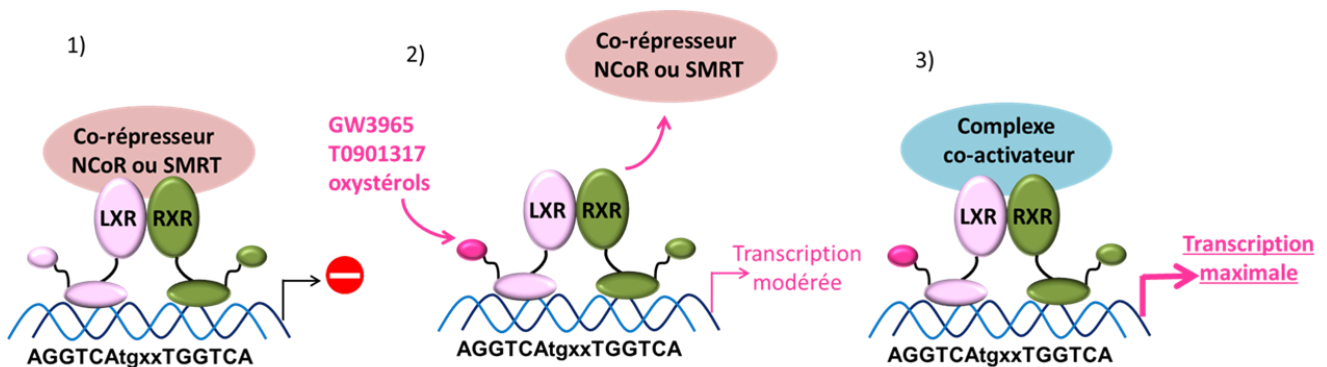


Figure 6 : Modèle de transactivation du récepteur LXR

1) En l'absence de ligand, l'hétérodimère LXR-RXR est fixé au niveau du site LXRE des gènes cibles de LXR et maintient en place les complexes co-répresseurs NCoR ou SMRT au niveau de l'ADN.

2) La liaison du ligand entraîne une libération de NCoR et SMRT et une activation modérée de la transcription. Puis, le recrutement d'un complexe co-activateur permet une transcription maximale du gène.

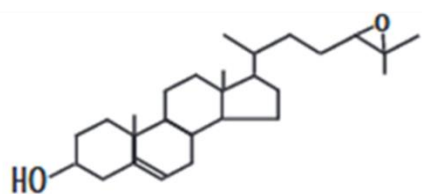
LXR: liver X receptor; RXR: retinoic X receptor; LXRE: LXR response element; NCoR: Nuclear receptor co-repressor; SMRT: Silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone receptor; GW3965 et T0901317: agonistes synthétiques de LXR

B. Les ligands du récepteur LXR

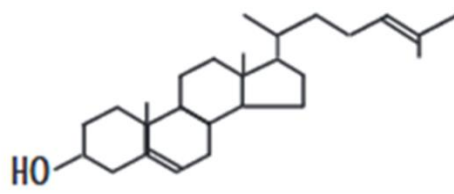
1) Les oxystérols

Lors de leur découverte, les récepteurs LXRs étaient considérés comme des récepteurs orphelins sans ligands clairement identifiés¹⁴⁶. Les oxystérols, dérivés oxydés du cholestérol, ont depuis largement été décrits comme étant des ligands endogènes et physiologiques de ces récepteurs^{152,153}. Les ligands de LXR peuvent être classés en quatre catégories :

- Les métabolites intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol comme le desmostérol précurseur direct du cholestérol ou le 24(S),25-époxycholestérol issu d'une voie métabolique parallèle^{158,159}.



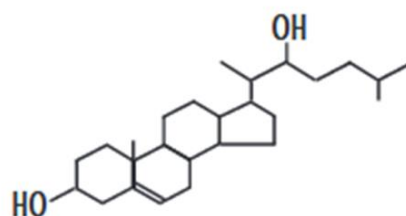
24(S),25-époxycholestérol



desmostérol

Figure 7 : Métabolites intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol

- Les métabolites intermédiaires de la stéroïdogénèse dont le 22(R)-hydroxycholestérol est un représentant majeur.



22(R)-hydroxycholestérol

Figure 8 : Métabolite intermédiaire de la stéroïdogénèse

- Certains acides biliaires (acides cholesténoïque, hyodéoxycholique et hyocholique) et leurs précurseurs (27-hydroxycholestérol) ¹⁶⁰.

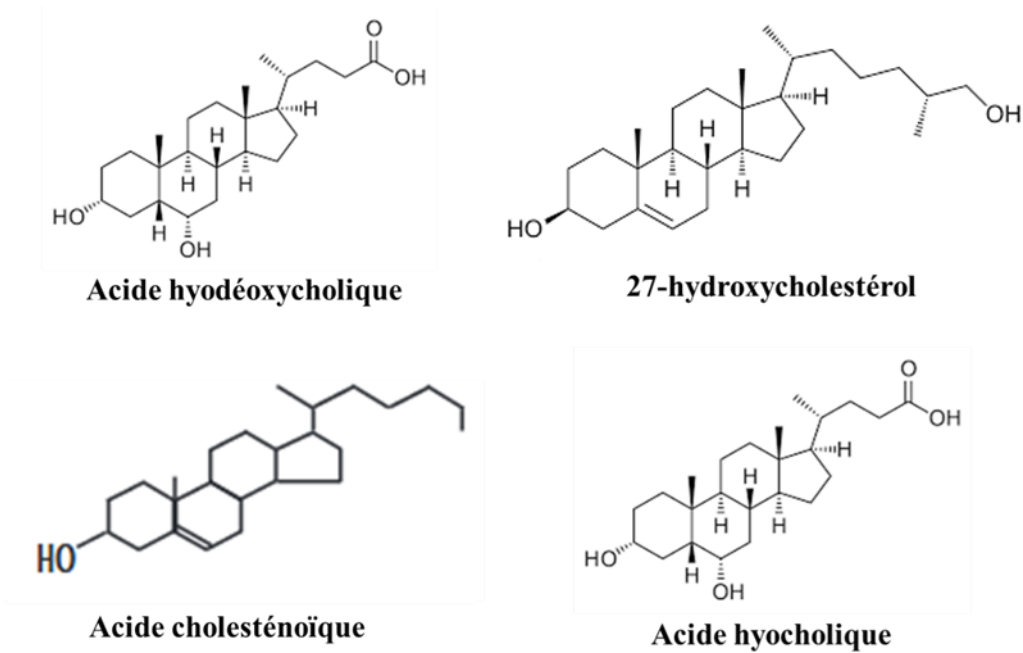


Figure 9 : Acides biliaires et certains de leurs précurseurs

- De nombreux dérivés hydroxylés du cholestérol issus de l'action d'hydroxylases appartenant majoritairement à la famille des cytochromes P450.

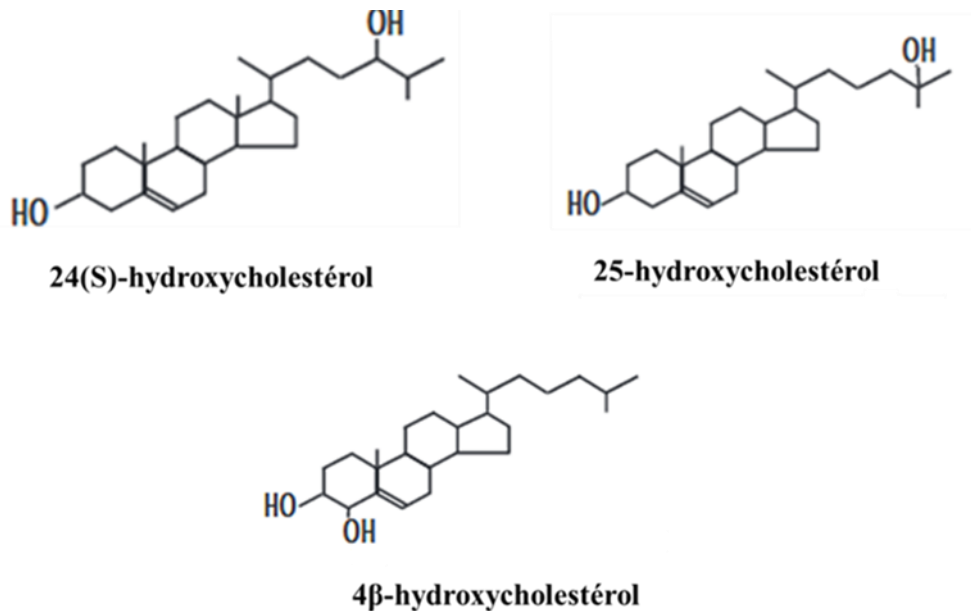
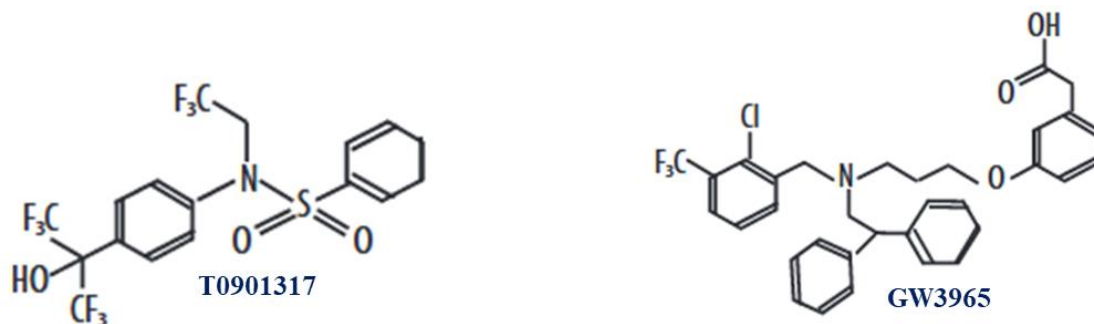


Figure 10 : Dérivés hydroxylés du cholestérol

Paradoxalement, si le cholestérol n'est pas un ligand endogène de LXR, ce sont ses variations intracellulaires qui conditionnent l'activité du récepteur. Les oxystérols au sein des lipoprotéines sont présents à des concentrations de l'ordre du micromolaire et sont formés à des taux proportionnels au taux de cholestérol qui est 10^3 à 10^6 fois plus abondant. Les oxystérols sont métabolisés beaucoup plus rapidement que le cholestérol et sont donc un reflet direct et précis des variations de la balance du cholestérol ¹⁶¹. L'affinité des oxystérols pour LXR α ou LXR β ne varie pas sauf pour les dérivés époxycholestérol qui lient préférentiellement LXR α ¹⁵³. Le fait que les oxystérols possèdent un groupement hydroxyl- sur leur chaîne latérale et une fonction β -hydroxyl- en position 3, conditionne l'affinité ligand-récepteur ¹⁵³. Majoritairement d'origine endogène, les oxystérols proviennent d'une hydroxylation enzymatique ou éventuellement d'une oxydation par des espèces réactives de l'oxygène. Une faible proportion des oxystérols est directement issue de l'alimentation ^{162,163}.

2) Les agonistes synthétiques

Les oxystérols ne sont pas les uniques ligands de LXR et de nombreuses molécules synthétiques ont été décrites comme étant capables d'activer le récepteur LXR. Parmi elles, deux agonistes synthétiques non stéroïdiens sont particulièrement utilisées dans les études expérimentales : le T0901317 et le GW3965. Si le T0901317 n'a aucune différence d'affinité pour LXR α ou LXR β (E.C50= 20 nmol/L), cet agoniste n'est pas complètement sélectif de LXR et peut également activer le récepteur PXR (Pregnane X Receptor) ou le récepteur FXR (Farnésyl X Receptor) mais avec des affinités moindres que pour LXR (EC50 = 4-7 μ mol/L) ^{164,165}. A l'inverse, le GW3965 est un agoniste spécifique de LXR mais présente une affinité plus élevée pour LXR β (E.C50= 30 nmol/L) que pour LXR α (E.C50= 190 nmol/L). La différence est cependant trop faible pour permettre de distinguer les deux isoformes. Outre leur forte affinité pour LXR, ces deux agonistes synthétiques sont métabolisés bien moins vite que les oxystérols et sont donc largement utilisés.



(d'après Wójcicka G. *et al.* 2007)

Figure 11 : Ligands synthétiques du récepteur LXR

3) Les agonistes naturels

De nombreux agonistes de LXR aux origines diverses ont été décrits au cours des dernières années. Parmi eux, certains phytostérols, notamment le stigmastérol, et certains oxyphytostérols peuvent être des ligands de LXR tout comme certains inhibiteurs de la pompe à protons. De nombreuses molécules d'origine naturelle sont également capable d'activer LXR. Certaines sont d'origine fongique, telle la paxilline, alcaloïde issu du *Penicillium paxilli*, ou bien d'origine végétale comme certains anthocyanoides (cyanidine) ou certains dérivés terpénoïques (cinéole) ¹⁵⁴.

4) Les antagonistes

Les acides gras polyinsaturés et notamment les acides arachidonique, docosahexaénoïque, eicosapentaénoïque ou linoléique sont des antagonistes compétitifs naturels de LXR. Il ne semble pas y avoir de différence d'effet entre oméga-3 et oméga-6, cependant, le degré d'insaturation conditionne la force de l'antagonisme : les acides gras monoinsaturés n'ont qu'un très faible effet antagoniste et les acides gras saturés n'en ont aucun ^{166,167}. Autre antagoniste naturel, le géranylgeranylpyrrophosphate, issu de la voie du mévalonate à l'origine de la biosynthèse du cholestérol, bloque l'interaction de LXR α et LXR β avec les complexes co-activateurs de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles ¹⁶⁸. Enfin, certains dérivés sulfonés et oxydés du cholestérol peuvent inhiber les effets de LXR. Le 5 α ,6 α -époxycholestérol-3-sulfonate a ainsi été décrit comme étant un antagoniste de LXR dans des cellules d'hépatocarcinome humain et un agoniste partiel dans des macrophages THP-1 ¹⁶⁹. Les antagonistes synthétiques, quant à eux, sont essentiellement représentés par le 22(S)-hydroxycholestérol, énantiomère du 22(R)-hydroxycholestérol et par

certaines fibrates dont la forme estérifiée bloque préférentiellement LXR alors que la forme libre vise PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated-Receptor-alpha*)¹⁷⁰.

| Agoniste de LXR | nature | E.C50 (nM) | | référence |
|---------------------------|-------------|--------------|-------------|--|
| | | LXR α | LXR β | |
| 22(R)-hydroxycholestérol | stéroïdien | 325 | | Spencer TA <i>et al.</i> Journal of Medicinal Chemistry, 2001 |
| 24(S), 25époxycholestérol | stéroïdien | 300 | | Wójcicka G. <i>et al.</i> Postepy Hig Med Dosw, 2007 |
| 24(S)-hydroxycholestérol | stéroïdien | 1500 | | Hiebl V <i>et al.</i> Biotechnology Advances, 2018 |
| 25-hydroxycholestérol | stéroïdien | 1160 | | Spencer TA <i>et al.</i> Journal of Medicinal Chemistry, 2001 |
| 27-hydroxycholestérol | stéroïdien | 250 | | Spencer TA <i>et al.</i> Journal of Medicinal Chemistry, 2001 |
| desmostérol | stéroïdien | 1000 | | Wójcicka G. <i>et al.</i> Postepy Hig Med Dosw, 2007 |
| Acide cholesténoïque | stéroïdien | 200 | | Wójcicka G. <i>et al.</i> Postepy Hig Med Dosw, 2007 |
| Acide hyodéoxycholique | stéroïdien | 5500 | | Wójcicka G. <i>et al.</i> Postepy Hig Med Dosw, 2007 |
| Acide hyocholique | stéroïdien | 17000 | | Wójcicka G. <i>et al.</i> Postepy Hig Med Dosw, 2007 |
| BMS-779788 | synthétique | 610 | | Kirchgessner TG. <i>et al.</i> J.Pharmacol Exp Ther, 2015 |
| T0901317 | synthétique | 20 | | Wójcicka G. <i>et al.</i> Postepy Hig Med Dosw, 2007 |
| GW3965 | synthétique | 190 | 30 | Wójcicka G. <i>et al.</i> Postepy Hig Med Dosw, 2007 |
| LXR623 | synthétique | 24 | 179 | Giannarelli C. <i>et al.</i> European Heart Journal, 2012 ; Katz <i>et al.</i> 2009 (étude clinique) |
| Antagoniste de LXR | | I.C50 (nM) | | référence |
| | | LXR α | LXR β | |
| Acide arachidonique | naturel | 7500 | 1500 | Hiebl V <i>et al.</i> Biotech. Advances, 2018 |
| GSK2033 | synthétique | 100 | 398 | Cayman Chemical |

Table 1 : Concentrations efficaces médianes ou inhibitrices médianes des principaux ligands de LXR

III. Régulation du récepteur LXR

A. Le récepteur LXR sous le contrôle de récepteurs nucléaires

Si LXR régule la transcription de ses gènes cibles, il peut à son tour être régulé par un récepteur nucléaire. Le promoteur du gène de LXR α , aussi bien humain que murin, contient un site de liaison PPRE (*peroxisome proliferator-activated-receptor-alpha response element*) pour les récepteurs PPAR α et le PPAR γ , dont la stimulation augmente l'expression de LXR α ¹⁷¹. Ceci est illustré par les résultats d'une étude où des monocytes circulants de patients traités pendant 4 mois par du fénobibrate, un agoniste PPAR α , ont présenté une surexpression de LXR α ¹⁷². Les acides gras polyinsaturés étant à la fois des antagonistes de LXR et des agonistes PPAR, ils peuvent induire une surexpression paradoxale de LXR α . Mais le traitement des cellules ou des animaux doit être prolongé pour que les acides gras activent dans un premier temps PPAR α et que celui-ci stimule secondairement le promoteur du gène de LXR α ¹⁷¹.

Le récepteur LXR possède également la capacité de s'autoréguler puisque trois sites de liaison LXRE ont été identifiés au niveau de son promoteur. Aussi bien LXR α que LXR β peuvent activer LXRE. Cependant, cette autorégulation n'a été décrite que chez l'Homme au niveau des macrophages, des adipocytes et des hépatocytes, et elle ne concerne que LXR α . Ce mécanisme est particulièrement actif au sein des macrophages spumeux où l'expression de LXR α est amplifiée par la stimulation continue des oxystérols¹⁷³.

B. Compétition vis-à-vis du récepteur LXR

C'est l'hétérodimère LXR-RXR qui se fixe au niveau du promoteur des gènes cibles. Mais la liaison entre RXR et LXR n'est pas spécifique et plusieurs récepteurs nucléaires peuvent ainsi entrer en compétition vis-à-vis d'un même pool disponible de RXR. Par exemple, une stimulation importante du récepteur de la vitamine D par son ligand, le 1,25-dihydroxy-cholécalciférol, peut empêcher l'activité transcriptionnelle de LXR¹⁷⁴. A l'inverse, les autres récepteurs nucléaires peuvent prendre la place de RXR et former des hétérodimères inactifs avec LXR. Lorsqu'il s'agit de FXR, on parle de *quenching* de LXR. Les hétérodimères LXR α -PPAR γ sont inactifs aussi bien vis-à-vis de PPRE que de LXRE. Quand il existe un site d'*overlapping* de LXRE et PPRE, comme pour le gène de la 7- α -hydroxylase murine, le complexe bloque autant l'accès du gène à PPAR α qu'à LXR α ¹⁷⁵.

C. Régulation hormonale

L'insuline stimule la lipogénèse. Or, il a été décrit que l'insuline augmente l'expression de LXR α aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Ceci peut laisser supposer que c'est en partie grâce au contrôle des enzymes de la synthèse *de novo* des acides gras par LXR que l'insuline régule le métabolisme lipidique¹⁷⁶.

Enfin, quelques études rapportent que certains œstrogènes peuvent inhiber l'action de LXR au sein de macrophages THP-1 ainsi que dans le foie et le tissu adipeux de souris¹⁷⁷.

IV. Rôle du récepteur LXR

A. Contrôle de l'homéostasie du cholestérol

Les oxystérols sont les principaux ligands physiologiques de LXR et le reflet direct du taux de cholestérol intracellulaire. En réponse à une surcharge en cholestérol, LXR peut favoriser l'efflux de cholestérol des cellules et limiter son internalisation intracellulaire. LXR peut également favoriser l'élimination du cholestérol par voie biliaire ou réguler son absorption intestinale. Ainsi, LXR est souvent qualifié de « senseur du cholestérol ».

1) Rôle du récepteur LXR dans le transport inverse du cholestérol

a) Efflux cellulaire de cholestérol

Le retour au foie du cholestérol issu des tissus périphériques et son élimination partielle dans la bile caractérisent le transport inverse du cholestérol. Pour quitter la cellule, le cholestérol est exporté de la membrane plasmique jusqu'à des accepteurs extracellulaires : les particules HDL, les apoprotéines APOAI et APOE (apoprotéine E) libres. L'efflux membranaire du cholestérol est sous la dépendance des deux protéines de transport ABCA1 et ABCG1^{178,179}. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* démontrent que ces deux transporteurs sont des cibles de LXR avec un site de liaison LXRE sur le promoteur de leurs gènes, et qu'une activation de LXR est associée à une augmentation de l'efflux du cholestérol intracellulaire¹⁸⁰. Ces deux récepteurs sont très présents au niveau des macrophages pour éviter la formation de cellules spumeuses mais sont également retrouvés sur beaucoup d'autres types cellulaires : adipocytes, hépatocytes, entérocytes...¹⁷⁸ Il existe cependant quelques différences entre les deux récepteurs. Si ABCA1 est situé au niveau membranaire

sous forme de monomère, la localisation d'ABCG1 est plus incertaine et son homodimérisation est nécessaire à son activité¹⁸¹. De plus, ABCA1 et ABCG1 exportent tous deux le cholestérol vers des lipoprotéines HDL-natives, mais seul ABCA1 l'exporte également vers des APOAI ou APOE libres ou faiblement lipidées ce qui le rend essentiel pour la formation du HDL-cholestérol au niveau hépatique et intestinal^{181,182}. Enfin, il semble qu'ABCA1 soit responsable de l'efflux de cholestérol issu des particules LDL-oxydées internalisées *via* les récepteurs *scavengers*, alors que ABCG1 exporterait préférentiellement le cholestérol des particules LDL captées par les récepteurs LDL-R¹⁸³.

Si *ABCA1* a été un des premiers gènes cibles de LXR décrits, LXR régule l'expression génique de plusieurs protéines impliquées dans l'efflux de cholestérol et ce à différents niveaux cellulaires. Pour gagner la membrane plasmique, le cholestérol intracellulaire est mobilisé depuis l'endosome tardif *via* deux protéines, les protéines Niemann-Pick C1 (NPC1) et Niemann-Pick C2 (NPC2). S'il est admis que LXR régule l'expression de NPC1 et NPC2, le mécanisme est toutefois encore mal connu puisque les gènes *NPC1* et *NPC2* sont dépourvus de LXRE¹⁸⁴. L'APOE est un accepteur extracellulaire de cholestérol dont le gène possède également un site de liaison LXRE capable de lier l'hétérodimère LXR-RXR¹⁸⁵. C'est également le cas des apoprotéines APOC1, APOC2 et APOC4 issues du même *cluster* de gènes¹⁸⁶. Une fois formées, les lipoprotéines peuvent subir des modifications dans leur structure sous l'action de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP), de la protéine de transfert des esters du cholestérol (CETP) ou de la lipoprotéine lipase (LPL). Ces différentes enzymes de remodelage des lipoprotéines sont également toutes régulées par LXR¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

b) Rôle du récepteur LXR dans la synthèse des acides biliaires

Une grande partie du cholestérol ramené au foie est métabolisé sous forme de sels biliaires sous l'action de la 7- α -hydroxylase, enzyme limitante de la biosynthèse des acides biliaires. Puisqu'un des rôles majeurs de LXR est de réguler les taux de cholestérol, il semblerait logique que son activation augmente la synthèse des acides biliaires pour favoriser l'élimination de cholestérol. Si effectivement le gène *Cyp7a1* est une cible de LXR chez la souris, LXRE est absent du promoteur du gène *CYP7A1* chez l'Homme. Cette différence pourrait expliquer le fait que les humains développent plus facilement une hypercholestérolémie en cas de régime riche en cholestérol que les souris. D'un autre côté, les acides biliaires sont essentiels pour la digestion et l'absorption des graisses par l'organisme. De plus, à forte dose, ils peuvent être toxiques ce qui rend la régulation de leur biosynthèse

nécessaire. Aussi, existe-t-il un rétrocontrôle négatif des acides biliaires sur leur propre synthèse. *Via* l'activation de FXR, les sels biliaires induisent la synthèse de la protéine SHP (*Small Heterodimer Partner*) qui en bloquant un co-activateur de l'ADN, inhibe l'expression du gène *CYP7A1*. Or, il a été décrit dans des hépatocytes humains que LXR α est capable d'activer le promoteur de SHP en cas de surcharge cellulaire en cholestérol ce qui permet de freiner la biosynthèse des acides biliaires. Ce mécanisme est cependant vite dépassé lors d'un enrichissement du régime alimentaire en cholestérol, et occupe une part minime dans le contrôle de la balance du cholestérol ¹⁹⁰. Enfin, les acides hyodéoxycholique et hyocholique peuvent activer LXR α ce qui inhibe l' α -hydroxylation des acides chénodéoxycholique et lithocholique, au profit de leur glucuronidation ce qui augmente la solubilité urinaire et favorise leur élimination ¹⁹¹.

2) Rôle du récepteur LXR dans l'absorption intestinale et l'élimination biliaire du cholestérol

Si l'activation de LXR favorise l'efflux de cholestérol des cellules et son excrétion *via* la bile, elle tend aussi à diminuer son absorption intestinale. Au niveau de la membrane apicale des entérocytes, ABCG5 et ABCG8, autres membres de la famille des *ATP-binding cassette transporters*, forment un hétérodimère responsable de l'excrétion du cholestérol non estérifié par l' acylCoA-cholestérol acyltransférase (ACAT) entérocytaire. La régulation du complexe ABCG5/G8 par LXR a d'abord été démontrée grâce à des modèles murins où un régime enrichi en cholestérol ou bien avec des agonistes synthétiques de LXR, entraînait une augmentation des ARNm de *ABCG5/G8* au niveau intestinal et hépatique. Plusieurs LXRE au niveau du promoteur du gène *ABCG5/G8* ont par la suite été découverts chez l'Homme ^{192,193}. Le transporteur ABCG5/G8 est également exprimé au niveau des hépatocytes canaliculaires où il favorise l'efflux de cholestérol dans la bile ¹⁹⁴.

Situé au niveau de la membrane apicale des entérocytes, le récepteur NPC1L1 est responsable de l'absorption du cholestérol à partir de la lumière intestinale. Une étude révèle que le fait de traiter des lignées d'entérocytes humains Caco-2/TC7 par des agonistes LXR entraîne une diminution des taux d'ARNm de *NPC1L1*. Ceci suggère fortement que *NPC1L1* est sous le contrôle transcriptionnel de LXR. ¹⁹⁵. Une corrélation négative entre les taux d'ARNm de LXR au sein de monocytes circulants de patients atteints de cirrhose non alcoolique et le taux d'expression duodénale de NPC1L1 a par ailleurs été décrite ¹⁹⁶. Mais

aucun LXRE n'a pour le moment été décrit au niveau du promoteur du gène *NPC1L1* et les mécanismes par lesquels LXR régule ce transporteur restent à élucider.

3) Rôle du récepteur LXR dans la captation cellulaire de cholestérol

La capacité des cellules à internaliser le cholestérol des lipoprotéines circulantes via les récepteurs LDL-R conditionne très fortement le taux de cholestérol intracellulaire. Lorsque les concentrations intracellulaires en cholestérol sont trop faibles, le facteur de transcription SREBP-2 est clivé au sein de l'appareil de Golgi et migre au niveau nucléaire pour favoriser la transcription du gène *LDLR* ¹⁹⁷. A l'inverse, les récepteurs LDL-R peuvent être dégradés par ubiquitinylation par la protéine IDOL (*Inducible degrader of the LDL-R*) qui possède une fonction E3-ubiquitine ligase. Or, aussi bien chez l'Homme que chez la souris, IDOL est une cible de LXR régulée via un site LXRE au niveau du promoteur du gène ¹⁹⁸. Le récepteur LXR régule donc aussi bien les entrées et les sorties de cholestérol de la cellule et maintient ainsi en équilibre la balance du cholestérol.

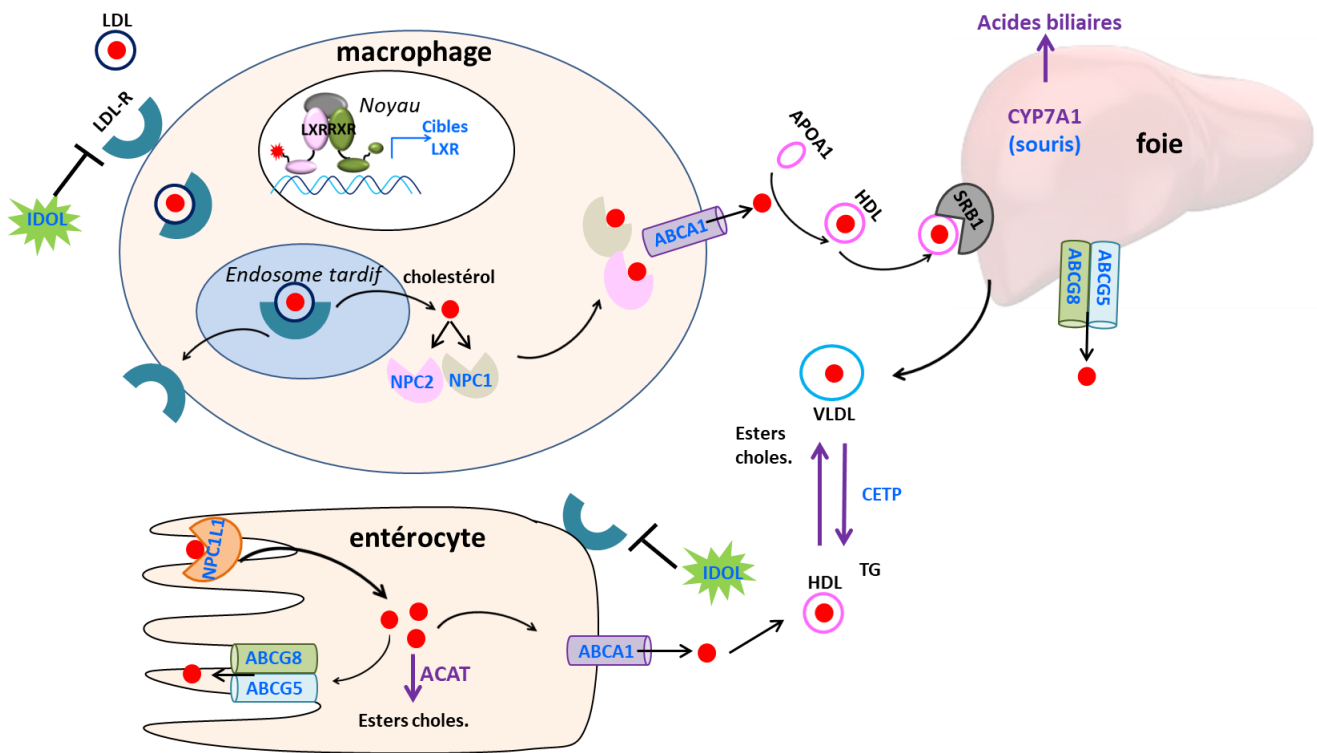


Figure 12 : Modulation du transport inverse du cholestérol par le récepteur LXR

Au niveau cellulaire, LXR induit l'expression de IDOL pour moduler les entrées de LDL-cholestérol *via* LDL-R et diminue l'expression entérocytaire du récepteur NPC1L1 pour diminuer l'absorption intestinale de cholestérol. LXR favorise également le transport du cholestérol depuis l'endosome tardif jusqu'à la membrane par NPC1 et NPC2 et son export des cellules par le transporteur ABCA1. Le cholestérol est pris en charge par APOA1 ce qui forme des particules HDL. Le HDL-cholestérol est capté par le foie au niveau des récepteurs SRB1. Au niveau entérocytaire ou hépatique, LXR induit l'expression de ABCG5/G8 pour favoriser l'élimination du cholestérol et le cycle entéro-hépatique. Chez la souris, LXR favorise l'expression de l'enzyme de synthèse des acides biliaires. Le foie recycle en partie le cholestérol en synthétisant des particules VLDL. Grâce à la CETP, les particules VLDL cèdent des triglycérides aux particules HDL en échange d'esters de cholestérol.

LXR : liver X receptor ; *RXR* : rétinoïc X receptor ; *IDOL* : inducible degrader of low-density lipoprotein receptor ; *LDL-R* : récepteur des LDL ; *LDL* : low density lipoprotein ; *NPC-1* et *NPC-2* : Niemann-Pick C1 et Niemann-Pick C2 ; *ABCA1* : ATP-Binding cassette A1 ; *HDL* : high density lipoprotein ; *SRB1* : récepteur scavenger B1 ; *APOA1* : apoprotéine A1 ; *VLDL* : very-low density lipoprotein ; *TG* : triglycérides ; *CETP* : protéine de transfert des esters du cholestérol ; *NPC1L1* : Niemann-Pick C1-like 1 ; *ABCG5* : ATP-Binding cassette G5 ; *ABCG8* : ATP-Binding cassette G8 ; *ACAT* : acyl-CoA cholestérol acyl-transférase ; *CYP7A1* : cholestérol-7- α -hydroxylase

B. Régulation de la lipogénèse

La stimulation de LXR par les oxystérols permet de réguler les taux de cholestérol, mais permet également de contrôler la lipogénèse hépatique ¹⁹⁹.

1) Régulation des enzymes de la lipogénèse par LXR

Le facteur de transcription SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) régule différentes enzymes impliquées dans la synthèse *de novo* des acides gras comme SCD-1 (stéaroyl-CoA désaturase 1), FASN (*fatty acid synthase*) et ACC (acétyl-CoA Carboxylase). Le promoteur du gène de chacune de ces enzymes contient un site de liaison spécifique de SREBP1c qui permet d'activer leur transcription ²⁰⁰. Avant de gagner le noyau, SREBP1c, localisé dans le réticulum endoplasmique, doit d'abord être clivé et activé au niveau de l'appareil de Golgi. LXR contrôle l'expression des enzymes SCD-1, FASN et ACC à la fois indirectement via le contrôle de l'expression du gène de SREBP1c, et directement grâce à la présence d'un site de liaison LXRE au niveau du promoteur de leurs gènes ^{201,202}. La régulation positive de la synthèse *de novo* des acides gras par LXR favorise la formation d'esters du cholestérol et permet ainsi de réguler en partie les taux de cholestérol libre toxique pour la cellule. En créant une double liaison au niveau de la position n-9 des acides gras saturés, SCD-1 génère ainsi des acides gras monoinsaturés, substrat préférentiel de l'ACAT pour l'estérification du cholestérol.

2) Le récepteur LXR : un lien entre lipogénèse et métabolisme glucidique

Indépendamment de SREBP1c, la lipogénèse hépatique peut aussi être régulée en fonction des apports glucidiques. Le facteur de transcription ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*) favorise la conversion d'un excès de glucose en lipides. Ce facteur de transcription est une cible directe de LXR et les agonistes LXR stimulent l'expression de ChREBP aussi bien *in vivo* chez des souris que *in vitro* sur des hépatocytes murins ²⁰³.

Une élévation de l'insulinémie s'accompagne d'une stimulation de la lipogénèse hépatique notamment grâce à une activation de SREBP1c. Parallèlement, une élévation des ARNm de LXR α , dose et temps-dépendante après stimulation de cultures d'hépatocytes primaires par de l'insuline a été décrite. Dans cette étude, il est démontré que l'induction insulinique de l'expression de SREBP1c est fortement impactée chez des souris qui n'expriment plus ni LXR α ni LXR β ¹⁷⁶. Il semble donc qu'il y ait une collaboration étroite entre LXR et insuline pour contrôler la lipogénèse. Paradoxalement, certains travaux

démontrent que si l'insuline ou LXR peuvent induire la transcription et l'expression du précurseur inactif de SREBP1c, seule l'insuline est vraiment capable de déclencher son clivage et son activation. L'hypothèse avancée est celle d'une sécurité qui empêcherait LXR de massivement activer la lipogenèse en situation d'hypoglycémie, ce qui serait délétère pour l'organisme. Ceci expliquerait alors en partie le fait que LXR favorise l'expression d'une protéine inhibitrice du clivage de SREBP1c, la protéine Insig 2 (*insuline induced gene*)²⁰⁴.

3) Stimulation du récepteur LXR et risque de stéatose hépatique

A l'inverse des oxystérols, les agonistes synthétiques non stéroïdiens de LXR ne sont pas capables d'inhiber le clivage de SREBP1c et sont donc responsables d'une stimulation supra physiologique de la synthèse hépatique des acides gras qui à terme peut provoquer une stéatose hépatique. Cette stéatose risque d'être majorée par le fait que pour favoriser l'export de cholestérol au niveau hépatique, LXR induit une augmentation de la synthèse des particules VLDL, des triglycérides et de la PLTP. Des souris traitées par du T0901317, développent ainsi une stéatose hépatique ainsi qu'une importante sécrétion hépatique de VLDL associée à une hypertriglycéridémie temporaire²⁰⁵. Etant donné que la CETP est une cible de LXR, l'utilisation thérapeutique des agonistes LXR pourrait entraîner une augmentation du taux de LDL-cholestérol en plus de la stéatose hépatique²⁰⁶. Ces désordres lipidiques constituent le principal frein au développement et à la mise sur le marché d'agonistes LXR comme traitement des MCV.

C. Rôle de LXR dans la régulation de l'inflammation

Si LXR a d'abord été étudié pour son rôle clef dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et dans la régulation de la lipogénèse, son implication potentielle dans la réponse inflammatoire a progressivement fait l'objet de plusieurs études. Effet anti-inflammatoire ou à l'inverse pro-inflammatoire ? Il semble que non seulement les effets de LXR sur la réponse inflammatoire impliquent des mécanismes cellulaires très différents, mais qu'ils varient également fortement d'une espèce à l'autre, notamment entre Homme et souris.

1) Effets anti-inflammatoires du récepteur LXR

Plusieurs études, réalisées sur des modèles murins, ont décrit des effets anti-inflammatoires de LXR. Si les deux mécanismes proposés sont très différents, dans les deux cas LXR, n'agit pas directement au niveau des gènes de l'inflammation. Le premier, la

transrépression, implique le recrutement du co-répresseur de la voie NF- κ B NCoR, alors que le second décrit une perturbation de la voie des TLRs due à une modification de la composition lipidique des membranes cellulaires.

a) La transrépression

Le phénomène de transrépression implique LXR uniquement sous forme monomérique. Dans ce modèle, la liaison spécifique du ligand entraîne une modification de la conformation du récepteur qui rend les résidus lysine accessibles à l'histone déacétylase 4 (HDAC4). Cette enzyme a une activité E3 ligase et permet de conjuguer les protéines SUMO-2 et SUMO-3 (*small ubiquitin-like modifier 2/3*) sur LXR. Le récepteur LXR modifié et son ligand se fixent au niveau du co-répresseur NCoR grâce au co-régulateur GPS2 (*G protein pathway suppressor 2*) et le maintiennent alors au niveau du promoteur pour empêcher le recrutement de NF- κ B et des autres complexes co-activateurs de la transcription^{132,133}. Il est important de noter que la transrépression est bien ligand-spécifique, mais elle concerne des gènes dépourvus de LXRE, et LXR sous forme sumoylée ne se lie pas directement sur l'ADN. Le modèle de transrépression impliquant LXR n'a cependant, à notre connaissance, pas encore été démontré chez l'Homme.

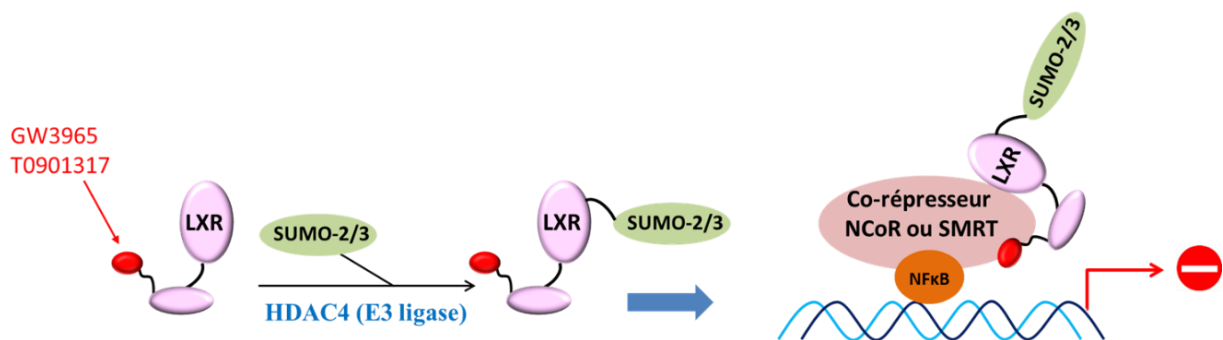


Figure 13 : Phénomène de transrépression par le récepteur LXR

La liaison du ligand provoque un changement conformationnel de LXR qui permet à l'enzyme HDAC4 à activité E3 ligase de conjuguer les protéines SUMO-2 et SUMO-3 sur LXR. Cet ensemble se fixe au niveau du co-répresseur NCoR ou SMRT pour les maintenir au niveau du promoteur et bloquer NF- κ B et la transcription des gènes de l'inflammation.

LXR: liver X receptor; *HDAC4*: Histone Déacétylase 4; *SUMO-2/3*: small ubiquitin-like modifier 2/3 ; *NCoR* : Nuclear receptor co-repressor ; *SMRT* : Silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone receptor ; *NF- κ B*: nuclear factor kappa B; *GW3965* et *T0901317*: agonistes synthétiques de LXR

b) Perturbations de la voie de signalisation des TLRs

Pour être active, la voie des TLRs nécessite le recrutement de tout un ensemble d'adaptateurs et de kinases qui s'activent en cascade. Les adaptateurs MyD88 et TRAF-6 (*TNF receptor associated factor 6*) permettent d'activer soit la voie des MAP-Kinases soit la voie de NF- κ B pour favoriser la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène. Le recrutement au niveau de la membrane plasmique de MyD88 et de TRAF-6 est donc déterminant dans l'activation de la voie des TLRs²⁰. Une étude rapporte que le traitement de macrophages murins par un agoniste LXR perturbe fortement l'activation de la voie des TLRs. Les auteurs décrivent une importante augmentation des taux d'ARNm d'*Abca1*, cible directe de LXR, associée à une diminution des taux d'ARNm d'*Il1b* lors d'une stimulation par du LPS après un prétraitement par du GW3965. L'hypothèse avancée est celle d'une activation massive de l'efflux de cholestérol membranaire par ABCA1 qui modifie profondément la composition lipidique et la fluidité de la membrane plasmique ce qui empêche la constitution des complexes membranaires TLRs. Ces modifications se traduisent par un appauvrissement des rafts lipidiques membranaires des macrophages en MyD88 et TRAF-6. Ces anomalies sont associées à une diminution de la translocation nucléaire de p65, la sous-unité de NF- κ B. Tous ces effets du GW3965 décrits dans les macrophages sont par ailleurs abolis dans des cellules *Abca1*^{-/-207}. Ainsi, cette étude réalisée chez la souris relie réponse anti-inflammatoire et rôle de LXR dans le contrôle de l'homéostasie lipidique puisque c'est l'efflux de cholestérol qui bloque la voie de signalisation des TLRs.

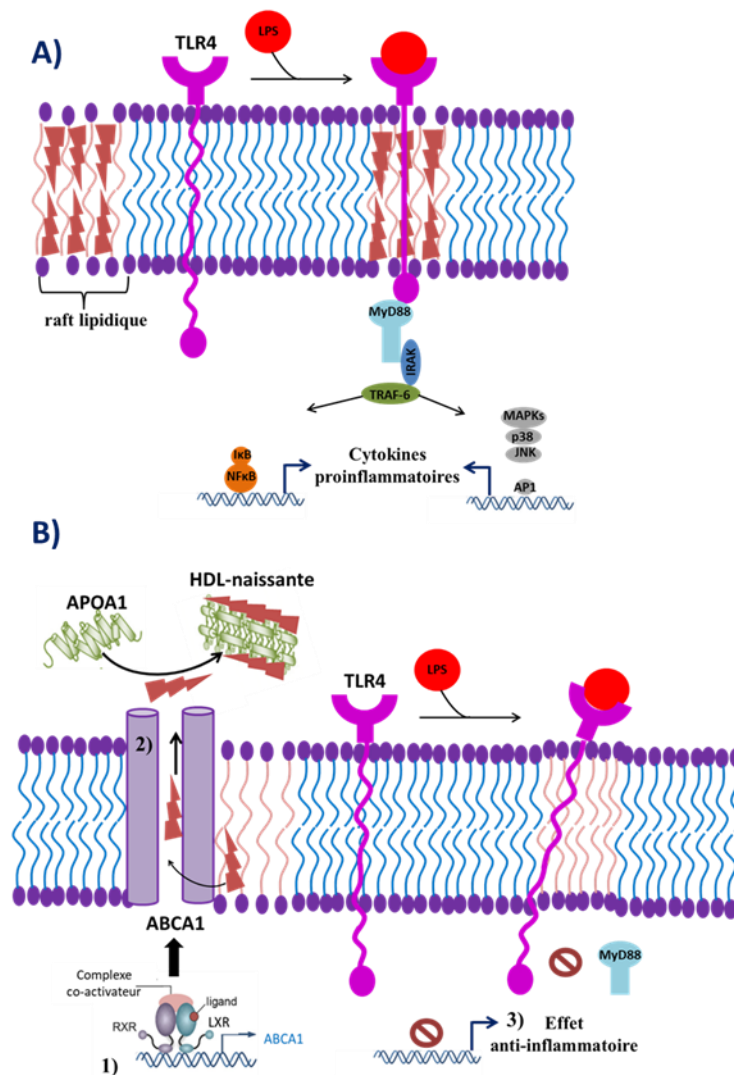


Figure 14 : Perturbations de la voie de signalisation des TLRs par le récepteur LXR chez la souris

A) Le cholestérol contenu dans les rafts lipidiques permet une rigidité suffisante des membranes pour recruter TLR4 lors d'une stimulation par du LPS et activer la voie NF- κ B et la voie des MAP-Kinases. B) Le traitement par un agoniste LXR induit l'expression de la protéine d'export du cholestérol ABCA1 et l'efflux de cholestérol membranaire sur les particules HDL. Les rafts lipidiques ainsi modifiés ne permettent ni la formation du complexe TLR4 ni le recrutement des adaptateurs MyD88 et TRAF-6 au niveau membranaire lors d'une stimulation par du LPS.

LXR : liver X receptor ; RXR : retinoic X receptor ; TLR4 : Toll-like receptor 4 ; LPS : lipopolysaccharide ; MyD88 : Myeloid differentiation primary response ; TRAF-6 : TNF receptor associated factor 6 ; IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinase ; NF- κ B : nuclear factor kappa B ; MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase ; p38 : p38 mitogen-activated protein kinase JNK : Jun-N-terminal kinase ; AP-1 : protéine activatrice-1 ; APOA1 : apoprotéine A1 ; HDL : high-density lipoprotein ; ABCA1 : ATP-Binding cassette A1 ; GW3965 et T0901317 : agonistes synthétiques de LXR

2) Effets pro-inflammatoires du récepteur LXR

Le récepteur TLR4 lie le LPS issu de la paroi des bactéries Gram négatives. Une cascade d'activation et de signalisation cellulaire se met alors en place pour favoriser la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène. Le récepteur TLR4 des macrophages est particulièrement impliqué dans l'activation et la mise en route de l'immunité innée. Une équipe a donc cherché à investiguer le rôle potentiel de LXR dans la voie de signalisation du LPS *via* TLR4 dans les macrophages humains. Les résultats démontrent que l'activation de LXR par des agonistes synthétiques (GW3965 et T0901317), mais aussi par des oxystérols, induit une augmentation significative des taux d'ARNm de *TLR4* et des concentrations protéiques de TLR4 dans des macrophages primaires humains. En revanche, le même traitement reste sans effet sur des macrophages murins ce qui s'explique par la mise en évidence d'un site de liaison LXRE uniquement sur le promoteur du gène *TLR4* humain. Ceci corrobore les données d'une étude qui a décrit que dans des macrophages murins, l'activation de LXR inhibe la réponse au LPS médiée par TLR4 et bloque la voie NF- κ B^{208,209}. A l'inverse, dans ce modèle humain, l'induction de TLR4 par LXR potentialise la réponse des macrophages au LPS *via* une augmentation significative de la phosphorylation des acteurs de la voie des MAP-Kinases Erk, Jnk et p38, associée à une sécrétion accrue de TNF α et de MCP-1 et à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Cette étude met donc en évidence le rôle clef que joue LXR dans la réponse inflammatoire en favorisant à la fois le recrutement et l'activation de macrophages, mais également la production d'espèces réactives de l'oxygène bactéricides²¹⁰. Notre équipe a également pu décrire le rôle pro-inflammatoire de LXR dans des macrophages primaires humains dont la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α ainsi que l'expression de TLR4 après une stimulation par du LPS est significativement accrue après un prétraitement par du T0901317 pendant 48 heures. Le prétraitement par des agonistes LXR reste par contre sans effet sur les macrophages murins. L'effet pro-inflammatoire du traitement des macrophages humains par le T0901317 résulte également de l'induction de LPCAT3 (lysophosphatidylcholine-acyl-transférase-3), enzyme permettant l'accumulation d'acide arachidonique dans les phospholipides membranaires, et de la sécrétion secondaire de PGE₂ et de TXA₂⁷⁷.

Les cellules dendritiques sont des cellules exprimant massivement les TLRs puisque leur fonction immunitaire est d'activer les lymphocytes CD4⁺ au niveau des nodules lymphatiques après la reconnaissance de l'antigène²¹¹. Puisque TLR4 a été décrit comme étant une cible de LXR dans les macrophages humains, une équipe a cherché à étudier

l'expression de LXR dans les cellules dendritiques et son rôle potentiel dans la réponse inflammatoire. Ces travaux ont mis en évidence que les cellules dendritiques humaines sont capables d'exprimer LXR et les gènes cibles de LXR lorsqu'elles sont différenciées en présence de GW3965. Les cellules sécrètent des taux plus élevés de TNF α , d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-12 après stimulation par du LPS si elles ont été prétraitées par un agoniste LXR. L'activation de la voie NF- κ B est fortement impliquée dans ce phénomène puisqu'il est décrit que la phosphorylation de la sous-unité p65 suite à une stimulation cellulaire par du LPS est prolongée chez les cellules prétraitées par du GW3965 par rapport à des cellules non traitées²¹². Ces données renforcent donc le rôle de LXR dans la réponse inflammatoire des cellules de l'immunité innée, macrophages ou cellules dendritiques.

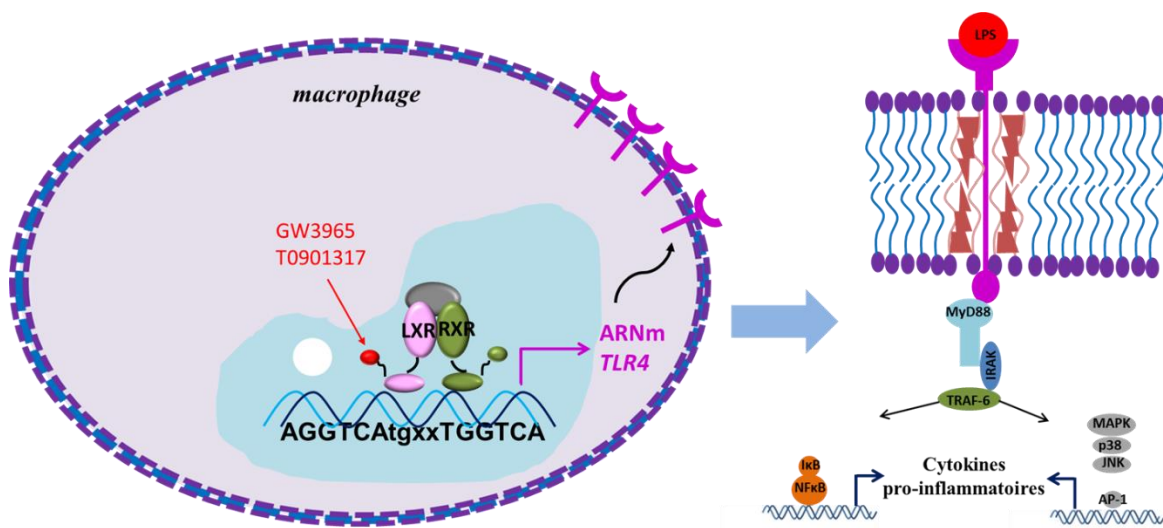


Figure 15 : Potentialisation de la réponse au LPS du récepteur TLR4 par le récepteur LXR chez l'Homme

La stimulation de macrophages humains par des agonistes LXR provoque la liaison de l'hétérodimère LXR-RXR sur le site de liaison LXRE présent sur le promoteur du gène *TLR4*. L'activation de la transcription de *TLR4* induit une augmentation de l'expression du récepteur au niveau membranaire. Les macrophages deviennent alors particulièrement réceptifs à une stimulation par du LPS ce qui se traduit par une augmentation significative du taux de phosphorylation des acteurs de la voie des MAP-Kinases (Jnk et p38) et de la production de TNF α , MCP-1 et des espèces réactives de l'oxygène.

LXR : liver X receptor ; *RXR* : retinoic X receptor ; *TLR4* : Toll-like receptor 4 ; *LXRE* : Liver X Receptor Response Element ; *LPS* : lipopolysaccharide ; *MyD88* : Myeloid differentiation primary response ; *TRAF-6* : TNF receptor associated factor 6 ; *IRAK* : interleukin-1 receptor-associated kinase ; *NF- κ B* : nuclear factor kappa B ; *MAPK* : Mitogen-Activated Protein kinase ; *p38* : p38 mitogen-activated protein kinase ; *JNK* : Jun-N-terminal kinase ; *AP-1* : protéine activatrice-1 ; *MCP-1* : monocyte chemoattractant protein-1 ; *TNF α* : tumor necrosis factor- α

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui évolue à bas bruit pendant des mois voire des décennies. Afin de tenter de mieux caractériser les processus inflammatoires qui conditionnent le passage à la vulnérabilité des plaques, nos travaux reposent sur deux approches différentes.

Notre premier axe de recherche se focalise sur le métabolisme des acides gras polyinsaturés au sein des plaques d'athérome et leur rôle dans la biosynthèse de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires, essentiellement dérivés de l'acide arachidonique comme la PGE₂ ou le LTB₄. Puisque les maladies cardiovasculaires sont la première complication associée au diabète, l'objectif de notre première étude est de réaliser une cartographie lipidique au sein de plaques d'athérome carotidiennes de patients diabétiques en regard de patients non-diabétiques afin d'identifier d'éventuelles espèces lipidiques différentiellement exprimées entre les deux populations et qui constitueraient alors de potentiels marqueurs d'instabilité des plaques.

Notre deuxième axe d'étude porte sur le rôle de LXR dans l'inflammation au niveau des macrophages, acteurs majeurs des foyers inflammatoires que constituent les lésions athérosclérotiques. En effet, comme présenté précédemment, les différents travaux portant sur le rôle de LXR dans la réponse inflammatoire permettent de différencier trois mécanismes distincts. Deux mécanismes aux effets anti-inflammatoires chez la souris : i) la sumoylation et la répression active des gènes de l'inflammation et ii) la déplétion des membranes en cholestérol et la répression de la voie des TLRs ; et un mécanisme qui au contraire potentialise la réponse pro-inflammatoire chez l'Homme : iii) la régulation transcriptionnelle de TLR4. Cette différence majeure sur la régulation du profil inflammatoire par LXR observée entre Homme et souris repose jusqu'alors en grande partie sur la régulation du gène *TLR4* par LXR, uniquement présente chez l'Homme. Néanmoins, afin de mieux caractériser les mécanismes pro-inflammatoires de LXR ou d'en identifier de nouveaux, cette étude vise à éclaircir le rôle de LXR sur la réponse inflammatoire des macrophages humains et d'évaluer son impact sur l'expression d'IL-1 β dans le contexte de l'athérosclérose.

ARTICLES

PREMIER ARTICLE

I. Introduction

Les sujets diabétiques ont quatre fois plus de risque de développer une maladie coronarienne et deux fois plus de risque d'avoir un AVC ²¹³. Si les multiples facteurs de risque qui associent diabète et complications cardiovasculaires tels que les dyslipidémies, l'hypertension, l'obésité, l'hyperglycémie et l'inflammation sont bien identifiés, les mécanismes moléculaires qui relient diabète et athérosclérose ne sont pas encore totalement élucidés ²¹⁴.

Le diabète est associé à un état inflammatoire chronique. Cette inflammation est initiée et entretenue au moins pour partie par les monocytes et les macrophages qui présentent un phénotype et des fonctions biologiques modifiés au cours du diabète. Ainsi, des monocytes issus de sujets diabétiques de type 1 et 2 ou de modèles murins de diabète, présentent un phénotype pro-inflammatoire et sécrètent des taux élevés d'IL1- β , d'IL-6 et de TNF α ²¹⁵. Les monocytes sécrètent également de forts taux de PGE₂, eicosanoïde aux propriétés pro-inflammatoires. Son précurseur direct, la PGH₂, est issu du métabolisme de l'acide arachidonique par COX2, enzyme dont une augmentation de l'activité et de l'expression a été décrite dans des monocytes de sujets diabétiques ²¹⁶. De plus, l'hyperglycémie favorise la stimulation de récepteurs RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) par des produits de glycation ce qui induit l'expression de COX2 *via* le recrutement du facteur de transcription NF- κ B ^{217,218}. Le métabolisme de l'acide arachidonique semble donc directement lié à l'inflammation dans le contexte du diabète.

L'implication des étapes précoces du métabolisme de l'acide arachidonique (biosynthèse, activation, incorporation dans les phospholipides) dans des processus pathologiques commence également à être reconnue. L'acylCoA-synthétase 1 (ACSL1) permet l'activation de l'acide arachidonique pour son incorporation dans les phospholipides membranaires. Il s'avère que cette enzyme est induite dans les monocytes de sujets diabétiques de type 1 et dans des modèles de souris diabétiques. Cette induction est associée à de forts taux d'arachidonoyl-CoA dans les cellules et à une sécrétion accrue de PGE₂. Ces modifications phénotypiques pro-inflammatoires, ainsi que l'augmentation des lésions athérosclérotiques associées, disparaissent chez les souris présentant une inactivation d'*Acs11*

au niveau des cellules myéloïdes ²¹⁹. Ces données suggèrent une perturbation de la distribution de l'acide arachidonique dans les phospholipides des monocytes- macrophages au cours du diabète. Si différentes études ont montré des altérations du profil des acides gras et des phospholipides au niveau des lipoprotéines et des cellules circulantes des patients diabétiques, le contenu et la distribution en acide arachidonique au niveau des plaques d'athérome des sujets diabétiques sont beaucoup moins bien connus ^{220,221}. Ces plaques sont réputées pour avoir des corps nécrotiques plus volumineux et être plus inflammatoires et donc plus vulnérables et sujettes à la rupture que les plaques de sujets non-diabétiques ^{222,223}.

L'ensemble de ces données laissent donc penser que des altérations qualitatives et quantitatives de la composition lipidique des plaques d'athérome peuvent être retrouvées chez les patients diabétiques. Afin de tenter de voir si la vulnérabilité des plaques d'athérome des sujets diabétiques peut s'expliquer par le contenu et la distribution de l'acide arachidonique dans la plaque, l'objectif principal de ce travail est de cartographier les espèces lipidiques riches en acides gras polyinsaturés au niveau de plaques d'athérome provenant d'endartériectomies carotidiennes issues de sujets diabétiques et de sujets non-diabétiques. Nous essayerons alors d'identifier des espèces lipidiques différenciellement exprimées entre les deux groupes. Les objectifs secondaires seront de corrélérer ces éventuelles différences de composition aux données cliniques (instabilité de la plaque, âge des patients...), en incluant les perturbations clinico-biologiques communément associées à la pathologie diabétique (taux d'HbA1c, IMC...).

II. Specific enrichment of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine in carotid atheroma plaque from type 2 diabetic patients

Atherosclerosis 251 (2016) 339–347



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Specific enrichment of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine in carotid atheroma plaque from type 2 diabetic patients



Louise Ménégaud^{a,b}, David Masson^{a,b,*}, Nicolas Abello^b, Damien Denimal^{a,b}, Caroline Truntzer^d, Patrick Ducoroy^d, Laurent Lagrost^{a,b}, Jean Paul Pais de Barros^{a,f}, Anne Athias^f, Jean Michel Petit^{a,b}, Laurent Martin^b, Eric Steinmetz^{a,b}, Benjamin Kretz^{b,c,e}

^a Centre de Recherche Inserm-UMR866, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, 21079, Dijon, France

^b Centre Hospitalier Universitaire Dijon, Hôpital du Bocage, 21034, Dijon, France

^c CRB Ferdinand Cabanne BB-0033-00044, France

^d Clinical Innovation Proteomic Platform - CLIPP, Pôle de Recherche Université de Bourgogne, 21000, Dijon, France

^e Centre Hospitalier Louis Pasteur, Colmar, France

^f Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne, 15 Bd De Latre de Tassigny, Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2015

Received in revised form

22 April 2016

Accepted 3 May 2016

Available online 4 May 2016

Keywords:

Atherosclerosis

Arachidonic acid

Lysophosphatidylcholine

Diabetes

ABSTRACT

Background and aims: Diabetic patients are at high risk of stroke and coronary artery disease. Recent data suggest that arachidonic acid metabolism is altered in diabetic conditions and that these alterations contribute to accelerated atherosclerosis. Little is known about how these alterations affect the metabolism and the proportions of different lipid species within the atherosclerotic plaque. The aim of our study was to perform a targeted lipidomic analysis of human atherosclerotic lesions, with a specific focus on PUFA-containing lipid species, to reveal differences in the fatty-acid composition of plaque in diabetic patients compared with non-diabetic controls.

Methods: Carotid atheroma plaque samples were obtained from 31 diabetic and 48 non-diabetic patients undergoing carotid endarterectomy. Targeted lipidomic analysis was then performed to determine the fatty acid composition of major glycerophospholipids and cholesteryl ester species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Results: Atheroma plaques from diabetic patients were significantly enriched with 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine (2-AA-LPC) ($2.3 \pm 0.8\%$ vs. $1.8 \pm 0.6\%$ $p = 0.0002$). Multivariable logistic regression showed that an increased 2-AA-LPC level was independently associated with diabetes. Finally, a positive relationship was found between 2-AA-LPC and HbA1c levels. Interestingly, endothelial lipase and calcium independent PLA2 gamma which could account for the production of 2-AA-LPC were detected in carotid plaques by immunohistochemistry.

Conclusions: 2-AA-LPC stands at the crossroads of major metabolic pathways that lead to the synthesis of bioactive molecules such as AA-derived eicosanoids, 2-AA-lysophosphatidic acid and 2-AA-glycerol. 2-AA-LPC therefore appears to be a promising molecule to investigate in the context of diabetes.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes is associated with a significantly higher incidence of cardiovascular complications related to several potential risk

factors including insulin resistance, hypertension, obesity, dyslipidemia, hyperglycemia and inflammation. However, the molecular mechanisms that link diabetes with accelerated atherosclerosis are not fully understood [1]. It is now well established that atherosclerosis in the context of diabetes also presents some different qualitative features. Several studies have demonstrated that atheroma plaques from diabetic subjects present larger necrotic cores, are more inflammatory and more vulnerable than similar-sized plaques from non-diabetic subjects [2–5]. Biochemical

* Corresponding author. INSERM UMR866, 7 bd Jeanne d'Arc, 21079, Dijon cedex, France.

E-mail address: david.masson@chu-dijon.fr (D. Masson).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.004>

0021-9150/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

analysis also revealed some differences in the lipid composition of diabetic lesions, such as higher levels of free fatty acids, which could potentially stimulate local plaque inflammation [6].

Recent data from experimental and clinical studies have demonstrated that atherosclerosis in the context of diabetes is not only a matter of dyslipidemia but also a chronic inflammatory state, which involves multiple mediators, plays a major role in the process. In this context, the pro-atherogenic roles of eicosanoids and other arachidonic acid (AA)-derivatives, which are produced by monocytes and macrophages in diabetic conditions, are emerging [7]. Indeed, evidence suggests that pathways leading to the synthesis of these lipid mediators are induced in diabetes. COX2 expression and activity were found to be higher in monocytes from diabetic patients than in those from control subjects [8]. In line with this, monocytes from diabetic patients have been shown to secrete higher levels of COX-derived eicosanoids including prostaglandin E2 (PGE2). The pathways leading to the synthesis of lipid mediators from AA and their actions on specific receptors are well known [7], but the potential involvement of the early steps of AA metabolism (synthesis, cell trafficking, activation and incorporation into glycerolipids) in pathological processes such as diabetes is still unclear. Inflammatory macrophages exhibit altered arachidonic acid handling, and reciprocally, an increase in Acyl-CoA synthetase long-chain family 1 (ACSL1) was observed in monocytes from diabetic mice and from Type 1 diabetic patients [9]. In diabetic mice, this increase was associated with increased cellular levels of arachidonoyl-CoA and increased PGE2 release from macrophages. The increased secretion of PGE2 as well as increased atherosclerosis was fully prevented by ACSL1 depletion in myeloid cells [9]. Altogether, these data suggest that alterations in arachidonic acid metabolism occur in monocytes and macrophages in diabetic conditions and could be responsible, at least in part, for the pro-inflammatory phenotype of these cells. Interestingly, ACSL1 has been shown to contribute to the long-term maintenance of AA levels in glycerophospholipids, suggesting that changes in ACSL1 should impact AA distribution amongst cellular lipids [10]. While alterations of the fatty acid composition of lipoproteins and membranes from peripheral blood cells have been documented in diabetic patients [11,12], it is unclear whether diabetic atherosclerotic plaques display specific changes in their AA content and more generally in their fatty acid composition. This is an important point to investigate because atheroma plaques display a specific fatty acid composition, influenced by dietary fatty acid but also by local lipogenesis [13,14]. Moreover fatty acids and their derivatives could directly influence the plaque properties. For example; oxidized products of AA accumulate in atherosclerotic lesions and may promote plaque instability [15–20]. In the present work, we performed a targeted lipidomic analysis of carotid atheroma plaque from 31 diabetic patients and 48 matched non-diabetic patients. We focused on major PUFA-containing lipid molecules including PCs, PEs, LPCs and CEs to find differential markers of diabetic plaque. We report here that besides having an increased FC/PC ratio, lesions from diabetic patients displayed increased proportions of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine. This bioactive molecule stands at the crossroads of major metabolic pathways and therefore appears to be a promising molecule to investigate in the context of diabetic atherosclerosis.

2. Materials and methods

2.1. A detailed materials and methods section is available as a supplemental file

The study protocol was reviewed and approved by the regional Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes Est, Dijon,

France). Seventy-nine consecutive patients were enrolled in the present study. They were admitted to the Department of Cardiovascular Surgery at the University Hospital of Dijon (Burgundy, France) for the surgical treatment of carotid stenosis greater than 70% whether symptomatic or not. All of the patients provided a signed informed consent. The plaques were categorized by the patient's physician as either symptomatic or asymptomatic according to the patient's history and clinical examination. Prior to biochemical analysis, all of the samples were stored at the local center for biological resources (CRB Ferdinand Cabanne BB-0033-00044) in liquid nitrogen (Samples Collection Identifier: DC-2011-1384). Heparinized blood plasma samples were collected in parallel on the day of surgery and kept at the CRB until analysis.

Carotid arteries were cut transversally below the level of the carotid bifurcation and resulting samples were either snap frozen in liquid nitrogen prior to lipidomic analysis (lower part) or fixed in formalin for morphological analysis and immunostaining (upper part). For lipidomic analysis, arteries were opened longitudinally and core samples of atheroma plaques were then harvested by using 3 mm biopsy punches (Kai Medical, Solingen, Germany). Sites of harvesting were normalized between the samples by selecting the plaque area corresponding to the maximal stenosis.

2.2. Biochemical analysis

Glycated hemoglobin A1c (HbA1c) was measured by high pressure liquid chromatography on a Tosoh G8 analyzer (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan). C reactive protein, troponin I, albumin, creatinine (Jaffe method), total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, were determined on a Dimension Vista analyzer using dedicated reagents (Siemens, Saint-Denis, France).

2.3. Cholesterol-esters quantitation by LC-MS/MS

Cholesteryl-esters were separated on a ZORBAX Eclipse Plus C8 column at a flow rate of 0.25 ml/min at 55 °C with a linear gradient of methanol/water (90/10) containing 10 mM acetate ammonium and 1 mM acetic acid (A) and of isopropanol/methanol (90/10) containing 10 mM acetate ammonium and 1 mM acetic acid (B) as follows: 5% B for 1 min, up to 80% B in 15 min, up to 100% in 1 min, and 100% for 1 min. Acquisition was performed in positive selected reaction monitoring ion mode (SIM).

2.4. Total cholesterol quantitation by GC-MS

Trimethylsilyl ethers of sterols analysis was performed by GC-MS in a 6890 gas chromatograph coupled with a 7673 Mass Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separation was achieved on a HP-5MS 30 m × 250 µm column (Agilent Technologies).

2.5. Phospholipids quantitation by LC-MS/MS

Lipids corresponding to 1 mg of tissue were spiked with a mix containing 1 µg of di14:0-PC, 1 µg of di14:0-PE, 1 µg of d18:1/17:0-SM and 0.1 µg of 14:0-LPC used as internal standards. Phospholipids were analyzed by LC-MS/MS using a 6460 mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with an electrospray ionization source and MassHunter data system. The liquid chromatography was performed on a Zorbax Eclipse SB-C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.6. Phospholipase treatment

di17:0-PC (5 µg) (Avanti Polar Lipids, Cogee, Paris, France) was incubated for 2 h at 37 °C with either 2 µl of Phospholipase A2

(PLA2 from *Apis mellifera*, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 25 μ l Phospholipase A1 (*Thermomyces lanuginosus*, Sigma Aldrich, L3295) or without enzymes. Reactions were stopped by the addition of 200 μ l MeOH pH 4.0. Hydrolysis products were analyzed by LC-MS/MS as described above.

2.7. Immunohistological analysis of carotid plaques

The samples were fixed in neutral buffered formalin, dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene and embedded in paraffin. Serial samples were cut for hematoxylin–eosin staining (HES) and immunohistochemical analysis. Automated immunohistochemistry (Dako Omnis) was performed using standard procedures on serial sections of plaques. The following antibodies were used: PNPLA8 antibody (NBP1-83098, rabbit polyclonal, 1/100), Endothelial lipase antibody (NBP2-02396, mouse monoclonal 1/50) (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), CD68 (GA609, KP1, mouse monoclonal, 1/300, Dako, Courtaboeuf, France). The percentage of positively stained area as a function of the total plaque area was determined by computer-assisted morphometry of the plaques by an investigator blinded to the patient's diagnosis. Morphological characteristics of the plaques were determined on hematoxylin–eosin sections.

2.8. Statistical analysis

Demographic and major biological parameters were analyzed by a Student's *t*-test or non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney test. The *p*-value for statistical significance was corrected for multiple test comparison. For qualitative analysis of fatty acid distribution, modified *t*-tests were performed independently for each of the 4 types of lipids (PCs, PEs, CEs and LPCs). The modification concerns the estimation of the variance of each of the variables: a Bayesian approach was applied to estimate a variance that takes into account all of the variables. This test is implemented in the LIMMA package of the R software (<http://cran.r-project.org>). To take into account the multiplicity of the tests, a 5% FDR correction was performed; this means that among the selected variables, 5% may be false positives. These steps were performed for each class of lipid separately. To test the association between the presence of diabetes and the other variables of interest, a logistic multivariate model was used. For each of the variables, a Wald-test was used to test the significance of the association. Correlation between HbA1c and 2-AA-LPC was assessed by using a non-parametric Spearman test.

3. Results

3.1. Clinical and biological parameters

Patients' characteristics are provided in Table 1. Diabetic status was based on the patient report at the time of the surgery. Most of the patients were efficiently managed for diabetes and presented mildly impaired glycemic control as compared with the control group (glycated hemoglobin levels $7.3 \pm 1.4\%$ vs. $5.8 \pm 0.4\%$; $p < 0.001$). As expected, diabetic subjects displayed a higher BMI and tended to have higher plasma triglyceride levels. Other clinical and biological parameters including age, gender and % of smokers were similar in the two groups. Surprisingly, plasma CRP levels did not differ between the two groups which could be related to the high statin usage in our population (Approx. 75% in both groups, Table 1). Interestingly, the percentage of symptomatic lesions did not differ between diabetic and non-diabetic subjects. Morphological analysis of the lesions was performed on HES sections for the samples that were available for analysis (74 samples out of 79

total samples). Major parameters including calcification, fibrosis, necrotic core, extracellular lipids were evaluated (Table 1). Lesions from diabetic patients appeared to be significantly more calcified as compared with control subjects. Other parameters did not differ significantly between the two populations.

3.2. Phospholipid and cholesterol content of carotid atheroma plaques

Overall analysis of the phospholipid and cholesterol content of the plaques showed no significant differences between the two groups. Nevertheless, diabetic lesions tended to have higher levels of free cholesterol (Table 2). It is worth pointing out that the lipid content of the samples, when expressed per mg of total plaque, was extremely heterogeneous; therefore, the data were also normalized for the total amount of phosphatidylcholines, which are the major class of glycerophospholipids present in cell membranes. In this analysis, the higher free cholesterol/PC ratio in the lesions from diabetic patients became statistically significant before correction for multiple tests comparison (Table 2). A tendency toward an increased free cholesterol/esterified cholesterol ratio was also observed suggesting that an alteration of cholesterol esterification/hydrolysis could be involved (Table 2).

3.3. Qualitative analysis of cholesteryl esters and phospholipid subclasses

Our main goal was to assess qualitative changes in the fatty acid composition of major phospholipids and cholesteryl esters with a specific focus on PUFA and AA distribution. As expected, sphingomyelin species did not contain detectable amount of PUFA. Moreover, no qualitative changes were observed between diabetics and control subjects regarding their fatty acid compositions (Table 3). Regarding cholesteryl esters, cholesterol linoleate was the most abundant species in atheroma plaques from both groups (Table 3). CE in the plaque from diabetic patients tended to be richer in saturated fatty acid at the expense of monounsaturated fatty acid (expressed as the SFA/MUFA ratio) but the difference did not remain significant after correction for multiple comparisons.

Qualitative analysis of PEs and PCs did not reveal any alterations of the distribution of AA-containing species in the diabetic group. The 18:0/20:3 PC molecule was increased in diabetic patients but the difference was not significant with an FDR at 5% (Table 3). Qualitative analysis of LPCs revealed more pronounced changes (Table 3). Chromatography of each LPC (Fig. 1A and B) showed two distinct peaks. Complementary experiments using phospholipases A1 and A2 (PLA1 and PLA2) allowed us to confirm that the two peaks corresponded to sn-1 and sn-2 isomers (Fig. 1C and D). Indeed, *in vitro* PLA1 treatment of di17:0-PC led to the appearance of the peak of 17:0 LPC with the shortest retention time, at the opposite PLA2 treatment induced the appearance of the isomer with the longest retention time. Interestingly, plaque samples from diabetic subjects showed a significantly higher proportion of sn-2 arachidonoyl-lysophosphatidylcholine (2-AA-LPC), and the difference remained significant after correction for multiple comparisons (Table 3 and Fig. 1A). Moreover, the molar ratio of 2-AA-LPC to C16:0/C20:4-PC was significantly increased in diabetic patients versus control group (0.053 ± 0.044 vs. 0.030 ± 0.027 $p = 0.00457$).

3.4. Multivariable logistic regression analyses

Multivariable logistic regression models were used to assess the association between diabetes and various parameters differentially expressed between the two groups (16:0CE, 2-AA-LPC, SFA/MUFA ratio in CE, 18:0/20:3 PC as well as BMI were introduced in the

Table 1

Clinical and biological parameters of the patients. Data are expressed as mean \pm S.D. except CRP, troponin and triglycerides that are reported with median and IQR. "High" and "Low" scores for calcification, fibrosis, necrotic core and extracellular lipids were determined on hematoxylin-eosin stained sections by a trained physician.

| | Diabetics | Controls | p-value (p=) |
|---|-------------------|-------------------|--------------|
| <i>Clinical data</i> | | | |
| Age (years) | 72.90 \pm 7.88 | 71.90 \pm 9.95 | 0.75 |
| Gender (M/F) | 23/8 | 39/9 | 0.46 |
| BMI (kg/m ²) | 28.41 \pm 4.38 | 26.14 \pm 4.39 | 0.03* |
| Smoking | 22 (71%) | 27 (56%) | 0.16 |
| <i>Diabetic treatment</i> | | | |
| No treatment | 3 (9.7%) | – | – |
| Biguanid | 18 (58.1%) | – | – |
| Sulfonylurea | 11 (35.5%) | – | – |
| Insulin | 7 (22.6%) | – | – |
| DDP-4 inhibitor | 1 (3.2%) | – | – |
| Incretin-mimetic | 1 (3.2%) | – | – |
| Statin treatment | 23 (74%) | 35 (72%) | 0.75 |
| <i>Symptomatic lesions</i> | | | |
| Extension (common carotid) | 10 (32.3%) | 18 (37.5%) | 0.69 |
| Calcification | 0.728 \pm 0.260 | 0.728 \pm 0.217 | 0.997 |
| | Low | 4 (13.8%) | 0.025* |
| | High | 25 (86.2%) | |
| Fibrosis | 26 (89.7%) | 38 (84.4%) | 0.522 |
| | Low | 3 (10.3) | |
| | High | 7 (15.6%) | |
| Necrotic Core | 19 (65.5%) | 24 (53.3%) | 0.300 |
| | Low | 10 (34.5%) | |
| | High | 21 (46.7%) | |
| Extracellular lipids | 17 (58.6%) | 21 (46.7%) | 0.315 |
| | Low | 12 (41.4%) | |
| | High | 24 (53.3%) | |
| <i>Plasma parameters</i> | | | |
| HbA1c (%) | 7.3 \pm 1.4 | 5.8 \pm 0.4 | 0.001* |
| CRP (mg/L) | 1.83 (5.15) | 3.20 (5.62) | 0.35 |
| Troponin I (>0.045 μ g/L) | 2 (6.4%) | 1 (2.1%) | 0.33 |
| Albumin (g/L) | 38.03 \pm 4.30 | 37.40 \pm 3.36 | 0.47 |
| Creatinine (μ mol/L) | 93.3 \pm 24.0 | 95.54 \pm 43.4 | 0.87 |
| Total Cholesterol (mmol/L) | 4.11 \pm 1.15 | 4.31 \pm 1.25 | 0.49 |
| HDL cholesterol (mmol/L) | 1.13 \pm 0.25 | 1.24 \pm 0.39 | 0.21 |
| LDL cholesterol (mmol/L) | 2.02 \pm 0.94 | 2.30 \pm 1.07 | 0.25 |
| Triglycerides (mmol/L) | 1.86 (1.51) | 1.44 (0.94) | 0.06 |
| Free cholesterol (mmol/L) | 0.98 \pm 0.38 | 1.02 \pm 0.39 | 0.64 |
| Phospholipids (mmol/L) | 2.65 \pm 1.04 | 2.87 \pm 1.05 | 0.48 |
| Free cholesterol/phospholipids | 0.39 \pm 0.14 | 0.37 \pm 0.12 | 0.57 |
| Free cholesterol/esterified cholesterol | 0.33 \pm 0.13 | 0.33 \pm 0.16 | 0.33 |

Table 2

Overall lipid composition of atheroma plaques from diabetic patients and control subjects expressed as nmol/mg of plaque or normalized by the amount of phosphatidylcholines. Data are expressed as median with IQR.

| | Diabetics (n = 31) | Controls (n = 48) | p-value p= |
|---|--------------------|-------------------|------------|
| <i>Molar composition (nmol/mg plaque)</i> | | | |
| Lysophosphatidylcholines (LPC) | 1.19 (1.66) | 0.83 (1.15) | 0.29 |
| Phosphatidylcholines (PC) | 6.76 (6.75) | 6.55 (4.45) | 0.85 |
| Phosphatidylethanolamines (PE) | 0.46 (0.24) | 0.35 (0.15) | 0.08 |
| Sphingomyelins | 8.28 (6.36) | 6.84 (3.94) | 0.22 |
| Total Cholesterol (TC) | 94.2 (85.68) | 63.6 (107.57) | 0.23 |
| Free Cholesterol (FC) | 78.6 (93.94) | 35.4 (78.59) | 0.15 |
| Esterified Cholesterol (EC) | 20.5 (29.34) | 23.3 (24.13) | 0.69 |
| <i>Lipid molar ratio</i> | | | |
| LPC/PC | 0.15 (0.12) | 0.12 (0.15) | 0.12 |
| PE/PC | 0.06 (0.05) | 0.05 (0.05) | 0.25 |
| SM/PC | 1.32 (0.66) | 1.12 (0.53) | 0.13 |
| FC/PC | 8.61 (9.38) | 5.38 (5.13) | 0.023 |
| EC/PC | 2.41 (4.70) | 3.86 (2.93) | 0.66 |
| FC/EC | 2.74 (3.02) | 1.33 (1.27) | 0.035 |

model). In these models, only 2-AA-LPC and BMI remained significantly and positively associated with the presence of diabetes (Fig. 1G). We next investigated whether the higher proportion of 2-AA-LPC could be related to the impairment of glycemic control or increased inflammation. Interestingly, while 2-AA-LPC enrichment was not associated with plasma CRP concentrations or to changes in plaques morphology, it was positively and significantly correlated with glycated hemoglobin levels when taking into account the whole population ($R_s = 0.30$; $p < 0.008$) (Fig. 1F). However, the

correlation was no longer significant when the analysis was performed separately in the two groups of diabetic and non-diabetic subjects.

3.5. Immunohistochemical analysis

Since 2-AA-LPC can be generated through the action of phospholipases A1, we searched for the presence of potential candidates such as endothelial lipase (EL) and calcium-independent PLA2

Table 3

Fatty acid distribution in glycerophospholipids and cholesteryl esters species in atheroma plaques from diabetic patients and control subjects. The relative abundance of each species was calculated as mol % related to the total lipid class concentration. PC, phosphatidylcholines; PE, phosphatidylethanolamines; LPC, lysophosphatidylcholines; CE, cholesteryl esters. SM, sphingomyelins. Results are expressed as mean \pm S.D. * $p \leq 0.05$ after correction for multiple comparisons.

| Molecular species | Diabetics | Controls | p-value $p=$ |
|-------------------|------------------|------------------|--------------|
| PC | | | |
| 16:0/16:0 | 12.1 \pm 2.7 | 11.88 \pm 2.2 | 0.738 |
| 16:0/16:1 | 4.3 \pm 2.4 | 4.50 \pm 2.6 | 0.727 |
| 16:0/18:1 | 24.1 \pm 3.4 | 25.22 \pm 4.5 | 0.095 |
| 16:0/18:2 | 14.2 \pm 2.7 | 14.43 \pm 3.7 | 0.762 |
| 16:0/20:4 | 9.1 \pm 2.4 | 9.85 \pm 2.8 | 0.193 |
| 16:0/22:6 | 1.6 \pm 0.5 | 1.74 \pm 0.6 | 0.356 |
| 18:0/18:1 | 3.9 \pm 0.7 | 3.91 \pm 0.6 | 0.966 |
| 18:0/18:2 | 9.0 \pm 1.6 | 8.63 \pm 1.4 | 0.310 |
| 18:0/20:3 | 7.0 \pm 2.5 | 5.39 \pm 2.2 | 0.004 |
| 18:0/20:4 | 7.4 \pm 1.5 | 7.08 \pm 1.5 | 0.330 |
| 18:0/22:6 | 0.7 \pm 0.2 | 0.70 \pm 0.2 | 0.964 |
| 18:1/18:2 | 4.8 \pm 0.9 | 4.82 \pm 0.9 | 0.913 |
| 18:1/20:4 | 1.8 \pm 0.4 | 1.83 \pm 0.5 | 0.563 |
| PE | | | |
| 16:0/18:1 | 8.0 \pm 2.1 | 8.0 \pm 1.4 | 0.872 |
| 16:0/18:2 | 3.1 \pm 0.1 | 3.2 \pm 0.8 | 0.668 |
| 16:0/20:4 | 4.7 \pm 0.01 | 5.1 \pm 0.8 | 0.048 |
| 16:0/22:6 | 4.3 \pm 0.01 | 4.6 \pm 0.9 | 0.131 |
| 18:0/18:1 | 15.0 \pm 1.5 | 14.1 \pm 1.4 | 0.015 |
| 18:0/18:2 | 10.3 \pm 2.9 | 9.4 \pm 2.8 | 0.190 |
| 18:0/20:4 | 33.0 \pm 2.5 | 33.3 \pm 2.8 | 0.631 |
| 18:0/22:5 | 5.1 \pm 1.5 | 5.3 \pm 1.4 | 0.488 |
| 18:0/22:6 | 7.3 \pm 1.5 | 7.6 \pm 1.2 | 0.464 |
| 18:1/18:2 | 3.0 \pm 0.01 | 3.0 \pm 0.9 | 0.977 |
| 18:1/20:4 | 5.5 \pm 0.6 | 5.5 \pm 0.7 | 0.742 |
| 18:1/22:6 | 0.8 \pm 0.4 | 1.0 \pm 0.6 | 0.091 |
| LPC | | | |
| 16:0 | 46.8 \pm 2.5 | 48.2 \pm 2.7 | 0.022 |
| 16:0 sn1 | 37.8 \pm 3.5 | 39.2 \pm 2.6 | 0.044 |
| 16:0 sn2 | 9.0 \pm 2.7 | 9.0 \pm 0.6 | 0.919 |
| 18:0 | 25.4 \pm 4.8 | 26.6 \pm 4.7 | 0.277 |
| 18:0 sn1 | 20.0 \pm 3.8 | 20.6 \pm 3.7 | 0.485 |
| 18:0 sn2 | 2.9 \pm 0.7 | 2.9 \pm 0.8 | 0.862 |
| 18:1 | 14.3 \pm 3.2 | 13.2 \pm 3.0 | 0.129 |
| 18:1 sn1 | 11.4 \pm 2.9 | 10.3 \pm 2.6 | 0.097 |
| 18:1 sn2 | 2.9 \pm 0.7 | 2.9 \pm 0.8 | 0.862 |
| 18:2 | 9.8 \pm 2.7 | 8.8 \pm 2.6 | 0.110 |
| 18:2 sn1 | 7.6 \pm 2.5 | 6.7 \pm 2.2 | 0.122 |
| 18:2 sn2 | 2.2 \pm 0.8 | 2.1 \pm 0.7 | 0.453 |
| 20:4 | 3.7 \pm 1.5 | 3.1 \pm 1.5 | 0.119 |
| 20:4 sn1 | 1.4 \pm 1.2 | 1.4 \pm 1.2 | 0.917 |
| 20:4 sn2 | 2.3 \pm 0.8 | 1.8 \pm 0.6 | 0.0002* |
| CE | | | |
| 16:0 | 11.10 \pm 2.44 | 9.57 \pm 2.97 | 0.017 |
| 16:1 | 1.86 \pm 0.90 | 2.03 \pm 1.16 | 0.524 |
| 18:0 | 0.15 \pm 0.24 | 0.14 \pm 0.28 | 0.867 |
| 18:1 | 13.96 \pm 2.82 | 14.79 \pm 3.24 | 0.257 |
| 18:2 | 56.70 \pm 6.25 | 57.31 \pm 7.60 | 0.691 |
| 18:3 | 1.54 \pm 0.56 | 1.47 \pm 0.35 | 0.487 |
| 20:3 | 2.80 \pm 1.63 | 3.46 \pm 2.49 | 0.211 |
| 20:4 | 9.69 \pm 2.07 | 8.99 \pm 1.55 | 0.113 |
| 22:6 | 2.19 \pm 1.37 | 2.26 \pm 1.42 | 0.877 |
| SFA/MUFA | 0.72 \pm 0.19 | 0.60 \pm 0.22 | 0.009 |
| SM | | | |
| d18:1/15:0 | 5.3 \pm 3.5 | 5.0 \pm 2.7 | 0.749 |
| d18:1/16:0 | 55.6 \pm 4.0 | 56.4 \pm 3.9 | 0.390 |
| d18:0/16:0 | 3.6 \pm 0.9 | 3.3 \pm 0.9 | 0.253 |
| d18:1/18:0 | 5.2 \pm 1.6 | 5.5 \pm 1.4 | 0.446 |
| d18:1/20:0 | 2.9 \pm 1.0 | 3.0 \pm 0.7 | 0.472 |
| d18:1/22:0 | 6.1 \pm 2.1 | 5.8 \pm 1.9 | 0.492 |
| d18:1/24:1 | 15.8 \pm 2.7 | 15.3 \pm 2.4 | 0.399 |
| d18:1/24:0 | 5.5 \pm 1.6 | 5.6 \pm 1.3 | 0.738 |

gamma (PNPLA8) as well as markers of macrophages infiltration (CD68) in some samples of carotid plaques from non-diabetic and diabetic subjects. As previously described, we observed a

significantly higher macrophage infiltration in plaques from diabetic subjects (Fig. 2A and B) [21]. Both EL and PNPLA8 could be detected in carotid plaques and colocalized mainly with macrophage staining (Fig. 2A and B); however, a stronger signal was observed for EL as compared to PNPLA8. Moreover, EL immunostaining was significantly higher in diabetic patients while no differences were retrieved for PNPLA8 (Fig. 2B).

4. Discussion

Apart from the poorer glycemic control and antidiabetic treatments, the demographic and clinical profiles of the cohort of diabetic patients were broadly similar to those of the non-diabetic subjects. Surprisingly, diabetic patients did not present an increased inflammatory status (as assessed by plasma CRP levels), this lack of difference could be explained by the high statin usage in the two populations. Overall analysis of phospholipids and cholesterol content of the plaques showed no significant differences, except for a tendency toward higher levels of free cholesterol in diabetic lesions. Interestingly, a similar trend was reported in a previous study, in which the higher levels of free cholesterol were also associated with plaque vulnerability [22]. It remains to be determined whether this enrichment contributes by itself to the diabetic atherosclerotic process; this point is likely in view of the abundant literature regarding the toxicity of free cholesterol and its role in the development of atherosclerosis [23–26]. Nevertheless, it should be noted that in the present study no differences in symptomatic lesions were observed in diabetics versus non diabetic subjects.

Qualitative analysis of glycerophospholipids and cholesterol esters failed to reveal significant differences in fatty acid distribution in PCs and PEs or in cholesterol esters between the two groups. In particular, our initial hypothesis of an alteration in the distribution of arachidonic acid in PCs and PEs was not confirmed. Some trends were observed including a higher SFA/MUFA ratio in cholesterol esters from diabetic plaque, but the difference was not significant after multiple-comparison correction.

Analysis of lysophosphatidylcholines provided the most interesting results. Intriguingly, chromatograms of each LPC species showed the presence of two distinct peaks (Fig. 1A and B) corresponding to the sn-1 or sn-2 isomers (Fig. 1C and D). While acyl chains isomerize spontaneously between the sn-1 and sn-2 positions in the plasma compartment [27], LPCs are more stable and their stereo specificity seems to be preserved in a hydrophobic environment such as that of atherosclerotic plaques [28]. We therefore decided to perform the lipidomic analysis by taking into account the total amount as well the relative amounts of sn-1 and sn-2 isomers for each LPC species. Strikingly, the proportion of 20:4LPC and more specifically of the sn-2 isomer was significantly greater in the lesions from diabetic patients and this remained statistically significant after multiple comparison correction. Moreover, amongst other lipid molecules, only 2-AA-LPC remained statistically associated with the risk of diabetes in multivariable analysis. Finally, a high proportion of 2-AA-LPC correlated negatively with glycemic control when taking into account the two groups of diabetic and non-diabetic patients.

Though 2-AA-LPC appears to be an interesting molecule to investigate, our observation raises questions related (1) to the mechanisms involved in the production and/or accumulation of this molecule and (2) to the functional consequences arising from these increased levels of 2-AA-LPC. Indeed, these high levels could be due to either a systemic increase in 2-AA-LPC levels or to local production within the atheroma plaque. The latter hypothesis seems the most likely since plasma lipoproteins from diabetic patients failed to show an increase in the proportion of 2-AA-LPC

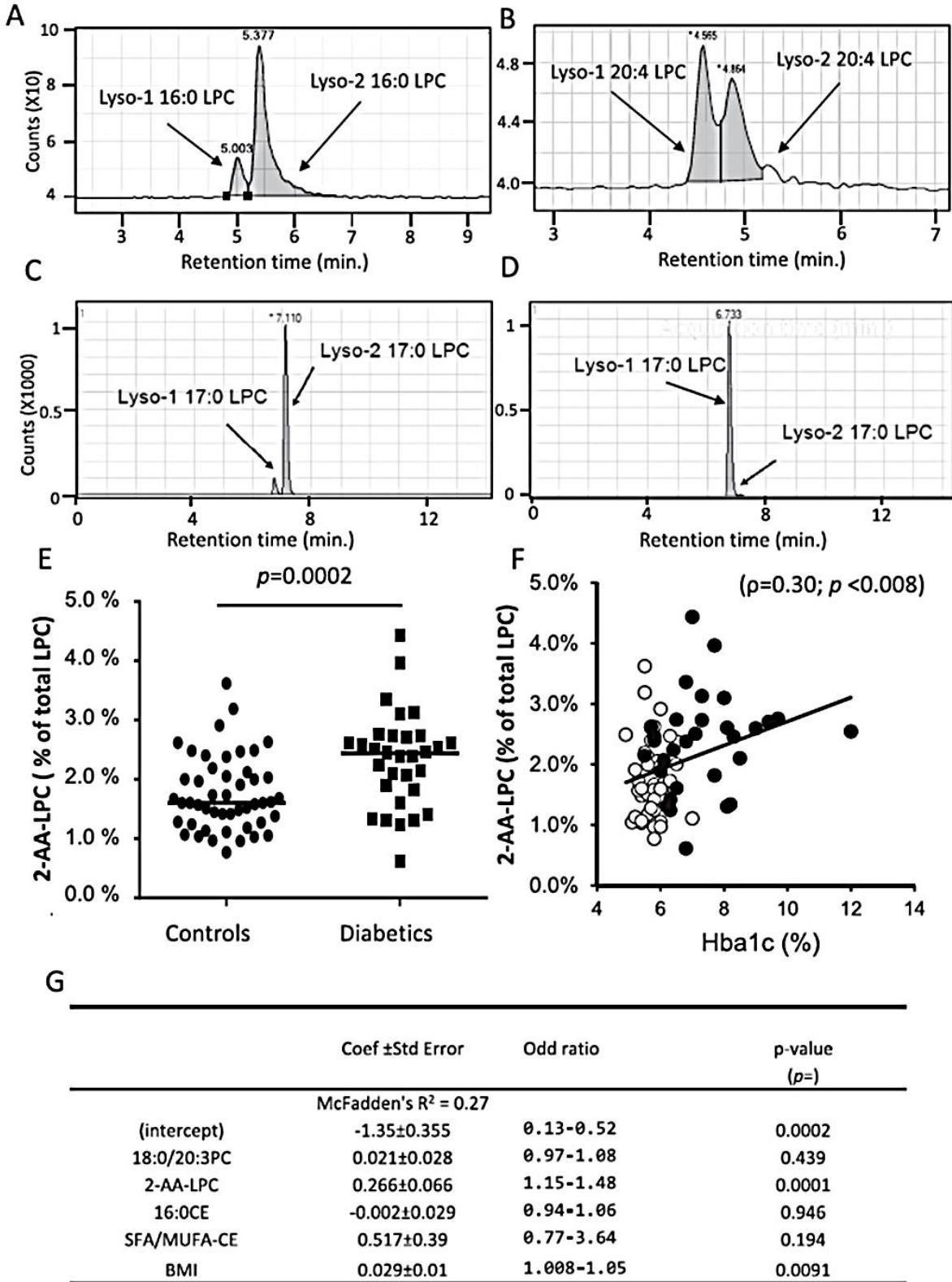


Fig. 1. Determination of 2-AA-LPC enrichment in carotid plaques. (A) and (B) Representative chromatography profiles of 16:0 LPC and 20:4 LPC obtained by LC-MS/MS from carotid plaques extracts. (C) and (D) di17:0-PC was incubated for 2 h at 37 °C with either 2 µl of Phospholipase A2 (PLA2 from *Apis mellifera*) (C) or Phospholipase A1 (*Thermomyces lanuginosus*) (D). Hydrolysis products were analyzed by LC-MS/MS as described in Materials and methods. (E) Proportion of 2-AA-LPC in carotid plaque samples from control and diabetic subjects. (F) Correlation between the proportion of 2-AA-LPC and glycated hemoglobin levels in control (white circles) and diabetic patients (black circles). ρ (Rho) and probability values were obtained by the Spearman rank test. (G) Multiple variate analysis of lipid and clinical parameters associated with diabetes.

[12,29]. Moreover, the increased molar ratio of 2-AA-LPC to C16:0/C20:4-PC in the plaques from diabetic patients supports an increased local production of 2-AA-LPC from diacyl-PCs. Our

finding implies therefore that one or several enzymes with phospholipase A1 activity are present and are upregulated in the lesions of diabetic patients. As compared with PLA2s, little is known about

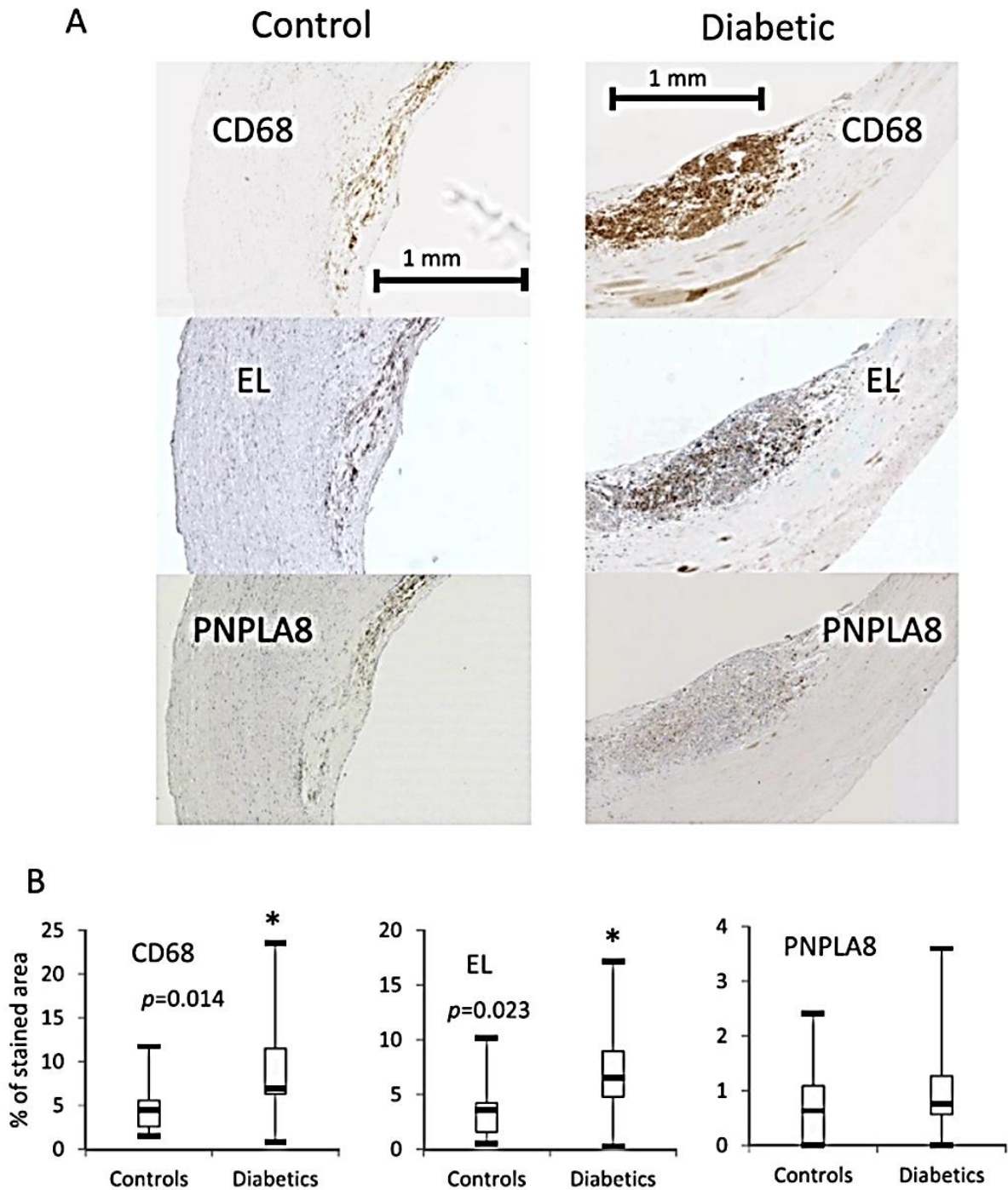


Fig. 2. Immunohistological analysis of the lesions. (A) Immunostaining for CD68, endothelial lipase (EL) and PNPLA8 in diabetic or nondiabetic plaques. These results are representative of 10 diabetic and 10 nondiabetic plaques. Similar areas of plaques are shown (B): % of positively stained area for CD68, EL and PNPLA8. * Statistically significant, Mann-Whitney Test.

the role of PLA1s in atherosclerosis, nevertheless several enzymes with PLA1 activity that could be relevant in this context have been described. The first candidate is endothelial lipase (EL), which is expressed by endothelial cells and macrophages and possesses mainly a PLA1 activity as well as a less active PLA2 activity [30,31]. EL is present in human atherosclerotic lesions as found here and in previous studies and is upregulated by inflammatory stimuli [32]. Moreover, systemic levels of EL are increased in type 2 diabetic subjects [33]. The second candidate is the calcium-independent PLA2 gamma (PNPLA8), which displays a highly selective PLA1 activity toward 1-palmitoyl-2-arachidonoyl- phosphatidylcholine

but is unable to cleave polyunsaturated fatty acids from the sn-2 position of diacyl phosphatidylcholine [34]. By using immunohistochemistry we show that the two enzymes are expressed in human carotid plaques suggesting that they could be involved in 2-AA-LPC production. Moreover, in a sample of 10 diabetic plaques and 10 non-diabetic plaques, we observed a significantly higher expression of EL in the plaques from diabetic subjects. This preliminary observation needs however to be confirmed in a larger cohort of subjects. Finally, the positive correlation between 2-AA-LPC and glycated hemoglobin levels suggests a link between the glycemic control and arachidonic acid metabolism in carotid

plaques. Interestingly, it has been shown that the receptor for advanced glycation products (RAGE) is present in carotid atheroma plaques from control and diabetic subjects [21]. Moreover, the same study suggested that RAGE plays a key role in the arachidonate-dependent inflammatory response in carotid plaques [21].

The higher proportion of 2-AA-LPC in diabetic atherosclerotic lesions is likely to have various functional consequences. Indeed, it has been shown that the fatty acyl composition of lyso-PC directly affects their pro-inflammatory properties, such as stimulation of COX2 expression or eicosanoid release [35–37]. Besides its own biological activities, 2-AA-LPC is also a fascinating molecule at the crossroads of several metabolic pathways that lead to the production of potent signaling molecules such as 2-arachidonoyl-glycerol, 2-arachidonoyl-lysophosphatidic acid (2-AA-LPA) and AA-derived pro-inflammatory eicosanoids. First, the deacylation of 2-AA-LPC by lysophospholipases is able to generate free arachidonic acid, which is a direct substrate for cyclo- and lipo-oxygenases during eicosanoid synthesis [38]. A second metabolic pathway involves the conversion of 2-AA-LPC by a lysophospholipase C into 2-arachidonoyl-glycerol, an endogenous cannabinoid [39]. Finally, hydrolysis of 2-AA-LPC by the lysophospholipase D/autotaxin pathway generates the active metabolite 2-AA-LPA [40]. Interestingly, 2-AA-LPA has been shown to be present in atheroma plaques and to contribute significantly to the platelet-activating effect of the lipid core of atherosclerotic lesions [41].

In conclusion, this study has demonstrated for the first time that of all LPCs, the proportion of 2-AA-LPC is particularly high in the carotid atheroma plaque of diabetic subjects. These results need to be confirmed in larger population and in other arterial territories. Moreover, the mechanisms leading to the accumulation of 2-AA-LPC within the plaque, and the functional consequences of this enrichment need to be characterized further. Finally, longitudinal studies to evaluate disease progression in these patients could be useful to determine whether increased plaque 2-AA-LPC and free cholesterol content are markers of poor prognosis especially in diabetic patients.

Conflict of interest

The authors declared that they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

Financial support

The study was supported by the Region Bourgogne and the University hospital of Dijon (CALISCA PROJECT) and by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021/LipSTIC Labex.

Acknowledgments

We thank Philip Bastable for manuscript editing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.004>.

References

- [1] K.E. Bornfeldt, I. Tabas, Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis, *Cell Metab.* 14 (2011) 575–585.
- [2] A.P. Burke, F.D. Kolodgie, A. Zieske, D.R. Fowler, D.K. Weber, P.J. Varghese, A. Farb, R. Virmani, Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 1266–1271.

- [3] P.R. Moreno, A.M. Murcia, I.F. Palacios, M.N. Leon, V.H. Bernardi, V. Fuster, J.T. Fallon, Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus, *Circulation* 102 (2000) 2180–2184.
- [4] K. Nasu, E. Tsuchikane, O. Katoh, H. Fujita, J.F. Surmely, M. Ehara, Y. Kinoshita, N. Tanaka, T. Matsubara, Y. Asakura, K. Asakura, M. Terashima, T. Suzuki, Plaque characterization by virtual histology intravascular ultrasound analysis in patients with type 2 diabetes, *Heart* 94 (2008) 429–433.
- [5] Y.J. Hong, M.H. Jeong, Y.H. Choi, J.S. Ko, M.G. Lee, W.Y. Kang, S.E. Lee, S.H. Kim, K.H. Park, D.S. Sim, N.S. Yoon, H.J. Yoon, K.H. Kim, H.W. Park, J.H. Kim, Y. Ahn, J.G. Cho, J.C. Park, J.C. Kang, Plaque characteristics in culprit lesions and inflammatory status in diabetic acute coronary syndrome patients, *JACC Cardiovasc. Imaging* 2 (2009) 339–349.
- [6] S. Mas, R. Martínez-Pinna, J.L. Martín-Ventura, R. Perez, D. Gomez-Garre, A. Ortiz, A. Fernandez-Cruz, F. Vivanco, J. Egido, Local non-esterified fatty acids correlate with inflammation in atheroma plaques of patients with type 2 diabetes, *Diabetes* 59 (2010) 1292–1301.
- [7] R. Natarajan, J.L. Nadler, Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 1542–1548.
- [8] S.A. Litherland, J.X. She, D. Schatz, K. Fuller, A.D. Hutson, R.H. Peng, Y. Li, K.M. Grebe, D.S. Whittaker, K. Bahjat, D. Hopkins, Q. Fang, P.D. Spies, K. North, C. Wasserfall, R. Cook, M.A. Dennis, S. Crockett, J. Sleasman, J. Kocher, A. Muir, J. Silverstein, M. Atkinson, M.J. Clare-Salzler, Aberrant monocyte prostaglandin synthase 2 (pgs2) expression in type 1 diabetes before and after disease onset, *Pediatr. Diabetes* 4 (2003) 10–18.
- [9] J.E. Kanter, F. Kramer, S. Barnhart, M.M. Averill, A. Vivekanandan-Giri, T. Vickery, L.O. Li, L. Becker, W. Yuan, A. Chait, K.R. Braun, S. Potter-Perigo, S. Sanda, T.N. Wight, S. Pennathur, C.N. Serhan, J.W. Heinecke, R.A. Coleman, K.E. Bornfeldt, Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-coa synthetase 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E715–E724.
- [10] H. Kuwata, M. Yoshimura, Y. Sasaki, E. Yoda, Y. Nakatani, I. Kudo, S. Hara, Role of long-chain acyl-coenzyme A synthetases in the regulation of arachidonic acid metabolism in interleukin 1beta-stimulated rat fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 44–53.
- [11] P. Koehrer, S. Saab, O. Berdeaux, R. Isaico, S. Gregoire, S. Cabaret, A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garcher, L. Breillon, N. Acar, Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy, *PLoS One* 9 (2014) e106912.
- [12] D. Denimal, J.P. Pais de Barros, J.M. Petit, B. Bouillet, B. Verges, L. Duvillard, Significant abnormalities of the hdl phosphosphingolipidome in type 1 diabetes despite normal hdl cholesterol concentration, *Atherosclerosis* 241 (2015) 752–760.
- [13] C.V. Felton, D. Crook, M.J. Davies, M.F. Oliver, Dietary polyunsaturated fatty acids and composition of human aortic plaques, *Lancet* 344 (1994) 1195–1196.
- [14] A. Osipenko, The fatty acid composition of blood plasma and arterial wall in atherosclerosis, *Int. J. Biomed.* 2 (2012) 291–295.
- [15] Z. Mallat, T. Nakamura, J. Ohan, G. Lesche, A. Tedgui, J. Maclof, R.C. Murphy, The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and f2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis, *J. Clin. Invest* 103 (1999) 421–427.
- [16] E.I. Waddington, K.D. Croft, K. Sienuarine, B. Latham, I.B. Puddey, Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates, *Atherosclerosis* 167 (2003) 111–120.
- [17] E. Waddington, K. Sienuarine, I. Puddey, K. Croft, Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 292 (2001) 234–244.
- [18] C. Gniwotta, J.D. Morrow, L.J. Roberts 2nd, H. Kuhn, Prostaglandin f2-like compounds, f2-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 3236–3241.
- [19] D. Pratico, L. Iuliano, A. Mauriello, L. Spagnoli, J.A. Lawson, J. Rokach, J. Maclof, F. Violi, G.A. FitzGerald, Localization of distinct f2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions, *J. Clin. Invest* 100 (1997) 2028–2034.
- [20] M.H. Shishebor, R. Zhang, H. Medina, M.L. Brennan, D.M. Brennan, S.G. Ellis, E.J. Topol, S.L. Hazen, Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 1678–1683.
- [21] F. Cipollone, A. Iezzi, M. Fazio, M. Zucchelli, B. Pini, C. Cucurullo, D. De Cesare, G. De Blasis, R. Muraro, R. Bei, F. Chiarelli, A.M. Schmidt, F. Cucurullo, A. Mezzetti, The receptor rage as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycaemic control, *Circulation* 108 (2003) 1070–1077.
- [22] Z. Chen, M. Ichetovkin, M. Kurtz, E. Zycband, D. Kawka, J. Woods, X. He, A.S. Plump, E. Hailman, Cholesterol in human atherosclerotic plaque is a marker for underlying disease state and plaque vulnerability, *Lipids Health Dis.* 9 (2010) 61.
- [23] J.H. Rapp, W.E. Connor, D.S. Lin, T. Inahara, J.M. Porter, Lipids of human atherosclerotic plaques and xanthomas: clues to the mechanism of plaque progression, *J. Lipid Res.* 24 (1983) 1329–1335.
- [24] I. Tabas, Free cholesterol-induced cytotoxicity: a possible contributing factor to

- macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions, *Trends Cardiovasc Med.* 7 (1997) 256–263.
- [25] L. Yvan-Charvet, C. Welch, T.A. Pagler, M. Ranalletta, M. Lamkanfi, S. Han, M. Ishibashi, R. Li, N. Wang, A.R. Tall, Increased inflammatory gene expression in abc transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions, *Circulation* 118 (2008) 1837–1847.
- [26] Y. Sun, M. Ishibashi, T. Seimon, M. Lee, S.M. Sharma, K.A. Fitzgerald, A.O. Samokhin, Y. Wang, S. Sayers, M. Aikawa, W.G. Jerome, M.C. Ostrowski, D. Bromme, P. Libby, I.A. Tabas, C.L. Welch, A.R. Tall, Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin k, *Circ. Res.* 104 (2009) 455–465.
- [27] M. Croset, N. Brossard, A. Polette, M. Lagarde, Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat, *Biochem. J.* 345 (1) (2000) 61–67.
- [28] M. Okudaira, A. Inoue, A. Shuto, K. Nakanaga, K. Kano, K. Makide, D. Saigusa, Y. Tomioka, J. Aoki, Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by lc-ms/ms, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 2178–2192.
- [29] M.N. Barber, S. Risis, C. Yang, P.J. Meikle, M. Staples, M.A. Febbraio, C.R. Bruce, Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes, *PLoS One* 7 (2012) e41456.
- [30] K. Hirata, H.L. Dichek, J.A. Cioffi, S.Y. Choi, N.J. Leeper, L. Quintana, G.S. Kronmal, A.D. Cooper, T. Quertermous, Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 14170–14175.
- [31] U.J. Jung, C. Torrejon, C.L. Chang, H. Hamai, T.S. Worgall, R.J. Deckelbaum, Fatty acids regulate endothelial lipase and inflammatory markers in macrophages and in mouse aorta: a role for ppargamma, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 2929–2937.
- [32] T. Yasuda, K. Hirata, T. Ishida, Y. Kojima, H. Tanaka, T. Okada, T. Quertermous, M. Yokoyama, Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes ldl uptake in macrophages, *J. Atheroscler. Thromb.* 14 (2007) 192–201.
- [33] S.W. Shiu, K.C. Tan, Y. Huang, Y. Wong, Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase, *Atherosclerosis* 198 (2008) 441–447.
- [34] W. Yan, C.M. Jenkins, X. Han, D.J. Mancuso, H.F. Sims, K. Yang, R.W. Gross, The highly selective production of 2-arachidonoyl lysophosphatidylcholine catalyzed by purified calcium-independent phospholipase a2gamma: identification of a novel enzymatic mediator for the generation of a key branch point intermediate in eicosanoid signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 26669–26679.
- [35] L. Brkic, M. Riederer, W.F. Graier, R. Malli, S. Frank, Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on cyclooxygenase (cox)-2 expression in endothelial cells, *Atherosclerosis* 224 (2012) 348–354.
- [36] S.P. Rao, M. Riederer, M. Lechleitner, M. Hermansson, G. Desoye, S. Hallstrom, W.F. Graier, S. Frank, Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelium-dependent vasorelaxation, *PLoS One* 8 (2013) e65155.
- [37] M. Riederer, P.J. Ojala, A. Hrzenjak, W.F. Graier, R. Malli, M. Tritscher, M. Hermansson, B. Watzler, H. Schweer, G. Desoye, A. Heinemann, S. Frank, Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelial prostacyclin production, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 2957–2966.
- [38] M.J. Pete, J.H. Exton, Purification of a lysophospholipase from bovine brain that selectively deacylates arachidonoyl-substituted lysophosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18114–18121.
- [39] V. DiMarzo, L. DePetrocellis, T. Sugiura, K. Waku, Potential biosynthetic connections between the two cannabinimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells, *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 227 (1996) 281–288.
- [40] J. Aoki, A. Inoue, S. Okudaira, Two pathways for lysophosphatidic acid production, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (2008) 513–518.
- [41] E. Rother, R. Brandl, D.L. Baker, P. Goyal, H. Gebhard, G. Tigyi, W. Siess, Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques, *Circulation* 108 (2003) 741–747.

Supplemental materials and Methods

Lipidomic analysis

Lipid standards (cholesterol, 16:0-CE, 17:0-CE, 18:0-CE, 18:1-CE, 18:2-CE, 20:4-CE, di14:0-PC, di14:0-PE, di14:0-PS, d18:1/17:0-SM, 14:0-LPE, 14:0-LPC) were obtained from Avanti Polar Lipids (Coger SAS, Paris, France). Stable isotope $^{13}\text{C}_2$ -cholesterol was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Euriso-top, Saint Aubin, France). LC-MS/MS quality grade solvents were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Other chemicals of the highest grade available were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Lipids were extracted from atherosclerotic plaque punch biopsies (2–10 mg) according to the method of Folch et al.

Cholesterol-esters quantitation by LCMS/MS

Folch organic phases corresponding to 1 mg of tissue were spiked with 10 μg of 17:0-CE and 2.5 μg of $^{13}\text{C}_2$ -cholesterol used as internal standards. After evaporation of the organic phase, sterols were extracted with 1 ml distilled water, 2 ml ethyl-acetate/hexane (25/75 v/v). Organic phase was collected and dried under vacuum. Free cholesterol was acetylated with 100 μl hexane and 30 μl of acetyl chloride for 2.5 hours at room temperature. Total steryl-esters were then extracted with 2 mL hexane and 1 mL distilled water and the organic phase was collected and evaporated under vacuum.

Lipids were finally dissolved with 75 μl of hexane and cholesteryl-esters were further analyzed by LC-MS/MS. Cholesteryl-esters were separated on a ZORBAX Eclipse Plus C8 column at a flow rate of 0.25 ml/min at 55°C with a linear gradient of methanol/water (90/10) containing 10 mM acetate ammonium and 1 mM acetic acid (A) and of isopropanol/methanol (90/10) containing 10 mM acetate ammonium and 1 mM acetic acid (B) as follows: 5% B for 1 min, up to 80% B in 15 min, up to 100% in 1 min, and 100% for 1 min. Acquisition was performed in positive selected reaction monitoring ion mode (SIM) (source temperature 200°C, nebulizer gas flow rate 10 L/min, sheath gas flow 11 L/min, temperature 200°C, capillary 3,500 V, nozzle 500 V, fragmentor 106 V, collision energy 20 V). Transitions from ammonium adduct [CE+NH₄] to cholesterol (m/z 369.3) or $^{13}\text{C}_2$ -cholesterol (m/z 371.3) were used for cholesteryl-esters quantitation. Calibration curves were obtained for each lipid class using authentic standards (cholesterol, 16:0-CE, 18:0-CE, 18:1-CE, 18:2-CE, 20:4-CE) extracted with the same method used for tissue samples.

Total Cholesterol quantitation by GC-MS :

Folch organic phases corresponding to 1 mg of tissue were evaporated to dryness under vacuum. Lipids were saponified for 45 min at 56°C with 60 µL of potassium hydroxide 10 mol/L and 1 mL of ethanol containing 4 µg of epicoprostanol used as internal standard. Sterols were extracted with 5 mL of hexane and 1 mL of water. After evaporation of the organic phase, sterols were derivatized with 100 µL of a mixture of bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/ trimethylchlorosilane 4/1 v/v for one hour at 80°C. After evaporation of the silylating reagent 100 µL of hexane were added. Trimethylsilylethers of sterols analysis was performed by GCMS in a 6890 gas chromatograph coupled with a 7673 Mass Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separation was achieved on a HP-5MS 30 m x 250 µm column (Agilent Technologies) using helium as carrier gas and the following GC conditions : injection at 250 °C using the split mode, oven temperature program : initial temperature 140 °C up to 280°C at a rate of 15°C/min, up to 300°C at a rate of 2°C/min. The MSD was set up as follow: EI at 70 eV mode, source temperature at 230°C. Data were acquired in SIM mode using 368.3 and 370.3 quantitation ions (m/z) for cholesterol and epicoprostanol respectively. A calibration curve was obtained with cholesterol standard using the same method used for samples.

Phospholipids quantitation by LC-MS/MS:

Lipids corresponding to 1 mg of tissue were spiked with a mix containing 1 µg of di14:0-PC, 1 µg of di14:0-PE, 1 µg of d18:1/17:0-SM and 0.1 µg of 14:0-LPC used as internal standards. Phospholipids were analyzed by LCMS/MS using a 6460 mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with an electrospray ionization source and MassHunter data system. The liquid chromatography was performed on a ZorBAX Eclipse SB-C18 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), maintained at 55°C with a flow-rate at 0.25 mL/min using the following gradient conditions: 1 min at 60% mobile phase A, 60% to 5% A over 15 min, 1 min at 5% A, a return to 60% A over 1 min then 5 min at 60% A prior to the next injection. Mobile phases A and B consisted of water:methanol and isopropanol:methanol in the ratios 60:40 and 90:10 (v/v) respectively, both containing 10 mM ammonium acetate and 1 mM acetic acid. Positive Electrospray Ionization Mass Spectrometry was performed on a quadrupole mass spectrometer (QQQ 6460; Agilent Technologies). Specific individual lipid species were identified using scheduled multiple-reaction monitoring

(MRM) (source temperature 325°C, nebulizer gas flow rate 10 L/min, sheath gas flow 10 L/min, temperature 400°C, capillary 3,500 V, nozzle 1,000 V). The transitions used were as follows: $[M + 1]^+ \rightarrow 184.1$ (fragmentor 160 V, collision energy 20 V) and $[M + 1]^+ \rightarrow [M - 140]$ (fragmentor 120 V, collision energy 17 V) for phosphatidylcholines (PCs) and phosphatidylethanolamines (PEs). The concentrations of phospholipid and sphingolipid species were calculated by relating the peak area of each species to the peak area of the corresponding internal standard. Total lipids of each class were calculated by summing the individual lipid species.

III. Résultats et discussion

L'objectif de ce travail était de comparer le contenu en espèces lipidiques riches en acides gras polyinsaturés entre des plaques d'athérome carotidien de 31 sujets diabétiques et de 48 sujets non-diabétiques. L'analyse qualitative des glycérophospholipides contenus dans les plaques d'athérome ne révèle aucune différence significative dans la distribution en acides gras des phosphatidylcholines (PC), phosphatidyléthanolamines (PE) et esters de cholestérol entre les deux populations. A l'inverse, l'analyse des lysophosphatidylcholines (LPC) révèle des différences entre diabétiques et non-diabétiques. Les différentes espèces de LPC sont caractérisées par la nature de l'acide gras estérifié sur l'une des fonctions alcool du glycérophosphate. De plus, chaque LPC existe sous la forme de deux isomères selon que l'acide gras est estérifié en position *sn*-1 ou *sn*-2. Chaque espèce de LPC sort donc sous la forme de deux pics lors de la séparation chromatographique. Il est traditionnellement admis que les *sn*-1-LPC sont majoritaires du fait de la présence abondante dans l'organisme de différents types de PLA2. Les PLA2 sont des enzymes capables d'hydrolyser l'ester d'acide gras en position *sn*-2 formant ainsi des *sn*-1-LPC²²⁴. A l'inverse, les PLA1 génèrent des *sn*-2-LPC. En réalisant des expériences d'hydrolyses spécifiques de di17:0 PC par une PLA1 ou une PLA2, nous avons pu déterminer que le pic avec le temps de rétention le plus court correspond au *sn*-2-LPC. Etonnamment, l'analyse des extraits lipidiques des plaques d'athérome révèle un enrichissement significatif des plaques de sujets diabétiques en 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine (2-AA-LPC) par rapport aux sujets contrôle. Non seulement la proportion de toutes les autres espèces de LPC ne diffère pas entre les deux groupes, mais le 2-AA-LPC est la seule espèce pour laquelle il existe une prédominance de l'isomère *sn*-2-LPC. Cette différence reste significative après correction par un facteur de risque de 5% pour tenir compte de la multiplicité des variables comparées. Afin de tester une éventuelle association entre différents paramètres cliniques, biologiques et lipidiques entre les deux groupes, nous avons établi un modèle de régression logistique multivarié. Les résultats révèlent que seuls l'IMC et les taux de 2-AA-LPC intra plaques sont significativement et positivement associés avec le risque de développer un diabète.

Le 2-AA-LPC étant la seule espèce lipidique différentiellement exprimée entre les plaques de sujets diabétiques et de sujets non-diabétiques, nous avons donc cherché à identifier les mécanismes impliqués dans sa production. Il semble peu probable que l'accumulation de 2-AA-LPC soit due à une augmentation de ses taux systémiques puisqu'au

cours d'études réalisant l'analyse de la composition lipidique des lipoprotéines plasmatiques de patients diabétiques, il n'a pas été mis en évidence un enrichissement en 2-AA-LPC ^{221,225}. A l'inverse, la mise en évidence d'une élévation du ratio 2-AA-LPC sur C16:0/20:4 PC dans nos échantillons de plaques d'athérome de patients diabétiques par rapport aux patients non-diabétiques, suggère une production locale de 2-AA-LPC à partir de di-acyl-PCs contenant de l'AA. Il a été décrit que les migrations intramoléculaires des acyl-gras des LPC, essentiellement de la position *sn*-1 à *sn*-2, par des réactions d'isomérisation non enzymatiques spontanées, sont fortement atténuées dans un environnement hydrophobe ²²⁶⁻²²⁸. Nos résultats supposent donc que le 2-AA-LPC provient d'une hydrolyse des PCs en position *sn*-1 par des enzymes ayant une activité PLA1 et particulièrement exprimées dans les plaques d'athérome de sujets diabétiques. Nous avons donc comparé le marquage immunohistochimique de deux enzymes à activité PLA1, la PLA2 calcium indépendante gamma (PNPLA8) et l'endothéliale lipase (EL), entre dix plaques de patients diabétiques et dix plaques de patients non-diabétiques. Les deux enzymes ont été détectées dans les échantillons et sont colocalisées avec le marqueur macrophagique CD68. Si l'immunomarquage pour l'EL est plus prononcé que pour la PNPLA8, il s'avère également qu'il est significativement plus important dans les plaques de diabétiques que de non-diabétiques. Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux qui ont pu décrire une élévation systémique de l'EL chez des sujets diabétiques de type 2 ²²⁹.

Le diabète étant caractérisé par un mauvais contrôle glycémique et par un état inflammatoire chronique, nous avons voulu voir s'il existait une éventuelle corrélation entre les taux de 2-AA-LPC intra-plaques et les taux d'HbA1c ou les taux de CRP plasmatiques. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les taux de CRP et les taux de 2-AA-LPC. Néanmoins, nous n'avons retrouvé aucune différence entre les taux de CRP des deux populations, ce qui peut en partie s'expliquer par le fait que la grande majorité des patients de l'étude était traitée par statines. En revanche, nous avons observé une corrélation positive entre l'enrichissement des plaques en 2-AA-LPC et le taux d'HbA1c des patients de l'étude. Ceci laisse supposer qu'il existe un lien entre métabolisme de l'acide arachidonique et contrôle glycémique, lien précédemment mis en évidence par une étude qui décrit la présence de récepteurs RAGE dans des plaques d'athérome et leur implication dans le métabolisme de l'acide arachidonique par COX2 ²¹⁸. Toutefois, nous ne retrouvons pas cette corrélation entre taux d'HbA1c et 2-AA-LPC lorsque les deux populations sont considérées séparément.

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que les plaques d'athérome de sujets diabétiques sont significativement enrichies en 2-AA-LPC, un dérivé actif de l'acide arachidonique ²³⁰. Le 2-AA-LPC est une molécule qui se situe au carrefour de différentes voies métaboliques qui conduisent à la formation de médiateurs lipidiques ayant des activités biologiques spécifiques : les eicosanoïdes, l'acide lysophosphatidique et le 2-arachidonoyl-glycérol. Ainsi, la déacylation du 2-AA-LPC par des lysophospholipases est capable de générer de l'acide arachidonique libre qui est un substrat direct pour les cycloxygénases pouvant conduire à la synthèse de dérivés tels que la PGE₂ ou le TXA₂ ²³¹. Une autre voie possible implique la conversion du 2-AA-LPC par une lysophospholipase C en 2-arachidonoyl-glycérol, un endocannabinoïde ²³². Enfin l'hydrolyse du 2-AA-LPC par l'autotaxine, ou lysophospholipase D, peut générer de l'acide 2-arachidonoyl-lysophosphatidique (2-AA-LPA) ²³³. De manière intéressante, il a été montré que le 2-AA-LPA est présent au niveau des plaques d'athérome et qu'il pourrait contribuer de manière très significative à la formation du thrombus lors d'une rupture de plaque ²³⁴.

En conclusion, notre étude met en évidence un enrichissement significatif des plaques d'athérome carotidien de sujets diabétiques en 2-AA-LPC. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur un plus grand nombre d'échantillons et étendus à d'autres territoires vasculaires. Ceci permettrait de mieux caractériser les mécanismes de production du 2-AA-LPC, locaux ou systémiques, et surtout de mieux comprendre les propriétés biologiques de ce métabolite ou de ses dérivés. Ces éléments permettraient de mieux appréhender les processus pro-inflammatoires qui sous-tendent la physiopathologie de l'athérosclérose au cours du diabète.

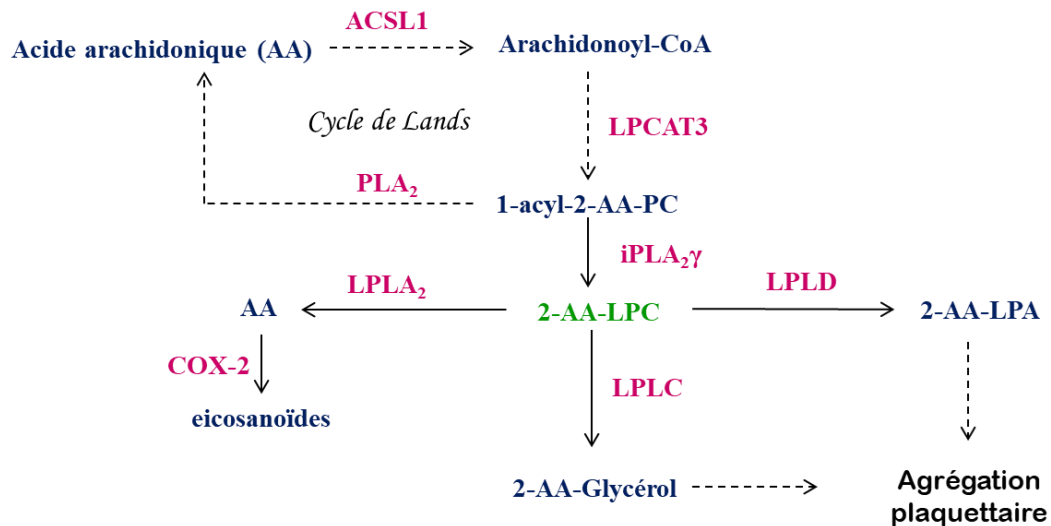


Figure 16 : Voies de biosynthèse du 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine et de ses métabolites

AA: acide arachidonique; 1-acyl-2-AA-PC: 1-acyl-2-arachidonoyl-phosphatidylcholine; 2-AA-LPC: 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine; 2-AA-glycérol: 2-arachidonoyl-glycérol; 2-AA-LPA: acide 2-arachidonoyl-lysophosphatidique; ACSL1: acyl-CoA synthase 1; PLA2: phospholipase A2; COX2: cyclooxygénase 2; LPCAT3: lysophosphatidylacyltransférase 3; LPLD: lysophospholipase D; LPLA2: lysophospholipase A2; LPLC: lysophospholipase C

DEUXIEME ARTICLE

I. Introduction

Les plaques d'athérome sont des foyers inflammatoires importants et le siège d'une sécrétion de nombreuses cytokines. Parmi elles, IL-1 β joue un rôle central dans le développement des lésions athérosclérotiques puisqu'elle favorise l'activation des cellules endothéliales et des macrophages, amplifie le recrutement leucocytaire à la lésion et favorise la migration des VSMCs et le remaniement vasculaire. La production d'IL-1 β résulte du clivage de la pro-IL-1 β par la capsase-1 et est particulièrement active au sein des plaques d'athérome puisque les cristaux de cholestérol qu'elles contiennent activent massivement l'inflammasome NLRP3, lequel supporte l'activité de la caspase-1. C'est donc tout naturellement qu'IL-1 β s'est imposée comme une cible potentielle de nouvelles thérapies pour lutter contre l'athérosclérose. Parmi elles, le canakinumab, anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 dirigé contre IL-1 β , a montré des effets prometteurs lors de l'étude CANTOS en réduisant de 15% le risque de récurrence d'infarctus du myocarde, d'apparition d'AVC ou de décès des suites d'un événement cardiovasculaire ¹²³. L'inflammation est donc au cœur du phénomène athéromateux.

Le récepteur LXR est connu pour réguler l'homéostasie du cholestérol notamment en favorisant l'efflux de cholestérol intra-cellulaire par le transporteur ABCA1. Une accumulation de cholestérol est en effet toxique pour la cellule puisqu'elle favorise la formation de cristaux de cholestérol et de cholestérol oxydé qui entretiennent l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production cytokinique. En modulant ainsi la balance du cholestérol, le récepteur LXR contribue donc indirectement à atténuer la réponse inflammatoire au cours de l'athérosclérose. Mais plusieurs études ont à présent démontré que le récepteur LXR est également directement impliqué dans la réponse inflammatoire des cellules. Néanmoins, ces travaux divergent quant aux effets de LXR, anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires, effets qui semblent être fortement dépendants de l'espèce. Deux mécanismes aux effets anti-inflammatoires ont ainsi pu être décrits chez la souris : i) la sumoylation et la répression active des gènes de l'inflammation ^{132,133} et ii) la déplétion des membranes en cholestérol et la répression de la voie des TLRs ²⁰⁷. A l'inverse, une étude conduite chez l'Homme rapporte que les agonistes LXR potentialisent la réponse des

macrophages au LPS via une induction du récepteur TLR4 et une amplification de la voie NF- κ B²¹⁰. Le site de liaison de LXR, LXRE, a en effet été mis en évidence au niveau du promoteur du gène *TLR4* chez l'Homme mais demeure absent du promoteur *Tlr4* chez la souris.

L'objectif de ce travail est donc de mieux caractériser la réponse inflammatoire des macrophages lors d'une stimulation des récepteurs LXR et l'effet d'un tel traitement sur l'activation de la voie des TLRs. Nous espérons ainsi mieux caractériser les mécanismes moléculaires qui relie LXR et inflammation et qui pourraient alors expliquer les différences observées entre macrophages humains et murins.

II. A Liver X-Receptor- Hypoxia inducible factor 1 α interplay potentiates interleukine 1 β production in human macrophages.

A Liver X-Receptor-Hypoxia inducible factor 1 α interplay potentiates interleukin-1 β production in human macrophages.

Louise Ménégaud^{1,2}, Charles Thomas¹, Antoine Jalil¹, Jean Baptiste Julla³, Charlène Magnani¹, Adam Ceroi⁴, Louise Basmaciyan⁵, Wilfried Le Goff⁶, Mano Joseph Mathew³, Cédric Rébé^{1, 7}, Aline Laubriet⁸, Valentin Crespy⁸, Jean-Paul Pais de Barros^{1, 9}, Eric Steinmetz⁸, Nicolas Venteclef³, Philippe Saas⁴, Laurent Lagrost¹ and David Masson^{1,2}

1 Univ. Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR12131, F-21000 Dijon, France ; INSERM, LNC UMR 1231, F-21000 Dijon, France ; FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, F-21000 Dijon, France.

2 CHU Dijon, laboratory of clinical chemistry, F-21000 Dijon, France.

3 INSERM, Cordeliers Research Centre, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France.

4 Univ. Bourgogne Franche-Comté, EFS Bourgogne Franche-Comté, INSERM, UMR1098, Besançon, France. FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, Besançon, France

5 CHU Dijon, laboratory of clinical microbiology, F-21000 Dijon, France.

6 Inserm, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), UMR_S1166, Hôpital de la Pitié, Sorbonne Université, Paris, France.

7 Cancer Biology Research Platform, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France.

8 Department of cardiovascular surgery ; CHU Dijon, F-21000 Dijon, France.

9 Lipidomic analytic plate-forme, UBFC, Batiment B3, Bvd Maréchal de Lattre de Tassigny, 21000 Dijon

Short title: LXR regulates IL-1 β

Correspondence: David Masson (INSERM UMR1231), 7 bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon cedex, France. Tel: +33 3 80 39 32 64; Fax: +33 3 80 39 34 47; e-mail: David.masson@chu-dijon.fr ;

Total word count: 6649

Abstract :

Aims: Low-grade inflammation is constitutive of all stages of atherosclerosis and anti-inflammatory therapy inhibiting interleukin-1 β (IL-1 β) significantly reduces the rate of recurrent cardiovascular events. While cholesterol accumulation in atheroma plaque and macrophages is a major driver of the inflammatory process, the role of the cellular cholesterol sensors Liver X receptors (LXRs) in the regulation of IL-1 β production in human macrophages remains to be clarified.

Methods and Results: Murine and human macrophages were treated with LXR agonists for 48h before Toll-Like Receptor (TLR) stimulation. Unexpectedly, we observed that, among other cytokines, LXR agonists selectively increase *IL1 β* mRNA levels independently of TLR activation. This effect, restricted to human macrophages, was mediated by the activation of HIF1 α by LXRs. Accordingly LXR agonists also potentiated other HIF1 α -dependent pathways such as glycolysis. Moreover, activation of LXR coupled with the induction of TLR2 by Pam3CSK4 and ATP-mediated activation of inflammasome resulted in an increased secretion of mature IL-1 β by macrophages. Treatment of human macrophages with extracts from carotid plaque samples led to a marked induction of *IL1 β* gene expression in an LXR-dependent manner. Finally, we showed that IL-1 β colocalizes with HIF1 α and LXR α in macrophage-infiltrated regions of atheroma plaques from human carotid arteries.

Conclusion/perspectives: This work shed lights on a LXR-regulated pathway involved in the production of interleukin 1 β by human macrophages. Thus, our work discloses a novel mechanism by which cholesterol and oxysterols trigger inflammation in atherosclerosis. This brings up new perspectives to target IL-1 β production in atherosclerotic patients.

Key words: Liver X receptors, Interleukin 1 beta, Hypoxia inducible factor 1 alpha, macrophages

Introduction:

Low-grade inflammation is constitutive of all stages of atherosclerosis. While cholesterol lowering drugs such as statins or PCSK9 inhibitors reduce the cardiovascular morbidity and mortality, strategies aiming to inhibit inflammatory cytokines such as interleukin 1 beta (IL-1 β) may provide additional benefits and open a new era in the field of cardiovascular diseases (CVD).^{235 236} Although the origins of inflammation in atherosclerosis are multiple, cholesterol accumulation in atheroma plaque and macrophages appears to play a prominent role in the inflammatory process.²³⁷ For instance, cholesterol carriers such as oxidized low density lipoproteins (oxLDLs) stimulate toll like receptors (TLRs) signaling pathways while cholesterol crystals activate inflammasome and subsequent release of IL-1 β from macrophages.^{238 239} Liver X receptors (LXRs) represent an essential link between cholesterol accumulation and inflammatory response in macrophages.²⁴⁰ These nuclear receptors are activated by cholesterol derivatives such as oxysterols and desmosterol, compounds that accumulate in cells after cholesterol loading.^{241 242} In turn, LXRs activate genes that limit cholesterol accumulation by stimulating cholesterol efflux and inhibiting cholesterol uptake. Interestingly, LXRs also modulate the inflammatory response of macrophages by several distinct mechanisms. First, it was shown that LXRs suppress the expression of NF- κ B and AP-1 responsive genes by a trans-repression mechanism common to other nuclear receptors such as PPARs and involving a ligand-dependent sumoylation.^{243 244} A recent study also suggested that the anti-inflammatory activity of LXRs is related to their ability to inhibit TLR/Myd88 signaling through ABCA1-dependent cholesterol depletion of lipid rafts.²⁴⁵ While the anti-inflammatory effects of LXRs have been mainly demonstrated in mice, the paradigm in human macrophages is more complex. Indeed, the lipopolysaccharide (LPS) receptor TLR4 is a LXR target in human but not in murine macrophages.²⁴⁶ As a consequence, while the anti-inflammatory potential of LXRs can be preserved to some extent in human macrophages²⁴¹, long term exposure of human macrophages to LXR agonists leads to a potentiation of the LPS response.²⁴⁶ Beyond TLR4, the modulation of other inflammatory pathways by LXRs in human macrophages remains to be explored. Particularly, TLR2 is endowed with a predominant role in triggering inflammation in the atheroma plaque.²⁴⁷

Therefore, we aimed to investigate the impact of LXRs on the inflammatory response of human and murine primary macrophages stimulated by TLR4 and TLR2 agonists with a specific emphasis on IL-1 β expression in the context of human atherosclerosis.

Materials and Methods

Reagents

Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) was purchased from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). GW3965, FM19G11, diméthylsulfoxyde, adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, lipopolysaccharide (*E.coli* 055:B5) and GSK2033 were purchased from Sigma-Aldrich laboratories (St Louis, MO, USA). T0901317 was obtained from Cayman chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Pam3CSK4 was purchased from InvivoGen (San Diego, California, USA). Atheroma plaque samples were obtained from patients undergoing carotid endarterectomy at the Department of Cardiovascular Surgery at the University Hospital of Dijon (Burgundy, France) (MASCADI STUDY NCT03202823). All patients provided an informed consent and the study was approved by the local ethic committee.

Cell Culture

Human Peripheral-blood Monocytes were obtained from healthy donors with informed consent, provide in accordance with the Declaration of Helsinki by the Etablissement Français du Sang (Besançon, France). Mononuclear cells were isolated by Ficoll gradient centrifugation and monocyte negative selection was performed via magnetic activated cell sorting using the Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions as previously described.²⁴⁸ WT mice on pure C57Bl6J background were used for the study. Bone marrow cells were isolated from tibias and femurs. All of the experimental procedures were conducted in accordance with the local guidelines for animal experimentation. Protocol no. 2017010214489525_v2#8381 was approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Burgundy. Human or murine monocytes were differentiated into macrophages for 6 days with 100ng/mL of M-CSF into RPMI medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) in 5% CO₂ and 37°C. On day 6, macrophages were treated with or without 1µM of synthetic LXR agonist GW3965 for 48 hours and then with or without 100 ng/ml of TLR2 agonist Pam3CSK4 or 100 ng/ml of LPS for 4 hours.

For transfection experiment, on day 6, macrophages were transfected with negative siRNAs (Ambion, Invitrogen) or siRNA for *NR1H3* (Ambion, Invitrogen) (ID: s19568) or siRNA for *HIF1A* (Ambion, Invitrogen) (ID: s6541) using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. During

transfection cells were treated with or without 1 μ M of synthetic LXR agonist GW3965 for 48 hours and then with or without 100 ng/ml of TLR2 agonist Pam3CSK4 or 100 ng/ml LPS.

For plaque extracts used in cells treatment lipid rich cores of plaque samples were carefully dissected under aseptic conditions and were homogenized with 3 volumes of cold NaCl 150 mmol/L and briefly sonicated. Macrophages were treated with whole homogenate (1% v/v in cell culture medium) for 48 hours with or without 1 μ M GSK2033.

Real time PCR Analysis:

Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. 100 ng of total RNA was reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase, random primers and RNaseOUT inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). cDNA obtained were quantified by real time PCR using SYBR Green RT-PCR Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and using a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA). $\Delta\Delta$ Ct method was used to determine the relative mRNA levels of each gene and Ct were normalized using Cyclophilin A mRNA levels for human and GAPDH mRNA levels for mouse. Sequences of the different primers used are available upon request.

Western Blotting:

Total cellular protein extract were prepared with RIPA buffer and protease inhibitor cocktails as previously described.²⁴⁸ Protein lysates were separated by Sodium Dodecyl Sulfate gel electrophoresis (SDS PAGE) and transferred to nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH). After incubation for 2 hours at RT with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS)-0.1% Tween 20, membranes were incubated overnight with the primary antibody Human IL-1 beta (AF201SP, IgG goat polyclonal, RD Systems, Minneapolis, USA) 1/500 diluted in 1% BSA-TBS-Tween, washed, incubated with the secondary antibody HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins (Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min. at RT, and washed again before analysis with luminol reagent Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Seahorse XFe96 Glycolysis Analysis:

Proton exchange rate (PER) in macrophages were measured at 37 °C using the Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyser instrument (Agilent, Santa Clara, CA) and the XF Glycolytic Rate Assay Kit (Agilent Part number 103344-100). Briefly, after treatment with or without 1µM synthetic LXR agonist GW3965 for 48 hours, cells were seeded in a 24-well culture plate XFe96 FluxPak at a density of 30,000 cells per well for 24 h in the same medium and treated or not with 100 ng/ml TLR2 agonist Pam3CSK4 for 4 hours. Cells were then changed to XF DMEM Base Medium without Phenol Red (Agilent Part number 103335-100) supplement with 5 mMHEPES, 10 mM glucose,1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, pH 7.4 at 37°C. After cells incubated for 1 h at 37 °C in a non-CO2 incubator, respiration and acidification of the medium was measured before and after the injection of two compounds: 0.5 µM rotenone + 0.5 µM antimycin A (first injection) and 50 mM 2-deoxy-D-glucose (second injection). Experiments were performed in real time in eight replicate wells for each cell line. PER, OCR and ECAR were automatically calculated by the Seahorse XFe96 software.

Biochemical Analysis

Total HIF-1 α concentrations were determined by a commercially available ELISA Kit (Human/Mouse Total HIF-1 α , DYC1935-2, RD Systems, Minneapolis, USA) in accordance with the manufacturers' protocols. Cytokine medium levels were measured by BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit according to the manufacturer's protocols, and using a Flow Cytometer FACSCanto-123 apparatus (BD Biosciences, New Jersey, USA), and by commercially available ELISA Kit for IL-1 β (Human IL-1 beta ELISA Kit, RAB0273-1KT, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO,USA).

Immunohistological analysis of carotid plaques

The plaque samples were fixed in neutral buffered formalin, dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene and embedded in paraffin. Slices of 5 µm thick were deposited on slide to achieve a hematoxylin–eosin staining and immunohistochemical analysis. Automated immunohistochemistry (Leica BondMax) was performed using standard procedures on serial sections of plaques. The following antibodies were used: LXR α /NR1H3 antibody (OTI1A5)

(NBP2-46220, mouse monoclonal, 1/200 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-HIF-1 alpha (EP1215Y) (ab51608 rabbit monoclonal 1/100) (Abcam, Cambridge, RU), CD68 (14-0688-82, mouse monoclonal, 1/200) (Invitrogen, Carlsbad, USA), anti-human IL-1 β azide free (Clone B-A15) (855.010.005, mouse monoclonal IgG1, 1/50) (Diacclone, Besançon, France).

Immunofluorescence imaging

Characterization and localization of HIF-1 α protein in macrophages were further verified by immunofluorescence imaging. Briefly, the macrophages growing in Labtech culture chamber were washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (4°C, 30min). After fixation cells were permeabilized 10 min using 0.2% Triton X-100 in PBS, washed in PBS and then blocked for 1 hour in 20% of PBS-Foetal Bovin Serum (FBS) (Gibco, Fisher Scientific, New Hampshire, USA). Immunolabellings were then processed. For human HIF-1 α staining, a mouse monoclonal anti- HIF-1 α antibody (clone 54-HIF-1 α , BD Biosciences, New Jersey, USA) (1:500 in 20% of PBS-FBS) was added, for murine HIF-1 α staining a rabbit polyclonal anti-HIF-1 α antibody (NB100-134SS, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) was added, and cells were incubated 1h at room temperature. After washing three time with 20% of PBS-FBS, macrophages were incubated for 45 min in the dark with an Alexa-Fluor 568 goat anti-mouse IgG1 antibody (Life Technologies, Saint Aubin, France) (1:500 in 20% of PBS-FBS) or goat anti-rabbit IgG1 antibody (Life Technologies, Saint Aubin, France) (1:500 in 20% of PBS-FBS) and wash three time with 20% of PBS-FBS. Cells were then incubated in the dark overnight at 4°C with a combination of Alexa-Fluor 488 Phalloidin (Life Technologies, Saint Aubin, France) (1:500 in 20% of PBS-FBS) to stain F-actin and 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies, Saint Aubin, France) (1 μ g/ml in 20% of PBS-FBS) to stain nuclei. Cells were finally washed three time in PBS and one time in dH₂O and mounted using ProLong® Gold antifade reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France). Slides were examined with a BX51 epifluorescence microscope (Olympus) coupled with the 'CellF' software and using the objective 'UPlanFL 60 \times /1.25 oil'. All captured images were exported to ImageJ for figure assembly.

Microarray Procedures

RNA Amplification and Labeling:

Human total RNA was isolated with the use of Trizol (Sigma-Aldrich). Sample labeling was performed as detailed in the “One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol (version 5.5, part number G4140-90040). Briefly, 1 µg of each total RNA samples was used for the amplification and labeling step using the Agilent Low RNA Input Linear Amp Kit (Agilent Technologies) in the presence of cyanine 3-CTP (Perkin Elmer). Yields of cRNA and the dye incorporation rate were measured with the ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Hybridization of Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays:

The hybridization procedure was performed according to the the “One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol (version 5.5, part number G4140-90040) using the Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies). Briefly, 1.65 µg Cy3-labeled fragmented cRNA in hybridization buffer was hybridized overnight (17 hours, 65 °C) to Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 4x44K using Agilent’s recommended hybridization chamber and oven. Following hybridization, the microarrays were washed once with 6x SSPE buffer containing 0.005% N lauroylsarcosine for 1 min at room temperature followed by a second wash with preheated 0.06x SSPE buffer (37 °C) containing 0.005% Nlauroylsarcosine for 1 min. The last washing step was performed with acetonitrile for 30 sec.

Scanning and data analysis: Fluorescence signals of the hybridized Agilent Microarrays were detected using Agilent’s Microarray Scanner System (Agilent Technologies). The Agilent Feature Extraction Software (FES) was used to read out and process the microarray image files. For determination of differential gene expression FES derived output data files were further analyzed using the Rosetta Resolver gene expression data analysis system (Rosetta Biosoftware). The data discussed in this

publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE13407

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE13407>).

ChIP sample preparation.

Human primary macrophages were crosslinked with 1% formaldehyde in PBS for 10 min. The reaction was stopped with glycine at a final concentration of 0.125 M for 5 min. Approximately, $10\text{--}20 \times 10^6$ cells were used for HIF-1 alpha and H3ac. Cells were spun down and rinsed with cold PBS two times. Nuclei were isolated using lysis buffer 1 (PIPES 500mL, KCL 80mM and IGEPAL 1%) and lysis buffer 2 (SDS 0.1%, EDTA 10mM, pH 8.1, and TrisHCL 50mM, pH 8.1), and subsequently sonicated over 45 min (30 s ON/OFF) in the Bioruptor Plus (Diagenode), to generate DNA-fragment sizes of 0.2–0.5 kb. Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG or Sheep anti-Mouse IgG were incubated O/N with the antibodies. Each lysate was immunoprecipitated with the following antibodies: anti-HIF-1 alpha (Novusbio NB100-105, 5 μ g), and anti-H3ac (Active Motif 61637, 10 μ g). After several washings, the beads were incubated with the sonicated chromatin O/N. On the next day, the samples were washed with RIPA buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 200 mM NaCl, 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.7% Na-deoxycholate) six times, once with TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl), and the immune-bound chromatin was eluted in the elution buffer (SDS 0.1%, NaHCO₃ 100mM, Tris-HCL 20Mm, EDTA 5mM, NaCl 50mM). The samples remained at 65 °C O/N to reverse the formaldehyde crosslinking. After RNase A (ThermoFisher) and proteinase K (ThermoFisher) treatments, the immunoprecipitated DNA was purified using the ChIP DNA Clean & Concentrator Capped Zymo-Spin I (Zymo Research) purification kit. RT-qPCR was performed using the QuantStudio 3 Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific). qPCR on ChIP input were used for normalization of each sample result. Primers used for the ChIP-PCR are the followings: Human IL1B HRE : reverse : ATCGTTGTGCAGTTGATGTCCA and forward : TGTGTGTCTTCCACTTTGTCCCA

RNA sequencing analysis.

Macrophages from 3 donors each exposed to 3 distinct plaque homogenates with or without GSK2033 were used for RNA sequencing. Total RNA were prepared by using Qiagen RNA easy kits. mRNA purification from total RNA and library preparation were performed with the NEBNext Ultra RNA Library Preparation Kit with poly-A selection according to the manufacturer protocols. Libraries were sequenced with 2x150bp paired-end reads on an Illumina HiSeq. Sequence reads were trimmed to remove possible adapter sequences and nucleotides with poor quality using Trimmomatic v.0.36. The trimmed reads

were mapped to the Homo sapiens GRCh38 reference genome using the STAR aligner v.2.5.2b. Unique gene hit counts were calculated by using featureCounts from the Subread package v.1.5.2. Only unique reads that fell within exon regions were counted. After extraction, the gene hit counts table was used for downstream differential expression analysis. Using DESeq2, a comparison of gene expression between the groups of samples was performed. The Wald test was used to generate p-values and log₂ fold changes. Genes with an adjusted p-value < 0.05 and absolute log₂ fold change > 1 were called as differentially expressed genes for each comparison. Correction for multiple comparison was performed using the Benjamini-Hochberg Procedure with an FDR at 5%. Significantly enriched gene ontology terms were calculated by using differentially expressed genes by using Metascape (www.metascape.org)²⁴⁹ and DAVID²⁵⁰. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus.

Sterol quantitation by GCMS:

Total lipids were extracted according to the method of Folch et al.²⁵¹ Lipid standards (25-OH-cholesterol-d₆; 27-OH-cholesterol-d₆; 7- α -OH-cholesterol-d₇; 7- β -OH-cholesterol-d₇; 7-keto-OH-cholesterol-d₇; lanosterol-d₆; epicoprostanol) were obtained from Avanti Polar Lipids (Coger SAS, Paris, France). LC-MS/MS quality grade solvents were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Other chemicals of the highest grade available were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Homogenates from plaques were crushed with NaCl 0.9% to obtain a plaque concentration of 0.33mg/ μ L. A volume of sample corresponding to 15mg of tissue was saponified for 45mn at 56°C with 60 μ L of potassium hydroxide 10mol/L and 1.2 mL of ethanol ethanol-BHT (50mg/L) containing 20 μ L of standard-intern mix (μ g/sample: 0.2 (25-OH-cholesterol-d₆); 0.4 (27-OH-cholesterol-d₆); 0.5 (7- α -OH-cholesterol-d₇); 0.5 (7- β -OH-cholesterol-d₇); 1 (7-keto-OH-cholesterol-d₇); 1 (lanosterol-d₆); 100 (epicoprostanol)). Sterols were extracted with 5mL of hexane and 1mL of water. After evaporation of the organic phase, sterols were derivatized with 100 μ L of a mixture of bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/ trimethylchlorosilane 4/1 v/v for one hour at 80°C. After evaporation of the silylating reagent 100 μ L of hexane were added. Trimethylsilylethers of sterols analysis was performed by GCMS in a 7890A gas chromatograph coupled with a 5975C Mass Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separation was achieved on a HP-5MS 30m x 250 μ m column (Agilent Technologies) using helium as carrier gas and the following GC conditions: injection at 250 °C using the pulsed split, oven temperature program: initial temperature 150 °C up to 280°C at a rate of 15°C/min, up to

290°C at a rate of 1°C/min for 2 min. The MSD was set up as follow: EI at 70 eV mode, source temperature at 230°C. Data were acquired in SIM mode using following quantitation ions (m/z): 131.1 for 25-OH-Cholesterol; 137.1 for 25-OH-Cholesterol d6; 145.1 for 24(S)-OH-Cholesterol; 151.1 for 24(S)-OH-Cholesterol d6; 343.3 for Desmosterol; 368.3 for Cholesterol; 370.3 for Epicoprostanol; 375.3 for Cholesterol d7; 399.4 for Lanosterol d6; 417.4 for 27-OH-Cholesterol; 423.4 for 27-OH Cholestrol-d6; 456.4 for 7 α - 7 β Cholesterol; 463.5 for 7 α - 7 β Cholesterol d7; 472.4 for 7-keto-cholesterol; 479.4 for 7-keto-cholesterol d7. A calibration curve was obtained with cholesterol standard (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France, C8667) and desmosterol standard (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France, D6513) using the same method used for samples.

Statistical analysis

Data are presented as the means of three independent determinations +/-S.D. Comparisons among groups were made using Prism software (GraphPad). Statistical significance is defined as $P < 0.05$.

References of the material and method section:

1. GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **390**, 1151–1210 (2017).
2. Barquera, S. *et al.* Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch. Med. Res.* **46**, 328–338 (2015).
3. Doll, R. & Hill, A. B. The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report. 1954. *BMJ* **328**, 1529–1533; discussion 1533 (2004).
4. Lewington, S. *et al.* Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* **360**, 1903–1913 (2002).

5. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration *et al.* Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* **376**, 1670–1681 (2010).
6. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* **302**, 412–423 (2009).
7. Rao Kondapally Seshasai, S. *et al.* Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N. Engl. J. Med.* **364**, 829–841 (2011).
8. Ray, K. K. *et al.* Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* **373**, 1765–1772 (2009).
9. Palmer, S. C. *et al.* Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **305**, 1119–1127 (2011).
10. Kono, K. *et al.* Composition and plaque patterns of coronary culprit lesions and clinical characteristics of patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* **82**, 344–351 (2012).
11. Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J. & Lewington, S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ. Res.* **118**, 535–546 (2016).
12. Tabas, I., García-Cardena, G. & Owens, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell Biol.* **209**, 13–22 (2015).
13. Kim, J. M. *et al.* Mechanism of Ang II involvement in activation of NF- κ B through phosphorylation of p65 during aging. *Age (Dordr)* **34**, 11–25 (2012).

14. Tabas, I., Williams, K. J. & Borén, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* **116**, 1832–1844 (2007).
15. Dai, G. *et al.* Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14871–14876 (2004).
16. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2045–2051 (2012).
17. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q. & Papayannopoulos, V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* **349**, 316–320 (2015).
18. Robbins, C. S. *et al.* Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* **19**, 1166–1172 (2013).
19. Gu, L. *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**, 275–281 (1998).
20. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
21. Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G. K. & Yan, Z. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* **105**, 1158–1161 (2002).
22. Wang, Y., Wang, G. Z., Rabinovitch, P. S. & Tabas, I. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in macrophages. *Circ. Res.* **114**, 421–433 (2014).

23. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)* **214**, 33–50 (2015).
24. Hermansson, A. *et al.* Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J. Exp. Med.* **207**, 1081–1093 (2010).
25. Hansson, G. K., Libby, P. & Tabas, I. Inflammation and plaque vulnerability. *J. Intern. Med.* **278**, 483–493 (2015).
26. Miteva, K., Madonna, R., De Caterina, R. & Van Linthout, S. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* (2018). doi:10.1016/j.vph.2018.04.006
27. Gautier, E. L. *et al.* Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation* **119**, 2367–2375 (2009).
28. Ait-Oufella, H. *et al.* Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* **12**, 178–180 (2006).
29. Subramanian, M., Thorp, E., Hansson, G. K. & Tabas, I. Treg-mediated suppression of atherosclerosis requires MYD88 signaling in DCs. *J. Clin. Invest.* **123**, 179–188 (2013).
30. Butcher, M. J. *et al.* Atherosclerosis-Driven Treg Plasticity Results in Formation of a Dysfunctional Subset of Plastic IFN γ ⁺ Th1/Tregs. *Circ. Res.* **119**, 1190–1203 (2016).
31. Engelbertsen, D. *et al.* T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 637–644 (2013).
32. Kyaw, T. *et al.* B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* **109**, 830–840 (2011).
33. Binder, C. J. *et al.* The role of natural antibodies in atherogenesis. *J. Lipid Res.* **46**, 1353–1363 (2005).

34. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
35. Myoishi, M. *et al.* Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* **116**, 1226–1233 (2007).
36. Dorweiler, B., Grechowa, I., Wallrath, A., Vahl, C. F. & Horke, S. Activation of the proapoptotic unfolded protein response in plaques of the human carotid artery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **48**, 248–257 (2014).
37. Garbin, U. *et al.* Expansion of necrotic core and shedding of MERTK receptor in human carotid plaques: a role for oxidized polyunsaturated fatty acids? *Cardiovasc. Res.* **97**, 125–133 (2013).
38. Libby, P. Collagenases and cracks in the plaque. *J. Clin. Invest.* **123**, 3201–3203 (2013).
39. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 125–138 (2008).
40. Slijkhuis, W., Mali, W. & Appelman, Y. A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis. *Neth Heart J* **17**, 140–144 (2009).
41. McMillan, G. C. Historical review of research on atherosclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **369**, 1–6 (1995).
42. Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr. Rev.* **47**, 23–25 (1989).
43. Finking, G. & Hanke, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* **135**, 1–7 (1997).

44. Kannel, W. B., Dawber, T. R., Kagan, A., Revotskie, N. & Stokes, J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **55**, 33–50 (1961).
45. Anderson, K. M., Castelli, W. P. & Levy, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* **257**, 2176–2180 (1987).
46. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* **62**, 707–714 (1977).
47. Castelli, W. P., Abbott, R. D. & McNamara, P. M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation* **67**, 730–734 (1983).
48. Wilson, P. W. *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837–1847 (1998).
49. Tsao, C. W. & Vasan, R. S. Cohort Profile: The Framingham Heart Study (FHS): overview of milestones in cardiovascular epidemiology. *Int J Epidemiol* **44**, 1800–1813 (2015).
50. Teslovich, T. M. *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **466**, 707–713 (2010).
51. Kathiresan, S. *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**, 56–65 (2009).
52. Ahangari, N., Ghayour Mobarhan, M., Sahebkar, A. & Pasdar, A. Molecular aspects of hypercholesterolemia treatment: current perspectives and hopes. *Ann. Med.* **50**, 303–311 (2018).
53. Benn, M., Watts, G. F., Tybjaerg-Hansen, A. & Nordestgaard, B. G. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the

- Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur. Heart J.* **37**, 1384–1394 (2016).
54. Röhrli, C. & Stangl, H. Cholesterol metabolism-physiological regulation and pathophysiological deregulation by the endoplasmic reticulum. *Wien Med Wochenschr* (2018). doi:10.1007/s10354-018-0626-2
55. Okazaki, S. *et al.* Early statin treatment in patients with acute coronary syndrome: demonstration of the beneficial effect on atherosclerotic lesions by serial volumetric intravascular ultrasound analysis during half a year after coronary event: the ESTABLISH Study. *Circulation* **110**, 1061–1068 (2004).
56. Puri, R. *et al.* Non-HDL Cholesterol and Triglycerides: Implications for Coronary Atheroma Progression and Clinical Events. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2220–2228 (2016).
57. Maron, D. J., Fazio, S. & Linton, M. F. Current perspectives on statins. *Circulation* **101**, 207–213 (2000).
58. Nissen, S. E. *et al.* Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* **295**, 1556–1565 (2006).
59. Tang, X. *et al.* The effect of statin therapy on plaque regression following acute coronary syndrome: a meta-analysis of prospective trials. *Coron. Artery Dis.* **27**, 636–649 (2016).
60. Stone, N. J. Reducing residual risk in secondary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* **125**, 1958–1960 (2012).
61. Stone, N. J., Robinson, J. G. & Lichtenstein, A. The new cholesterol treatment guidelines. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1957 (2014).

62. Vavlukis, M. & Vavlukis, A. Adding ezetimibe to statin therapy: latest evidence and clinical implications. *Drugs Context* **7**, 212534 (2018).
63. Cannon, C. P. *et al.* Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2387–2397 (2015).
64. Tsujita, K. *et al.* Impact of Dual Lipid-Lowering Strategy With Ezetimibe and Atorvastatin on Coronary Plaque Regression in Patients With Percutaneous Coronary Intervention: The Multicenter Randomized Controlled PRECISE-IVUS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 495–507 (2015).
65. Lo Surdo, P. *et al.* Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* **12**, 1300–1305 (2011).
66. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H. & Hobbs, H. H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272 (2006).
67. Nicholls, S. J. *et al.* Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA* **316**, 2373–2384 (2016).
68. Libby, P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1225–1228 (2005).
69. Berk, B. C., Weintraub, W. S. & Alexander, R. W. Elevation of C-reactive protein in 'active' coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **65**, 168–172 (1990).
70. Liuzzo, G. *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N. Engl. J. Med.* **331**, 417–424 (1994).
71. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* **375**, 132–140 (2010).

72. Libby, P., Ridker, P. M., Hansson, G. K. & Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 2129–2138 (2009).
73. Ridker, P. M. *et al.* Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2195–2207 (2008).
74. Ridker, P. M. *et al.* Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* **98**, 839–844 (1998).
75. Ridker, P. M. *et al.* Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1959–1965 (2001).
76. Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F. & Rawlings, R. R. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 950–962 (2011).
77. Ishibashi, M. *et al.* Liver X Receptor Regulates Arachidonic Acid Distribution and Eicosanoid Release in Human Macrophages: A Key Role for Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2013). doi:10.1161/ATVBAHA.112.300812
78. Innes, J. K. & Calder, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **132**, 41–48 (2018).
79. Kralisch, S. & Fasshauer, M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* **56**, 10–21 (2013).

80. Rubinow, K. B. *et al.* Acyl-CoA synthetase 1 is induced by Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide and is required for phospholipid turnover in stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* **288**, 9957–9970 (2013).
81. Kanter, J. E., Tang, C., Oram, J. F. & Bornfeldt, K. E. Acyl-CoA synthetase 1 is required for oleate and linoleate mediated inhibition of cholesterol efflux through ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 358–364 (2012).
82. Cyrus, T., Yao, Y., Ding, T., Dogné, J. M. & Praticò, D. A novel thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor, BM-573, reduces development and progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* **561**, 105–111 (2007).
83. Gabrielsen, A. *et al.* Thromboxane synthase expression and thromboxane A2 production in the atherosclerotic lesion. *J. Mol. Med.* **88**, 795–806 (2010).
84. Bäck, M., Sultan, A., Ovchinnikova, O. & Hansson, G. K. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ. Res.* **100**, 946–949 (2007).
85. Helgadottir, A. *et al.* The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat. Genet.* **36**, 233–239 (2004).
86. Bäck, M. *et al.* Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17501–17506 (2005).
87. Waddington, E., Sienuarine, K., Puddey, I. & Croft, K. Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **292**, 234–244 (2001).
88. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 36–46 (2010).

89. Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=resolvin+D1+limits+5-lipoxyg%C3%A9nase+fredman>. (Accessed: 18th November 2017)
90. Chatterjee, A. *et al.* Biosynthesis of proresolving lipid mediators by vascular cells and tissues. *FASEB J.* **31**, 3393–3402 (2017).
91. Wu, B., Mottola, G., Schaller, M., Upchurch, G. R. & Conte, M. S. Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications. *Mol. Aspects Med.* **58**, 72–82 (2017).
92. Circulating inflammation-resolving lipid mediators RvD1 and DHA are decreased in patients with acutely symptomatic carotid disease. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=circulating+inflammation-resolving+lipid+mediator+RvD1+and+DHA+are+decreased+in+patients>. (Accessed: 18th November 2017)
93. Fredman, G. *et al.* An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat Commun* **7**, 12859 (2016).
94. Bazan, H. A. *et al.* Diminished omega-3 fatty acids are associated with carotid plaques from neurologically symptomatic patients: Implications for carotid interventions. *Vascul. Pharmacol.* **51**, 331–336 (2009).
95. Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**, 1003–1018 (2013).
96. Bujak, M. *et al.* Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* **173**, 57–67 (2008).

97. Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
98. Grebe, A., Hoss, F. & Latz, E. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circulation Research* **122**, 1722–1740 (2018).
99. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
100. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **21**, 677–687 (2015).
101. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
102. Karasawa, T. & Takahashi, M. The crystal-induced activation of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *Inflamm Regen* **37**, 18 (2017).
103. Baroja-Mazo, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* **15**, 738–748 (2014).
104. Isoda, K. *et al.* Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1068–1073 (2004).
105. Elhage, R. *et al.* Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **97**, 242–244 (1998).
106. Devlin, C. M., Kuriakose, G., Hirsch, E. & Tabas, I. Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6280–6285 (2002).

107. Isoda, K. *et al.* Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation* **108**, 516–518 (2003).
108. Chamberlain, J. *et al.* Interleukin-1beta and signaling of interleukin-1 in vascular wall and circulating cells modulates the extent of neointima formation in mice. *Am. J. Pathol.* **168**, 1396–1403 (2006).
109. Chamberlain, J., Gunn, J., Francis, S., Holt, C. & Crossman, D. Temporal and spatial distribution of interleukin-1 beta in balloon injured porcine coronary arteries. *Cardiovasc. Res.* **44**, 156–165 (1999).
110. Kirii, H. *et al.* Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 656–660 (2003).
111. Bhaskar, V. *et al.* Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **216**, 313–320 (2011).
112. Gage, J., Hasu, M., Thabet, M. & Whitman, S. C. Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Can J Cardiol* **28**, 222–229 (2012).
113. Zheng, F., Xing, S., Gong, Z., Mu, W. & Xing, Q. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm.* **2014**, 507208 (2014).
114. Guillén, I., Blanes, M., Gómez-Lechón, M. J. & Castell, J. V. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am. J. Physiol.* **269**, R229-235 (1995).
115. Galea, J. *et al.* Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1000–1006 (1996).

116. Dewberry, R., Holden, H., Crossman, D. & Francis, S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2394–2400 (2000).
117. Patti, G. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist: a sensitive marker of instability in patients with coronary artery disease. *J. Thromb. Thrombolysis* **14**, 139–143 (2002).
118. Kastrati, A. *et al.* Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 2168–2173 (2000).
119. Shi, X., Xie, W.-L., Kong, W.-W., Chen, D. & Qu, P. Expression of the NLRP3 Inflammasome in Carotid Atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **24**, 2455–2466 (2015).
120. Afrasyab, A. *et al.* Correlation of NLRP3 with severity and prognosis of coronary atherosclerosis in acute coronary syndrome patients. *Heart Vessels* **31**, 1218–1229 (2016).
121. Portincasa, P. Colchicine, Biologic Agents and More for the Treatment of Familial Mediterranean Fever. The Old, the New, and the Rare. *Curr. Med. Chem.* **23**, 60–86 (2016).
122. Emmi, G. *et al.* Use of Interleukin-1 Blockers in Pericardial and Cardiovascular Diseases. *Curr Cardiol Rep* **20**, 61 (2018).
123. Moriya, J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol* (2018). doi:10.1016/j.jjcc.2018.05.010
124. Kendrick, J. *et al.* Effect of lovastatin on primary prevention of cardiovascular events in mild CKD and kidney function loss: a post hoc analysis of the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *Am. J. Kidney Dis.* **55**, 42–49 (2010).

125. Ridker, P. M. *et al.* Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet* **391**, 319–328 (2018).
126. Kleveland, O. *et al.* Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur. Heart J.* **37**, 2406–2413 (2016).
127. Hong, D. S. *et al.* MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 α in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol.* **15**, 656–666 (2014).
128. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 104–116 (2015).
129. Yvan-Charvet, L. *et al.* Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* **118**, 1837–1847 (2008).
130. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* **11**, 155–161 (2010).
131. Björkbacka, H. *et al.* Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat. Med.* **10**, 416–421 (2004).
132. Venteclef, N. *et al.* GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* **24**, 381–395 (2010).

133. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* **25**, 57–70 (2007).
134. Rosenson, R. S. *et al.* Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* **125**, 1905–1919 (2012).
135. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. The acute phase response inhibits reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **51**, 682–684 (2010).
136. Sherer, Y. & Shoenfeld, Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**, 99–106 (2006).
137. McGillicuddy, F. C. *et al.* Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* **119**, 1135–1145 (2009).
138. Shao, B. *et al.* Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase. *Circ. Res.* **114**, 1733–1742 (2014).
139. Huang, Y. *et al.* An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nat. Med.* **20**, 193–203 (2014).
140. Collier, B. S. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 658–670 (2005).
141. Westerterp, M. *et al.* ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ. Res.* **114**, 157–170 (2014).
142. Ganjali, S. *et al.* Monocyte-to-HDL-cholesterol ratio as a prognostic marker in cardiovascular diseases. *J. Cell. Physiol.* (2018). doi:10.1002/jcp.27028
143. Tolani, S. *et al.* Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic stem cell proliferation and monocytosis: studies in mice and FH children. *Atherosclerosis* **229**, 79–85 (2013).

144. van Kampen, E., Jaminon, A., van Berkel, T. J. C. & Van Eck, M. Diet-induced (epigenetic) changes in bone marrow augment atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 833–841 (2014).
145. Willy, P. J. *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* **9**, 1033–1045 (1995).
146. Apfel, R. *et al.* A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7025–7035 (1994).
147. Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 459–481 (2000).
148. Auboeuf, D. *et al.* Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 1319–1327 (1997).
149. Chen, M., Beaven, S. & Tontonoz, P. Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J. Lipid Res.* **46**, 2570–2579 (2005).
150. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**, 1866–1870 (2001).
151. Wiebel, F. F. & Gustafsson, J. A. Heterodimeric interaction between retinoid X receptor alpha and orphan nuclear receptor OR1 reveals dimerization-induced activation as a novel mechanism of nuclear receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3977–3986 (1997).

152. Edwards, P. A., Kennedy, M. A. & Mak, P. A. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 249–256 (2002).
153. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728–731 (1996).
154. Hiebl, V., Ladurner, A., Latkolik, S. & Dirsch, V. M. Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnol. Adv.* (2018). doi:10.1016/j.biotechadv.2018.03.003
155. Gabbi, C., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å. Action mechanisms of Liver X Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 647–650 (2014).
156. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121–141 (2000).
157. Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K. & Bełtowski, J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **61**, 736–759 (2007).
158. Lehmann, J. M. *et al.* Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 3137–3140 (1997).
159. Yang, C. *et al.* Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **281**, 27816–27826 (2006).
160. Fu, X. *et al.* 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 38378–38387 (2001).
161. Björkhem, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J. Clin. Invest.* **110**, 725–730 (2002).

162. Leonarduzzi, G., Sottero, B. & Poli, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.* **13**, 700–710 (2002).
163. Schroepfer, G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
164. Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A. & Saez, E. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* **581**, 1721–1726 (2007).
165. Houck, K. A. *et al.* T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab.* **83**, 184–187 (2004).
166. Ou, J. *et al.* Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6027–6032 (2001).
167. Yoshikawa, T. *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem.* **277**, 1705–1711 (2002).
168. Forman, B. M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G. J. & Evans, R. M. The orphan nuclear receptor LXRA is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10588–10593 (1997).
169. Berrodin, T. J. *et al.* Identification of 5 α , 6 α -epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity. *Mol. Pharmacol.* **78**, 1046–1058 (2010).
170. Thomas, J. *et al.* A chemical switch regulates fibrate specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) versus liver X receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 2403–2410 (2003).

171. Chinetti, G. *et al.* 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 (2001).
172. Forcheron, F., Cachefo, A., Thevenon, S., Pinteur, C. & Beylot, M. Mechanisms of the triglyceride- and cholesterol-lowering effect of fenofibrate in hyperlipidemic type 2 diabetic patients. *Diabetes* **51**, 3486–3491 (2002).
173. Laffitte, B. A. *et al.* Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7558–7568 (2001).
174. Jiang, W. *et al.* Inhibition of LXRA signaling by vitamin D receptor: possible role of VDR in bile acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 176–184 (2006).
175. Chiang, J. Y., Kimmel, R. & Stroup, D. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRA). *Gene* **262**, 257–265 (2001).
176. Tobin, K. A. R. *et al.* Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 10691–10697 (2002).
177. Lundholm, L. *et al.* Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J. Mol. Endocrinol.* **32**, 879–892 (2004).
178. Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L. & von Eckardstein, A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 655–666 (2006).
179. Tontonoz, P. Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 129–137 (2011).

180. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 28240–28245 (2000).
181. Kennedy, M. A. *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* **1**, 121–131 (2005).
182. Brunham, L. R. *et al.* Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ. Res.* **99**, 672–674 (2006).
183. Wang, M.-D. *et al.* Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways. *J. Lipid Res.* **48**, 633–645 (2007).
184. Rigamonti, E. *et al.* Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ. Res.* **97**, 682–689 (2005).
185. Laffitte, B. A. *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 507–512 (2001).
186. Mak, P. A. *et al.* Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 31900–31908 (2002).
187. Cao, G. *et al.* Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**, 39561–39565 (2002).
188. Laffitte, B. A. *et al.* The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2182–2191 (2003).

189. Masson, D. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse. *J. Lipid Res.* **45**, 543–550 (2004).
190. Goodwin, B. *et al.* Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* **17**, 386–394 (2003).
191. Verreault, M. *et al.* The liver X-receptor alpha controls hepatic expression of the human bile acid-glucuronidating UGT1A3 enzyme in human cells and transgenic mice. *Hepatology* **44**, 368–378 (2006).
192. Repa, J. J. *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–18800 (2002).
193. Back, S. S. *et al.* Cooperative transcriptional activation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 genes by nuclear receptors including Liver-X-Receptor. *BMB Rep* **46**, 322–327 (2013).
194. Yu, L. *et al.* Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* **278**, 15565–15570 (2003).
195. Duval, C. *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1259–1263 (2006).
196. Ahn, S. B., Jun, D. W., Jang, K., Lee, B. H. & Shin, K. J. Duodenal Niemann-Pick C1-like 1 expression was negatively correlated with liver X receptor expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J. Intern. Med.* (2018). doi:10.3904/kjim.2017.100
197. Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A. & Brown, M. S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35–46 (2006).

198. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R. & Tontonoz, P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* **325**, 100–104 (2009).
199. Ulven, S. M., Dalen, K. T., Gustafsson, J.-A. & Nebb, H. I. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **73**, 59–63 (2005).
200. Shimano, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* **40**, 439–452 (2001).
201. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W. C. & Ntambi, J. M. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6786–6798 (2006).
202. Joseph, S. B. *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 11019–11025 (2002).
203. Cha, J.-Y. & Repa, J. J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* **282**, 743–751 (2007).
204. Hegarty, B. D. *et al.* Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 791–796 (2005).
205. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–2838 (2000).
206. Kirchgessner, T. G. *et al.* Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **24**, 223–233 (2016).

207. Ito, A. *et al.* LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife* **4**, e08009 (2015).
208. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
209. Castrillo, A., Joseph, S. B., Marathe, C., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* **278**, 10443–10449 (2003).
210. Fontaine, C. *et al.* Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ. Res.* **101**, 40–49 (2007).
211. Reis e Sousa, C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* **16**, 27–34 (2004).
212. Töröcsik, D. *et al.* Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J. Immunol.* **184**, 5456–5465 (2010).
213. Go, A. S. *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **129**, 399–410 (2014).
214. Bornfeldt, K. E. & Tabas, I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.* **14**, 575–585 (2011).
215. Bradshaw, E. M. *et al.* Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J. Immunol.* **183**, 4432–4439 (2009).
216. Litherland, S. A. *et al.* Aberrant monocyte prostaglandin synthase 2 (PGS2) expression in type 1 diabetes before and after disease onset. *Pediatr Diabetes* **4**, 10–18 (2003).

217. Shanmugam, N., Kim, Y. S., Lanting, L. & Natarajan, R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* **278**, 34834–34844 (2003).
218. Cipollone, F. *et al.* The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* **108**, 1070–1077 (2003).
219. Kanter, J. E. *et al.* Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E715-724 (2012).
220. Koehrer, P. *et al.* Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy. *PLoS ONE* **9**, e106912 (2014).
221. Denimal, D. *et al.* Significant abnormalities of the HDL phosphosphingolipidome in type 1 diabetes despite normal HDL cholesterol concentration. *Atherosclerosis* **241**, 752–760 (2015).
222. Burke, A. P. *et al.* Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1266–1271 (2004).
223. Moreno, P. R. *et al.* Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* **102**, 2180–2184 (2000).
224. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* **111**, 6130–6185 (2011).
225. Barber, M. N. *et al.* Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLoS ONE* **7**, e41456 (2012).

226. Croset, M., Brossard, N., Polette, A. & Lagarde, M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem. J.* **345 Pt 1**, 61–67 (2000).
227. Okudaira, M. *et al.* Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. *J. Lipid Res.* **55**, 2178–2192 (2014).
228. Kazachkov, M., Chen, Q., Wang, L. & Zou, J. Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids* **43**, 895–902 (2008).
229. Shiu, S. W. M., Tan, K. C. B., Huang, Y. & Wong, Y. Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. *Atherosclerosis* **198**, 441–447 (2008).
230. Ménégaut, L. *et al.* Specific enrichment of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine in carotid atheroma plaque from type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* (2016). doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.004
231. Pete, M. J. & Exton, J. H. Purification of a lysophospholipase from bovine brain that selectively deacylates arachidonoyl-substituted lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **271**, 18114–18121 (1996).
232. Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Sugiura, T. & Waku, K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 281–288 (1996).
233. Aoki, J., Inoue, A. & Okudaira, S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 513–518 (2008).

234. Rother, E. *et al.* Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* **108**, 741–747 (2003).
235. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol* **54**, 2129–2138 (2009).
236. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
237. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 104–116 (2015).
238. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* **11**, 155–161 (2010).
239. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
240. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
241. Spann, N. J. *et al.* Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* **151**, 138–152 (2012).
242. Wang, B. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* (2018). doi:10.1038/s41574-018-0037-x
243. Venteclef, N. *et al.* GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* **24**, 381–395 (2010).

244. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* **25**, 57–70 (2007).
245. Ito, A. *et al.* LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife* **4**, e08009 (2015).
246. Fontaine, C. *et al.* Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ. Res.* **101**, 40–49 (2007).
247. Monaco, C. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation* **120**, 2462–2469 (2009).
248. Rébé, C. *et al.* Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circ. Res.* **105**, 393–401 (2009).
249. Tripathi, S. *et al.* Meta- and Orthogonal Integration of Influenza ‘OMICS’ Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe* **18**, 723–735 (2015).
250. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2009).
251. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
252. Zuercher, W. J. *et al.* Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **53**, 3412–3416 (2010).
253. Zhang, W. *et al.* Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *J. Neuroimmunol.* **174**, 63–73 (2006).
254. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).

255. Na, T.-Y. *et al.* Positive cross-talk between hypoxia inducible factor-1 α and liver X receptor α induces formation of triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2949–2956 (2011).
256. Moreno-Manzano, V. *et al.* FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J. Biol. Chem.* **285**, 1333–1342 (2010).
257. Kase, E. T. *et al.* Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* **54**, 1108–1115 (2005).
258. Walczak, R. *et al.* Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 9905–9911 (2004).
259. Sluimer, J. C. *et al.* Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1258–1265 (2008).
260. Folco, E. J., Sukhova, G. K., Quillard, T. & Libby, P. Moderate Hypoxia Potentiates Interleukin-1 β Production in Activated Human Macrophages. *Circ Res* **115**, 875–883 (2014).
261. Pehkonen, P. *et al.* Genome-wide landscape of liver X receptor chromatin binding and gene regulation in human macrophages. *BMC Genomics* **13**, 50 (2012).
262. Feldmann, R. *et al.* Genome-wide analysis of LXR α activation reveals new transcriptional networks in human atherosclerotic foam cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3518–3531 (2013).
263. Walczak-Drzewiecka, A., Ratajewski, M., Pułaski, Ł. & Dastyk, J. DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1028–1032 (2010).

264. Pierre, C. C. *et al.* Methylation-dependent regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha gene expression by the transcription factor Kaiso. *Biochim. Biophys. Acta* **1849**, 1432–1441 (2015).
265. Muse, E. D. *et al.* Cell-specific discrimination of desmosterol and desmosterol mimetics confers selective regulation of LXR and SREBP in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E4680–E4689 (2018).
266. Sarrazy, V. *et al.* Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of ApoE(-/-) Mice. *Circ. Res.* **118**, 1062–1077 (2016).
267. Folco, E. J. *et al.* Hypoxia But Not Inflammation Augments Glucose Uptake in Human Macrophages: Implications for Imaging Atherosclerosis With 18Fluorine-Labeled 2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography. *Journal of the American College of Cardiology* **58**, 603–614 (2011).
268. Nishizawa, T. *et al.* Testing the role of myeloid cell glucose flux in inflammation and atherosclerosis. *Cell Rep* **7**, 356–365 (2014).
269. Westerterp, M. *et al.* Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis and Atherogenesis. *Circulation* (2018).
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032636
270. Kirchgessner, T. G. *et al.* Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **24**, 223–233 (2016).
271. Hong, C. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 433–444 (2014).

272. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
273. Lampropoulou, V. *et al.* Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* **24**, 158–166 (2016).
274. Groh, L., Keating, S. T., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Riksen, N. P. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* **40**, 203–214 (2018).
275. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=moulton+heller+konerding>. (Accessed: 9th May 2018)
276. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337–1340 (2001).
277. Koslowski, M., Luxemburger, U., Türeci, O. & Sahin, U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1 α . *Oncogene* **30**, 876–882 (2011).
278. Wang, G. L. & Semenza, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 4304–4308 (1993).
279. Wang, G. L. & Semenza, G. L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**, 21513–21518 (1993).
280. Na, T.-Y. *et al.* Positive cross-talk between hypoxia inducible factor-1 α and liver X receptor α induces formation of triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2949–2956 (2011).

281. Varin, A. *et al.* Liver X receptor activation promotes polyunsaturated fatty acid synthesis in macrophages: relevance in the context of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1357–1365 (2015).
282. Matsuura, Y. *et al.* Altered glucose metabolism and hypoxic response in alloxan-induced diabetic atherosclerosis in rabbits. *PLoS ONE* **12**, e0175976 (2017).
283. Ross, S. & Paré, G. Pharmacogenetics of Stroke. *Stroke* **49**, 2541–2548 (2018).
284. Ogawa, H. *et al.* Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA* **300**, 2134–2141 (2008).
285. Gilpin, V. L., American Diabetes Association, American Heart Association & American College of Cardiology Foundation. Review of an article: aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes. A position statement of the American Diabetes Association (ADA), a scientific statement of the American Heart Association(AHA), and an expert consensus document of the American College of Cardiology Foundation (ACCF). *Diabetes Care*, 33:6; June 2010; 1395-1402. *J Vasc Nurs* **28**, 154–155 (2010).
286. Bazan, H. A. *et al.* Circulating inflammation-resolving lipid mediators RvD1 and DHA are decreased in patients with acutely symptomatic carotid disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **125**, 43–47 (2017).

Results:

LXR activation increases IL-1 β expression in human primary macrophages stimulated by a TLR2 agonist.

Murine bone marrow-derived macrophages (mBMDMs) and human monocytes-derived macrophages (hMDMs) were differentiated in parallel for 8 days in the presence of M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor). After 6 days of differentiation, macrophages were treated with GW3965, a specific LXR agonist, at 1 μ M (Figure 1A). Expression of TLR2 and TLR4 was assessed at the end of the differentiation period. As previously described, LXR agonist treatment induces a significant increase in *TLR4* mRNA levels in hMDMs, but not in mBMDMs (Figure 1B). By contrast, *TLR2* mRNA levels remained unchanged after LXR agonist treatment either in human or murine macrophages (Figure 1B).

Differentiated macrophages were activated by TLR4 (LPS) and TLR2 (Pam3CSK4) agonists and the inflammatory response was assessed at the transcriptional level 4 hours after TLR activation (Figure 1A) by measuring *IL1 β* and *TNF α* mRNA levels. As previously described, LXR agonist pre-treatment exerts a pronounced anti-inflammatory effect in murine macrophages and inhibits both IL-1 β and TNF α response in LPS-stimulated macrophages. A similar observation was made with Pam3CSK4 but to a lesser extent (Figure 1C). As expected, GW3965 treatment potentiated the LPS response of human macrophages with significant increases in *IL1 β* and *TNF α* mRNA levels, likely due to LXR-mediated TLR4 induction. The most interesting observations came from LXR agonist-conditioned human macrophages stimulated with Pam3CSK4 with opposite effects of LXR activation on the TNF α and IL-1 β responses. While *TNF α* mRNA levels tended to be decreased by LXR agonist pre-treatment, *IL1 β* mRNA levels were robustly induced in LXR agonist-treated macrophages (Figure 1C). A similar effect of LXR activation on IL-1 β was also observed with classically activated macrophages differentiated in the presence of GM-CSF (Figure S1), while no impact of LXR agonist was observed on *IL1 β* mRNA levels in THP-1 cells, a widely used human monocytic cell line (Figure S1).

IL-1 β induction by LXR is selective and independent of TLR2 activation.

To further explore the mechanisms leading to the induction of *IL1 β* gene expression by LXR agonist conditioning, primary human macrophages from eight donors were differentiated as described in figure 1A. The effect of LXR agonist on *IL1 β* gene expression was measured at basal state or after exposure to Pam3CSK4. As shown in figure 2A, in seven donors out of eight, 48h conditioning with LXR agonist induces a significant increase in *IL1 β* mRNA levels

in the absence of any TLR activation. A similar impact of LXR treatment was also observed in macrophages stimulated with Pam3CSK4 (Figure 2B). Although the *IL1 β* mRNA levels were considerably lower in control macrophages, the magnitude of IL-1 β induction by LXR agonist treatment was similar in control and Pam3CSK4-treated cells. In other words, our data suggest that LXR agonists do not affect TLR2 signaling pathways but rather selectively upregulate *IL1 β* gene expression. In agreement with this assumption, no impact of LXR activation was observed on the gene expression of the inflammatory cytokines *TNF α* , *IL6* or *MCPI* (Figure S2). Indeed, LXR activation rather resulted in the inhibition of *TNF α* gene expression (Figure S2). As expected, activation of LXR with steroidal (22R OH-cholesterol) or other synthetic LXR agonists (T0901317) triggered a rise in *IL1 β* mRNA levels but not in *TNF α* mRNA levels (Figure 2C and S3A). At the opposite, LXR inhibition with siRNA targeting LXR α , the major LXR isoform in human macrophages (Figure S3C), or with GSK2033, a synthetic LXR antagonist²⁵² abolished the induction of IL-1 β mediated by GW3965 pretreatment (Figure 2D-E). Again, no induction was observed with *TNF α* (Figure S3B and D). Importantly, changes in *IL1 β* mRNA levels translated into an increase in the pro-IL-1 β protein levels in LXR agonist-conditioned Pam3CSK4-stimulated cells (Figure 2F). Noteworthy, pro-IL-1 β was not detected without Pam3CSK4 stimulation. As previously described, in the absence of inflammasome activation, mature IL-1 β was secreted only at very low levels in the extracellular medium by human macrophages (Figure 2G and Figure S3E). By contrast, exposure to ATP markedly induced its extracellular release. Strikingly, this event was drastically enhanced upon LXR conditioning (Figure 2G). No impact of LXR stimulation was observed for *TNF α* and *IL6* secretion (figure S3E). Thus, these data demonstrated that the induction of IL-1 β by LXRs at the transcriptional level translated into an increased secretion of mature IL-1 β by human macrophages following TLR stimulation and inflammasome activation by ATP.

LXR-HIF1 α pathway drives IL1 β induction

We sought to identify the factors potentially involved in the differential regulation of *TNF α* and IL-1 β by LXRs and to explain the discrepancies between murine and human macrophages. We turned our attention to the transcription factor HIF1 α . Indeed IL1- β is a HIF1 α -target²⁵³ and it has been shown that HIF1 α contributes to the LPS-mediated induction of IL-1 β in macrophages but has no impact on *TNF α* expression.²⁵⁴ Moreover, LXR and HIF1 α have been shown to cooperate to promote lipogenesis in macrophages.²⁵⁵ Interestingly, a first transcriptional approach revealed that *HIF1 α* mRNA levels were increased after LXR

agonist treatment of human macrophages at basal state level as well as in combination with Pam3CSK4 (Figure 3A). As expected, TLR2 agonist induced an increase in *HIF1α* mRNA levels in control and LXR-treated macrophages (Figure 3A). At the protein level, these observations were confirmed by ELISA (Figure 3B). Importantly, LXR-mediated induction of *HIF1α* mRNA levels was absent in mBMDMs (figure 3A). Higher nuclear and cytoplasmic HIF1α staining was observed by immunofluorescence analysis in LXR and/or Pam3CSK4 treated human macrophages as compared to control macrophages (Figure 3C). By contrast, no LXR agonist-mediated change was observed in murine macrophages where Pam3CSK4 slightly increases HIF1α staining, as expected (Figure S4A).

To determine whether HIF1α was involved in the LXR-mediated induction of IL-1β gene expression, we neutralized HIF1α with either a pharmacological inhibitor (FM19G11)²⁵⁶ or siRNAs. In both cases, HIF1α inhibition abolished the impact of LXR on IL-1β expression (Figure 3D and E and S4B). Thus, our data demonstrate that LXR-mediated HIF1α induction is responsible for the increase in *IL1β* mRNA levels.

Increased HIF1α activity poised IL-1β for subsequent TLR-induction.

To decipher the molecular basis of the LXR/HIF1α mediated induction of IL-1β, human macrophages were exposed to LXR agonist for 6h or 48h before TLR2 stimulation. Interestingly, 6 hours conditioning with GW3965 tend to inhibit IL-1β expression both at basal level and upon Pam3CSK4 activation. By contrast, exposure of 48h restored the upregulation of *IL1β* gene expression induced by LXR (Figure 4A). The HIF1α expression pattern was different with a significant induction observed as early as 6h after exposure to various LXR agonists (Figure 4B and Figure S5). Therefore, the enhancement of HIF1α gene expression mediated by LXR precedes the induction of IL-1β. This does not argue in favor of a direct regulation of IL-1β by LXRs. Consequently, we explored potential HIF1α-dependent epigenetic changes in *IL1β* gene promoter. Histone 3 acetylation around the hypoxia responsive element (HRE) of the *IL1β* promoter was assessed by chromatin immunoprecipitation. In line with our hypothesis, a significant enrichment in H3 acetylation was observed after the exposure of human macrophages to an LXR agonist (Figure 4C).

LXR agonists potentiate HIF1α signaling in human macrophages.

LXR-mediated regulation of HIF1 α could theoretically affect other HIF1 α -regulated pathways beside IL-1 β . To test this hypothesis we reanalyzed transcriptomic data previously published by our group²⁴⁸ of human monocytes treated for 48h with T0901317, a potent LXR activator. In two independent donors, we observed that several HIF1 α target genes including *IL1 β* were positively regulated by T0901317 (Figure 5A and 5B). Regulated genes were involved in angiogenesis (*VEGFA*, *CxCR4*) and glycolysis pathways (*GLUT1*, *HK2*, *PDK1*, *PFKB3*). These observations were confirmed by gene set enrichment analysis using Metascape, the HIF1 α -regulated pathways noted by the GO terms “angiogenesis” and “cellular carbohydrate metabolic process” were significantly enriched by T091317 treatment (Figure 5C). KEGG pathway “HIF1 α pathway” was also significantly enriched according to DAVID (not shown). These data, obtained in human monocytes, were confirmed in GW3965-exposed human macrophages. As depicted in Figure 5D, exposure to GW3965 leads to a significant rise in *GLUT1*, *HK2*, *VEGFA*, *CxCR4* mRNA levels. GLUT1 and VEGF were previously described as LXR targets^{257 258}. Here, we assessed the contribution of HIF1 α in this LXR-mediated gene regulation. Interestingly, HIF1 α knock-down significantly reduced the mRNA levels of *GLUT1*, *HK2*, *VEGFA* and *CxCR4* in LXR agonist-treated cells while it had almost no effect in control cells. This suggests that HIF1 α substantially contributed to the LXR-mediated induction of these genes (Figure 5E). An opposite picture was observed in mBMDMs, where LXR-mediated increase of glycolysis genes was absent (Figure S6). This further strengthens the differential response between human and murine macrophages. Finally, we measured the glycolytic activity of human and murine macrophages stimulated with Pam3CSK4 in combination with GW3965 or not (Figure 5F and G). At basal settings, human macrophages display a low glycolytic rate. Pam3CSK4, GW3965 or GW3965/Pam3CSK4 sequential stimulation, markedly induced it. While the induction of glycolysis following TLR agonist stimulation was quite expected, to our knowledge our results indicate for the first time that LXR activation promotes glycolysis in primary human macrophages. The picture was very different in mouse macrophages. Indeed, while TLR2 agonist promoted as expected a marked increase in the glycolytic activity of macrophages, GW3965 treatment strongly inhibited glycolysis either in control or in Pam3CSK4-treated cells (Figure 5G).

Human carotid plaque samples increase IL-1 β expression in an LXR-dependent manner

Human atherosclerotic plaques contain a complex mixture of oxidized lipids such as oxysterols, fatty acids and retinoids which are able to activate, among other pathway the LXR/RXR axis.²⁴⁸ In order to mimic the settings of the plaque, human primary macrophages were exposed to homogenates prepared from human atheroma plaques. Plaque homogenates were added to the culture medium at 1/100 and they were incubated for 48h with macrophages with or without the LXR antagonist GSK2033. As previously reported²⁴⁸, plaque homogenates markedly induced LXR-regulated genes including *ABCA1* and *ABCG1* (Figure 6A and Figure S7A). This induction was significantly attenuated in the presence of GSK2033, a selective LXR antagonist (Figure 6A and Figure S7A). Strikingly, plaque homogenates markedly induced the gene expression of *IL1 β* by 10 to 100-fold as compared to control samples. Again, this effect was blunted by GSK2033, further supporting the involvement of LXR signaling (Figure 6A). Interestingly, plaque homogenates also slightly induced *HIF1 α* mRNA levels (Figure 6A) and *HIF1 α* mRNA levels strongly correlated with the induction of *IL1 β* gene expression (Figure S7B). At the opposite, healthy carotid samples had no impact on *IL1 β* mRNA levels (figure S7C). Interestingly, while 48h exposure to plaques samples did not affect *TNF α* mRNA levels, GSK2033 weakly induced *TNF α* in macrophages exposed to plaque homogenates (Figure S7A). Preincubation of macrophages with plaque homogenates also potentiated IL-1 β response following TLR2 stimulation but did not induce *TNF α* (Figure 6B and Figure S7D).

To confirm our results with an unbiased approach, we performed a whole transcriptome analysis by using RNA sequencing of human macrophages incubated with plaque samples for 48h with or without GSK2033. Plaque treatment resulted in the significant induction of 426 genes, among them LXR targets such as *ABCA1*, *ABCG1*, *RARA*, *CD82* and *NR1H3* were highly induced (Figure 6D and 6E). Importantly, *IL1 β* was amongst the 100 most induced genes. Gene set enrichment analysis revealed that the major pathways enriched were involved in cell migration, cellular response to LPS and lipids (Figure 6C). HIF1 α pathway was also significantly enriched (Figure 6C) with HIF1 α target genes involved in glycolysis such as *HK2*, *HK3*, *SLC2A1* and *PFKB*. As expected, genes involved in cholesterol synthesis were markedly down-regulated by treatment with plaque samples (Figure S8A). Combined exposure of macrophages to atheroma plaque samples and GSK has a limited impact as compared with plaque exposure alone with 56 transcripts downregulated and 7 transcripts upregulated (Figure 6D and S8B). Interestingly, *ABCG1*, *ABCA1* and IL-1 β were present

among the 29 genes that were significantly induced by plaque exposure and inhibited by GSK2033 (Figure 6 D and 6E).

We characterized 27 plaques samples by a targeted lipidomic analysis of sterols, clinical parameters of patients are given in Table S1. As expected, samples contained high amounts of cholesterol and oxidized sterols, notably 27-OH cholesterol (Figure 7A and S9A). Oxysterol content of the plaques (including 27 OH-, 25 OH-, 7 alpha- , 7 beta- and 7 oxo-cholesterol but not 24 OH-cholesterol or desmosterol) strongly correlated with the ability of plaques homogenates to induce IL-1 β from primary macrophages (Figure 7B and S9B). Cholesterol content also correlated positively with IL-1 β but to a lesser extent as compared with oxysterols (Figure S9B).

IL-1 β colocalizes with HIF1 α and LXR α in macrophage-rich area of human carotid artery plaques

We examined the localization of HIF1 α and LXR α in human atheroma plaques by immunohistochemistry. All the plaque samples were strongly positive for LXR α . LXR staining was observed in the nuclei of the cells and was predominantly localized in macrophage-enriched area, as assessed by CD68 staining (Figure 7C). Six plaque samples out of seven were positive for HIF1 α . HIF1 α displayed a predominant localization in macrophages and was always associated with a positive LXR α staining (Figure 7C). Interestingly, IL-1 β was also detected in these LXR α /HIF1 α positive regions. By contrast, neither HIF1 α nor IL-1 β staining was observed in healthy area of the arteries, while LXR α and CD68 staining was limited to a very low number of positive cells (Figure S10). Overall, our results indicate that the regulation of IL-1 β by the LXR α /HIF1 α axis is likely functional in human atherosclerotic lesions.

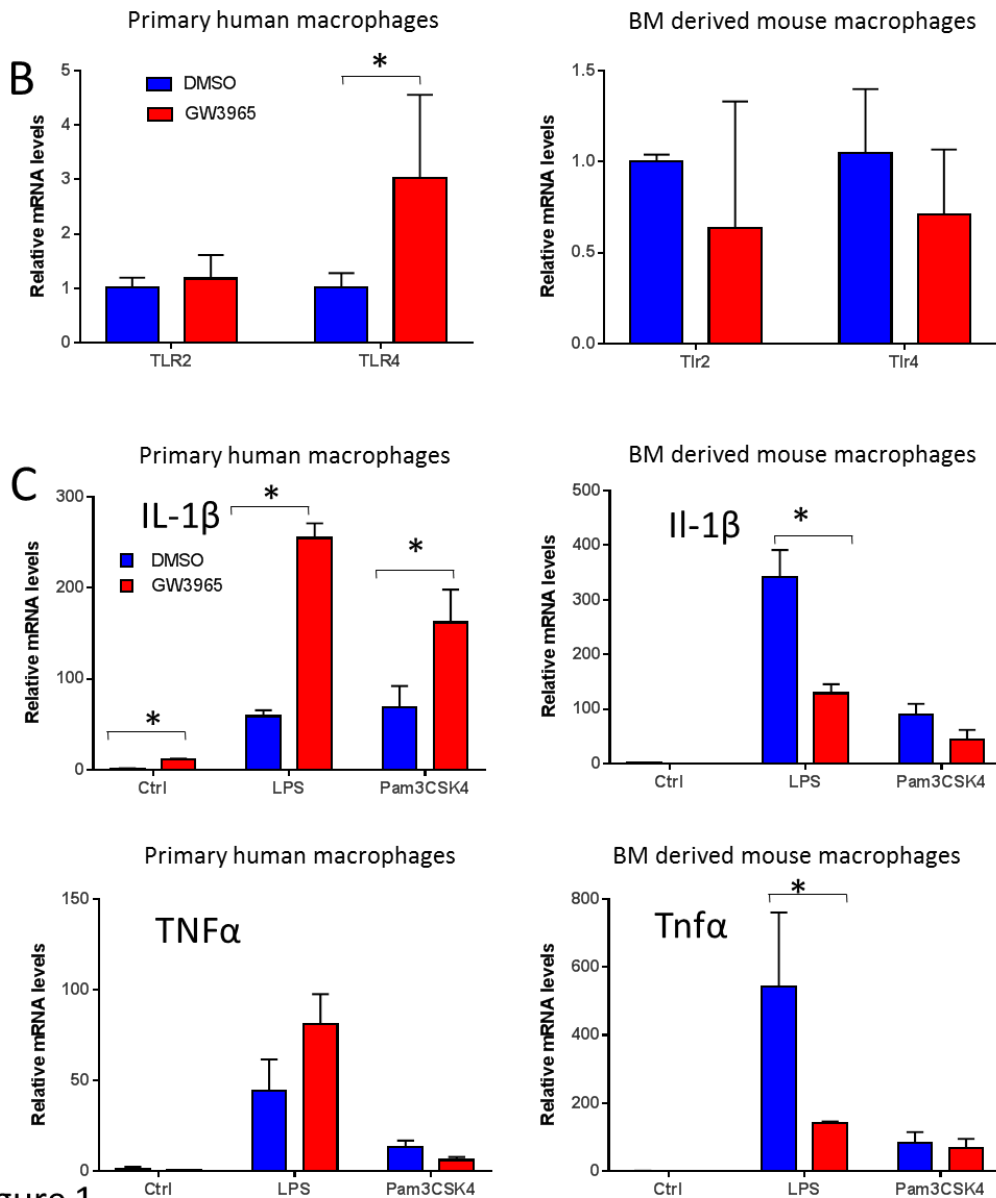
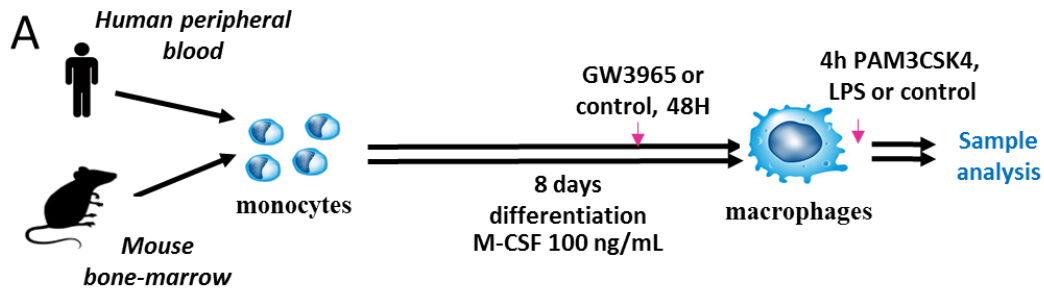


Figure 1

Figure 1: LXR activation differentially affects TLRs expression and cytokine response in human and mouse macrophages. (A) General strategy used for macrophage differentiation and stimulation. (B) Relative mRNA levels of TLR2 and TLR4 48h after GW3965 treatment without TLR activation. * $P < 0.05$ Vs DMSO, Student t test. (C) Relative mRNA levels of IL1 β and TNF α 4h after LPS or Pam3CSK4 stimulation. * $P < 0.05$ Vs DMSO, Student t test. Data are expressed as means \pm S.D.

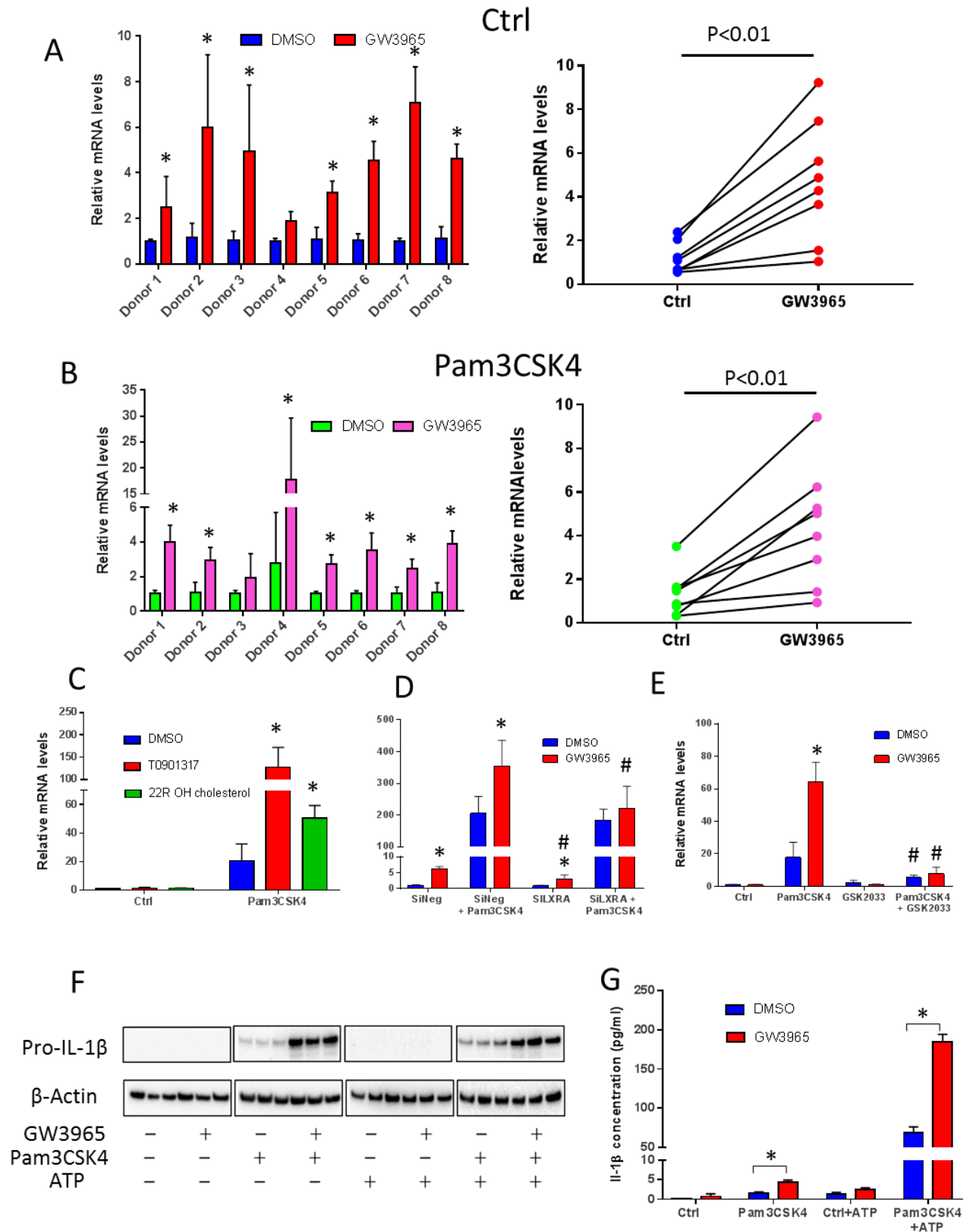
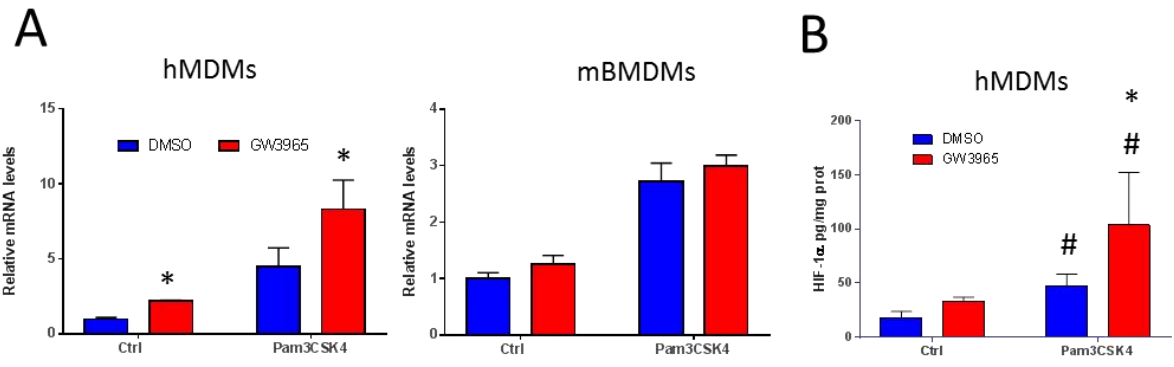


Figure 2

Figure 2: LXR activation increases IL-1 β production in human macrophages. (A) *IL1 β* mRNA levels in unstimulated macrophages treated or not with GW3965 for 48h. In the left panel data are normalized at 1 for each donor in the DMSO conditions *P<0.05 Vs DMSO, Student t test; In the right panel relative expression levels are calculated for each donor ** P<0.01, paired t test (B) *IL1 β* mRNA levels 4 hours after Pam3CSK4 stimulation, same representation. (C) Relative *IL1 β* mRNA levels in macrophages treated with different LXR agonists. *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions, 2 way anova, Sidak test. (D) Relative *IL1 β* mRNA levels in macrophages treated with negative or LXR α SiRNA. *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions, # P<0.05 Vs SiNeg same treatment and stimulation conditions, 2 way anova, Sidak test. (E) Relative *IL1 β* mRNA levels in macrophages treated with DMSO or the LXR antagonist GSK2033. *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions, # P<0.05 Vs no LXR antagonist same treatment and stimulation conditions, 2 way anova Sidak test. (F) Pro-IL-1 β protein levels analyzed by Western blot. β actin is used as loading control. Macrophages were differentiated and treated with GW3965 and/or Pam3CSK4 as described above and then they were stimulated or not with ATP (3mM) for 45 min before analysis (G) IL-1 β concentration in cell supernatants determined by ELISA *P<0.05 Vs DMSO, Student t test. Data are expressed as means \pm S.D.



C

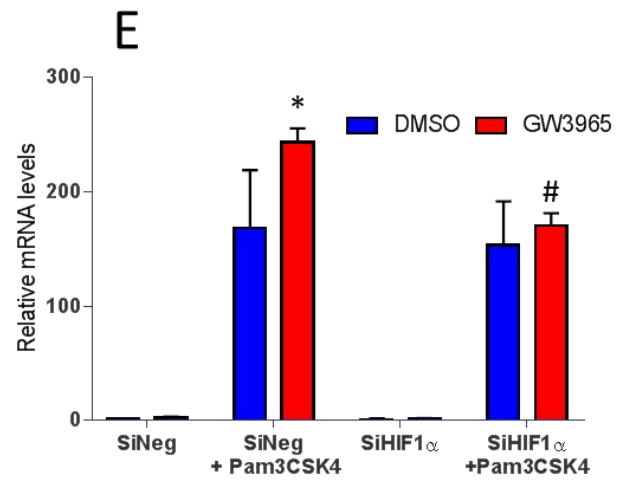
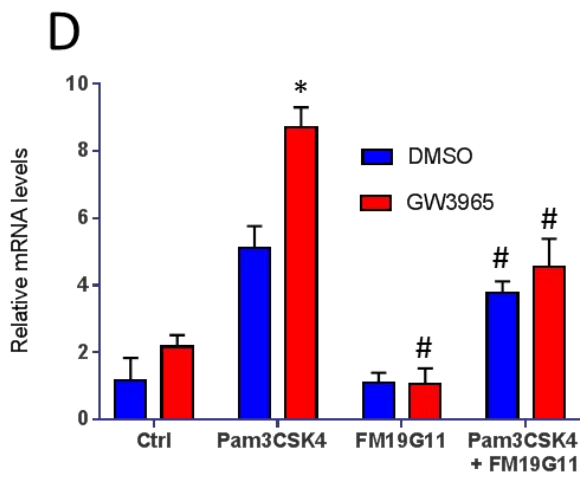
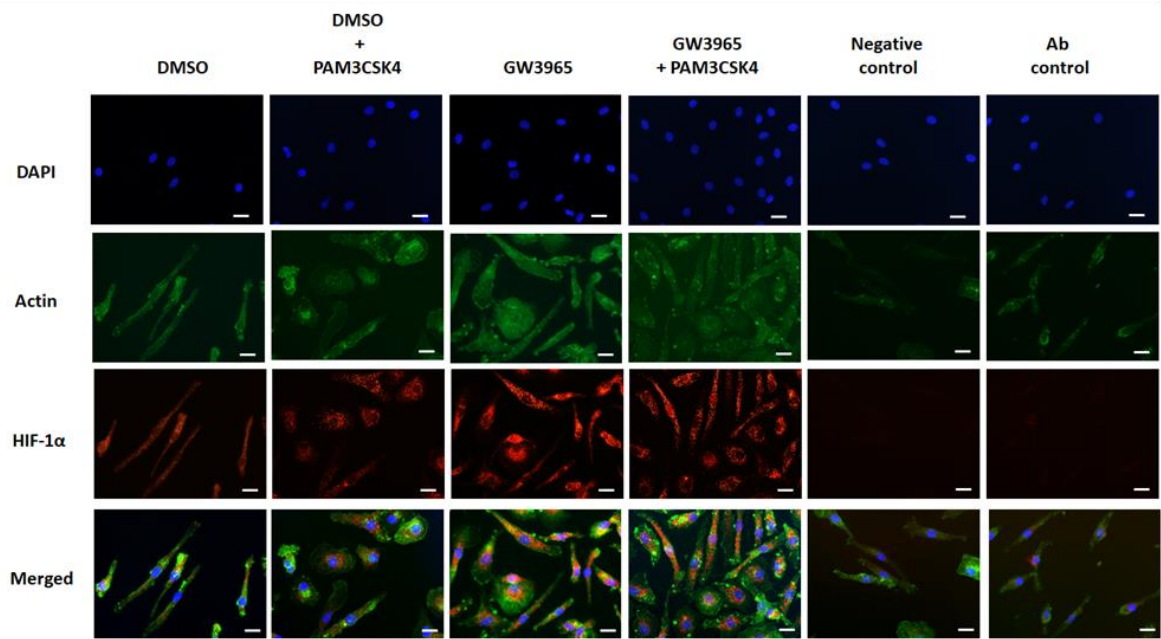


Figure 3

Figure 3: LXR-mediated HIF1 α induction increases IL-1 β expression. (A) *HIF1 α* mRNA levels. Human and mouse macrophages were treated or not with GW3965 at 1 μ M for 48h and were stimulated with Pam3CSK4 or a control treatment for 4h. *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions, 2 way anova, Sidak test. (B) HIF1 α protein concentration in cell lysates. Human macrophages were treated as described in (A) and HIF1 α protein levels were determined by ELISA. *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions, # P<0.05 Vs unstimulated macrophages with same LXR agonist or DMSO treatment. 2 way anova, Sidak test. (C) Representative immunostaining of HIF1 α (red). Nuclei are stained with DAPI and F-actin with phalloidin (green). Human macrophages were differentiated and treated as describe in (A) Magnification (50 μ m) is indicated on each picture. (D) Relative *IL1 β* mRNA levels in macrophages treated with DMSO or the HIF1 α inhibitor FM19G11. *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions, # P<0.05 Vs no HIF1 α inhibitor same treatment and stimulation conditions 2 way anova, Sidak test. (E) Relative *IL1 β* mRNA levels in macrophages treated with negative or *HIF1 α* SiRNA. Human macrophages were differentiated and treated as describe in (A). *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions, # P<0.05 Vs SiNeg same treatment and same stimulation conditions. 2 way anova, Sidak test

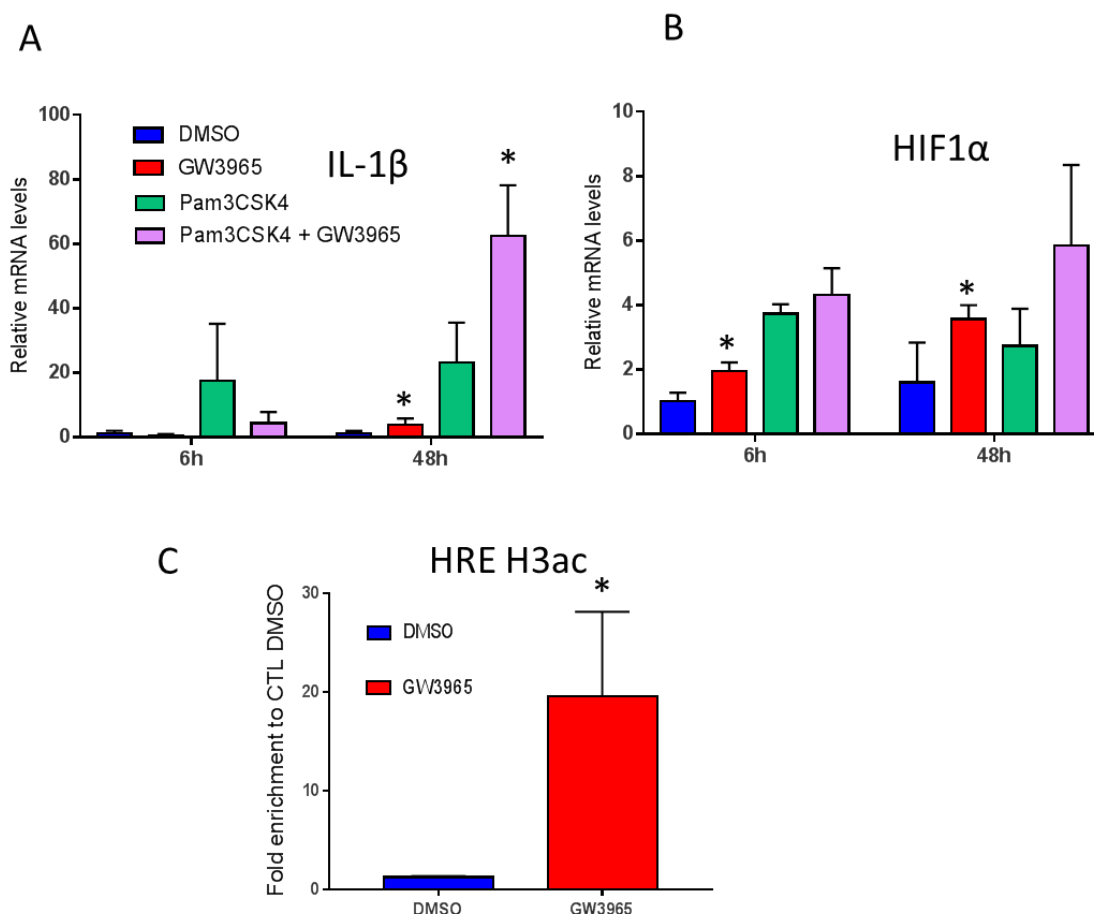


Figure 4

Figure 4: Induction of HIF1 α by LXR agonists precedes IL-1 β activation. (A) Relative *IL1 β* and *HIF1 α* mRNA levels. Differentiated macrophages were treated with GW3965 at 1 μ M for 6h or 48h before Pam3CSK4 stimulation for 4h. *P<0.05 Vs DMSO same stimulation conditions and same time point. 2 way anova, Sidak test. (B) Relative enrichment in histone 3 acetylation near hypoxia responsive element of the *IL1 β* promoter. Chromatin immunoprecipitation followed by real time PCR. Differentiated macrophages were treated w/ or w/o GW3965 at 1 μ M for 48h. *P<0.05 Vs DMSO, Student t test.

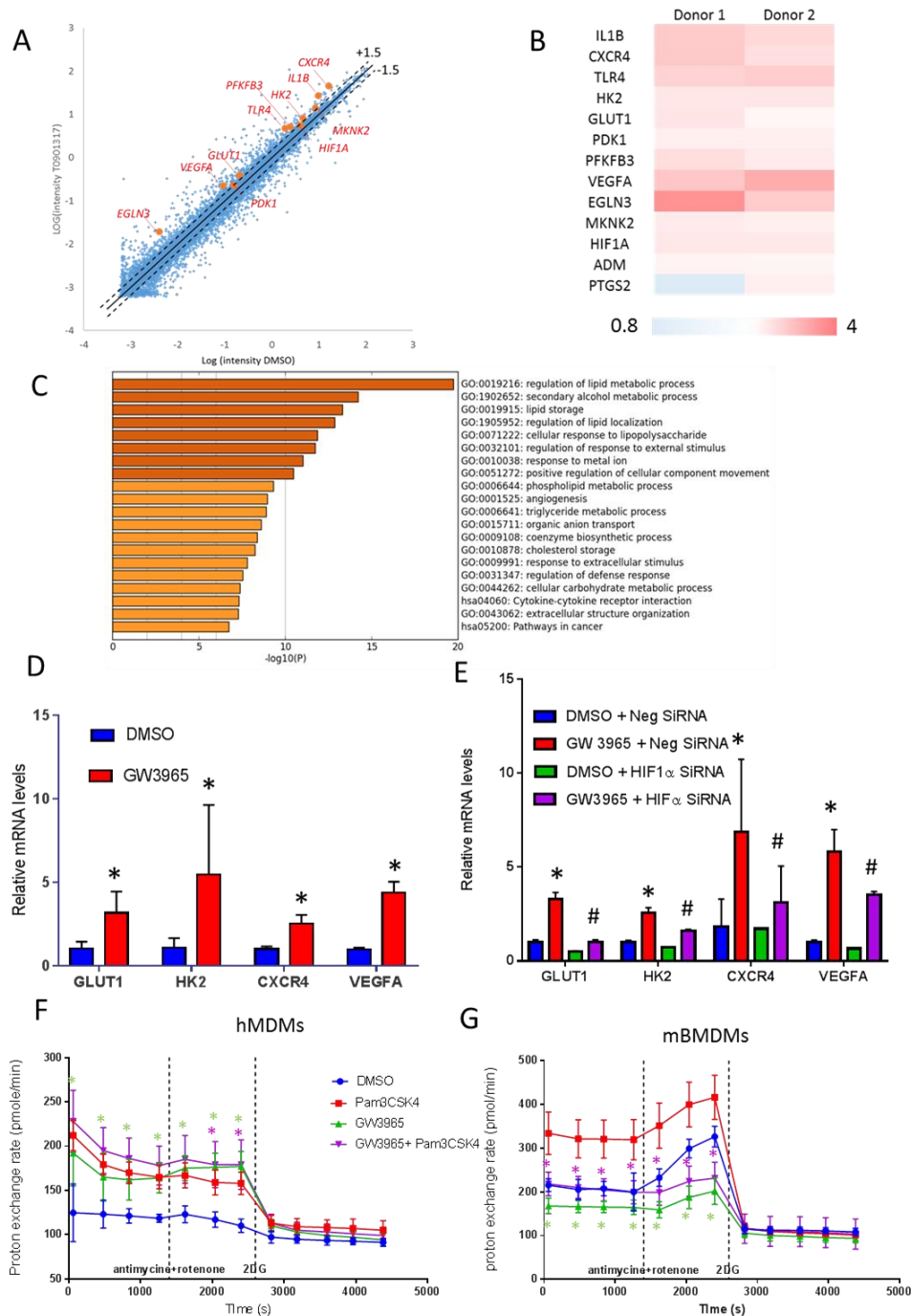


Figure 5

Figure 5: LXRs activate other HIF1 α dependent pathways (A) Representative scatter plots for up- and down-regulated genes in human monocytes treated with T0901317 (10 μ M) for 48h. Representative HIF1 α target genes are highlighted in red. Dot lines represent \pm 1.5 fold changes as compared to DMSO treated cells (B) Heat map for key HIF1 α target genes compared with DMSO-treated monocytes from two independent donors. (C) GO term analysis of up-regulated genes according to Metascape analysis. (D) mRNA levels of HIF1 α target genes in primary macrophages treated or not for 48h with GW3965 at 1 μ M. * $P < 0.05$ Vs DMSO, Student t test. (E) mRNA levels of HIF1 α target genes in Pam3CSK4-stimulated macrophages transfected with negative or HIF1 α SiRNA. * $P < 0.05$ Vs DMSO same stimulation conditions., # $P < 0.05$ Vs SiNeg same treatment and stimulation conditions, 2 way anova, Sidak test. (F,G) Proton exchange rate recording of human (F) and mouse (G) macrophages treated as described above. * $P < 0.05$ Vs DMSO same stimulation conditions. 2 way anova, Sidak test.

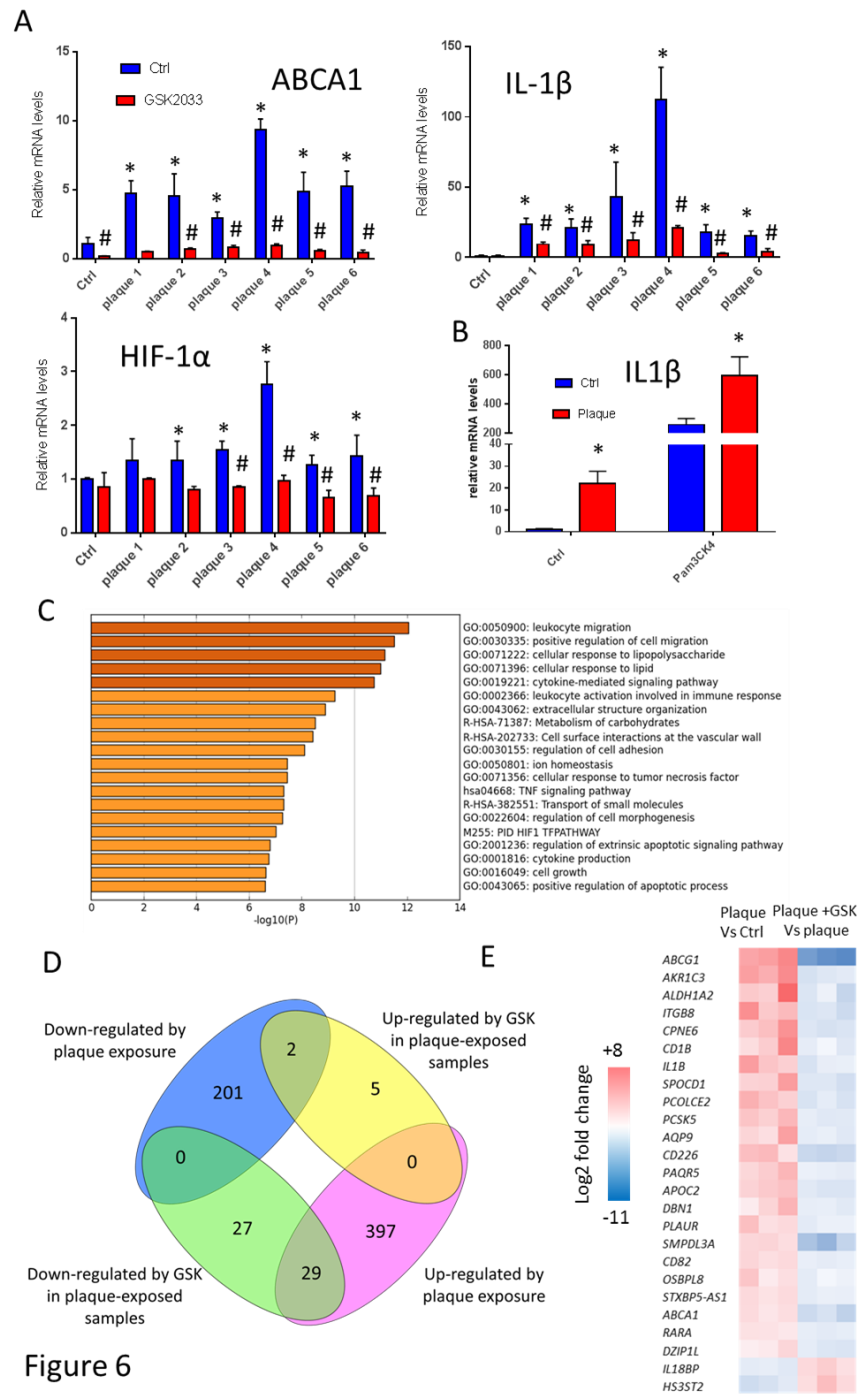


Figure 6

Figure 6: Atheroma plaque homogenates activate IL-1 β through an LXR dependent mechanism. (A) mRNA levels of target genes in macrophages treated with atheroma plaques homogenates with or without the LXR antagonist GSK2033 for 48h. *P<0.05 Vs Ctrl ; #P<0.05 Vs no GSK2033 same plaque samples, 2 way anova, Fisher test. (B) *IL1 β* mRNA levels in macrophages treated for 48h with or without plaque homogenates before Pam3CSK4 activation (4h). *P<0.05 Vs w/o plaque extract. (C) GO term analysis of up-regulated genes after 48h exposure to plaques homogenates according to metascap analysis. (D) Venn diagram of differentially expressed genes in plaque exposed group VS plaque + GSK exposed group. (E) Heatmap of differentially expressed genes in plaque-exposed group Vs plaque + GSK2033. Only differentially expressed genes in both conditions (Plaque Vs Control and Plaque Vs plaque + GSK) are shown.

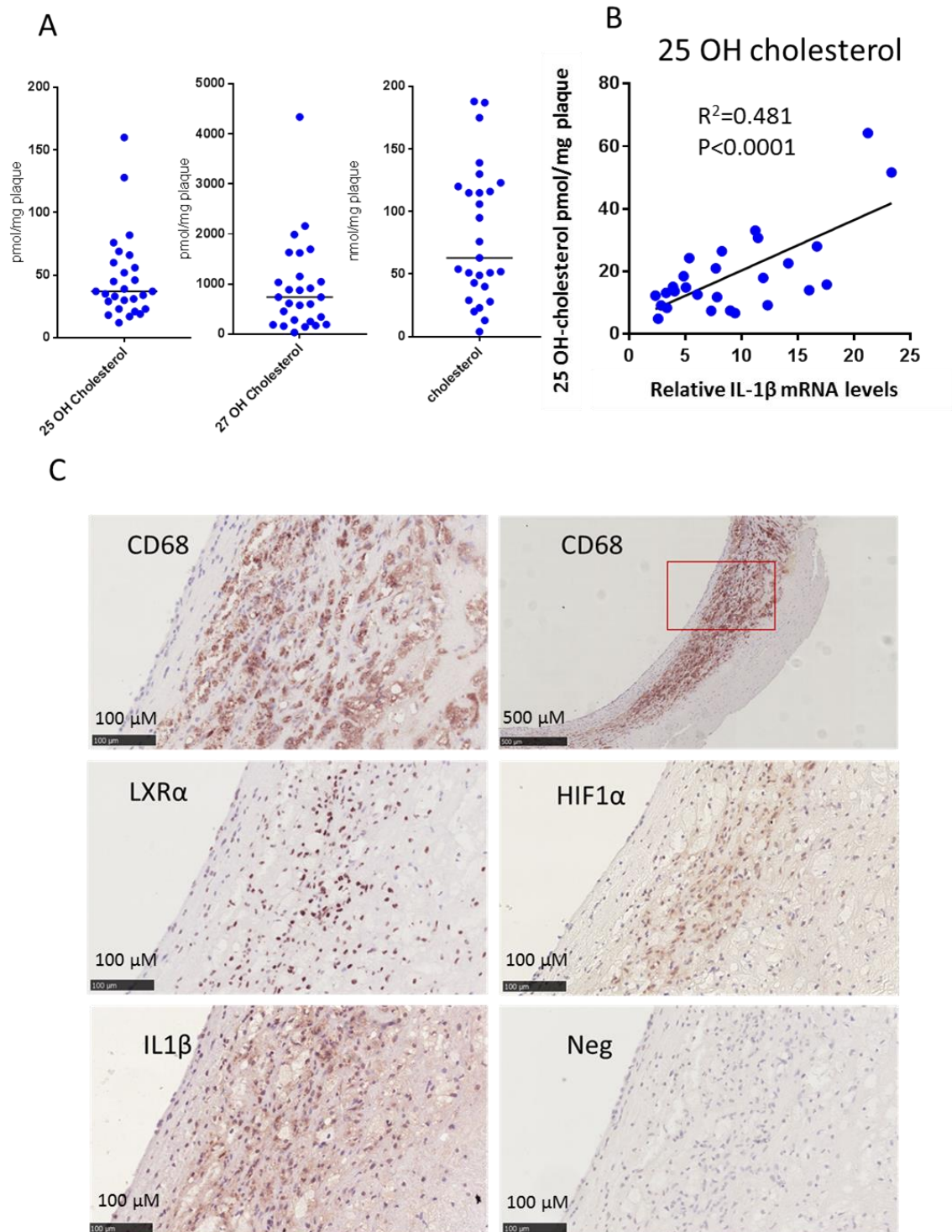


Figure 7

Figure 7: Oxysterol content of plaques correlates with IL-1 β induction and LXR α and HIF1 α colocalize with IL-1 β in macrophage-rich area of human atherosclerotic lesions from carotid arteries. A) Oxysterol content in human atheroma plaques (data are expressed as nmol/mg or pmol/mg of tissue). B) Correlation between 25-OH cholesterol levels and *IL1 β* mRNA levels in primary macrophages treated with same plaques homogenates (Pearson, two tailed). C) Representative immunohistochemical staining of serial sections of human carotid arteries (N = 7) for CD68, LXR α , HIF1 α , IL-1 β and negative control (without primary antibody).

Discussion:

This work highlights a new LXR-regulated pathway involved in the production of interleukin 1 β by human macrophages. Here, we demonstrate that activation of LXR induces the transcriptional regulation of the *IL1 β* gene through a HIF1 α -dependent mechanism. Activation of LXR coupled with the induction of TLR2 by Pam3CSK4 and ATP-mediated activation of inflammasome results in an increased secretion of mature IL-1 β by macrophages. Thus, our results disclose a novel mechanism by which cholesterol and oxysterols may trigger inflammation in atherosclerosis and open up new perspectives regarding the development of pharmacological LXR modulators to inhibit IL-1 β production.

Because of its prominent role in the development of atherosclerosis, IL-1 β production within the atheroma plaque represents an interesting target. Among others, two important players stand out to promote IL-1 β secretion: cholesterol accumulation and the conditions of partial hypoxia that are present in the atherosclerotic lesions^{259 260}. In particular, hypoxia seems to play a key role in the production of IL-1 β ; indeed, IL-1 β localizes preferentially with markers of hypoxia such as HK2 and HIF1 α within human atheroma plaques²⁶⁰. From a mechanistic standpoint, compared to cytokines such as TNF α , IL-1 β is a target of HIF1 α endowed with hypoxia response elements (HREs) in its gene promoter^{253 254}. At the post translational level, hypoxia increases the stability of pro-IL-1 β by selectively reducing its addressing to the autophagy machinery and also contributes to the activation of the inflammasome.²⁶⁰ On their side, cholesterol crystals activate inflammasome and play a major role in the secretion of mature IL-1 β in the context of atherosclerosis.²³⁹ Our results gather these two pathways and provide a new mechanism by which cholesterol accumulation within the plaque induces the production of IL-1 β . In a pathophysiological perspective, this work highlights the ability of atheroma plaque homogenates to activate IL-1 β in a LXR-dependent manner and the colocalization of LXR with HIF1 α and IL-1 β in macrophages-rich regions of atheroma plaques.

While we observed a robust induction of HIF1 α following LXR agonist treatment, the molecular basis of this mechanism needs to be further explored. An interaction between HIF1 α and LXR α in primary human macrophages as well as RAW 264.7 cells resulting in the activation of lipogenesis and foam cell formation was reported previously.²⁵⁵ The authors suggested that LXR α increases HIF1 α protein stability by interacting with the oxygen-dependent degradation domain of HIF1 α . Additionally, the transcriptional regulation of HIF1 α by LXR was ruled out in this study. However, the authors did not measure *HIF1 α*

mRNA levels in primary human macrophages following LXR activation. Therefore, this point remains debatable. Here, we undoubtedly demonstrated a parallel increase in *HIF1α* mRNA and protein levels in human macrophages exposed to LXR agonists. Moreover, we observed that the LXR-mediated induction in *HIF1α* mRNA and protein levels is restricted to human macrophages. We did not find any obvious LXR responsive elements at the vicinity of the *HIF1α* gene. Moreover, chromatin immunoprecipitation databases did not revealed any LXR binding peaks near the *HIF1α* gene.^{261 262} However these data have been obtained in THP-1 cells and not in primary human macrophages and *HIF1α* was not responsive to LXR agonist in THP-1 cells under our experimental conditions. While we cannot exclude a direct transcriptional regulation of *HIF1α* by LXR, other indirect mechanisms could be involved. Interestingly *HIF1α* is subject to autoregulation since human and mouse *HIF1α* genes possess a hypoxia responsive element (HRE) close to their core promoters; it was shown that this element is strongly regulated by CpG methylation in hematopoietic cells^{263 264}. Therefore, we might speculate that LXR activation could induce a post-translational stabilization of *HIF1α* (either by protein-protein interaction or by an LXR-mediated ROS production²⁴⁶) which could result in the activation of *HIF1α* gene through a feed forward mechanism.

Importantly, our results demonstrate that the LXR/*HIF1α* axis is not restricted to IL-1β. Indeed, other *HIF1α*-dependent metabolic pathways are significantly activated by LXR and display a similar human selectivity. Genes involved in glycolysis such as *GLUT1* and *HK2* are strongly induced by LXR in a *HIF1α*-dependent manner in human macrophages while LXR activation has almost no impact in murine macrophages. Similarly, it was recently reported a similar pattern in human versus murine macrophages exposed to steroidal and non-steroidal LXR agonists.²⁶⁵ Nevertheless, to the best of our knowledge, the present study reports for the first time a fundamental difference between human and murine macrophages regarding the metabolic response to LXR activation. This work stresses out that LXR agonists induce an opposite metabolic switch in human and murine macrophages, with a marked induction of glycolysis in human macrophages following LXR activation. It is established that some macrophage subpopulations present within the atheroma plaque display a high glucose uptake activity. Nevertheless, the molecular mechanisms as well as the pathophysiological significance of this high glucose influx remain unclear.^{266 267 268} Our results shed new lights on these points and suggest a potential role of LXRs and its activators (namely cholesterol accumulation) in the control of the metabolic activity of macrophages within the atheroma plaque.

The impact of LXR agonists on the inflammatory response of macrophages as well as the underlying molecular mechanisms remain controversial. One of the explanations certainly lies in the difference of the models and experimental protocols used among studies. Our results mainly confirm the data of the literature, namely an anti-inflammatory activity of LXR agonists in murine macrophages that is preserved in human macrophages in the context of short-term exposure to LXR agonists. However, LXR-mediated TLR4 induction in human macrophages is associated with a potentiation of the LPS response. Now, our study brings a new piece to the puzzle and discloses a novel mechanism linking LXR and inflammation that is independent of the TLR response. This mechanism, selective to IL-1 β , does not affect the expression of other cytokines such as TNF α .

Interestingly, the use of a synthetic LXR antagonist markedly attenuated the induction of *IL1 β* mRNA levels promoted by atheroma plaque homogenates, pointing to a new pharmacological way to inhibit IL-1 β production within the plaque. However, such molecules also strongly inhibit cholesterol efflux pathways and might lead to an increase in cholesterol accumulation in macrophages, which is likely to promote adverse effects on the long term.²⁶⁹ Since LXR-dependent induction of IL-1 β gene seems to differ from a direct transactivation, the identification of selective LXR modulators devoid of an activating effect on IL-1 β is a path that deserves to be explored. Development of such molecules could be hampered by well-known side effects, such as hepatic steatosis, which have precluded the clinical use of LXR agonists, despite their high therapeutic potential.^{270 271} Alternatively, the development of selective LXR antagonists inhibiting the LXR-HIF1 α axis without effects on LXR-cholesterol efflux pathways should be explored. Such molecules may hold great promises, given the central role of IL-1 β in the development of atherosclerosis.

Acknowledgments: We thanks the histology facility Cellimap, the flow cytometry facility and the lipidomic analytic platform for expert technical assistance.

Sources of funding: This work was supported by grants from the CHU Dijon, the Region Bourgogne-Franche Comté, the European Regional Development Fund, the University of Burgundy, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021 (LipSTIC Labex).

Disclosures: The authors have no conflict of interest to disclose

References

1. GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **390**, 1151–1210 (2017).
2. Barquera, S. *et al.* Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch. Med. Res.* **46**, 328–338 (2015).
3. Doll, R. & Hill, A. B. The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report. 1954. *BMJ* **328**, 1529–1533; discussion 1533 (2004).
4. Lewington, S. *et al.* Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* **360**, 1903–1913 (2002).
5. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration *et al.* Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* **376**, 1670–1681 (2010).
6. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* **302**, 412–423 (2009).
7. Rao Kondapally Seshasai, S. *et al.* Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N. Engl. J. Med.* **364**, 829–841 (2011).
8. Ray, K. K. *et al.* Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* **373**, 1765–1772 (2009).
9. Palmer, S. C. *et al.* Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **305**, 1119–1127 (2011).

10. Kono, K. *et al.* Composition and plaque patterns of coronary culprit lesions and clinical characteristics of patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* **82**, 344–351 (2012).
11. Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J. & Lewington, S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ. Res.* **118**, 535–546 (2016).
12. Tabas, I., García-Cardena, G. & Owens, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell Biol.* **209**, 13–22 (2015).
13. Kim, J. M. *et al.* Mechanism of Ang II involvement in activation of NF- κ B through phosphorylation of p65 during aging. *Age (Dordr)* **34**, 11–25 (2012).
14. Tabas, I., Williams, K. J. & Borén, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* **116**, 1832–1844 (2007).
15. Dai, G. *et al.* Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14871–14876 (2004).
16. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2045–2051 (2012).
17. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q. & Papayannopoulos, V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* **349**, 316–320 (2015).
18. Robbins, C. S. *et al.* Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* **19**, 1166–1172 (2013).

19. Gu, L. *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**, 275–281 (1998).
20. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
21. Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G. K. & Yan, Z. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* **105**, 1158–1161 (2002).
22. Wang, Y., Wang, G. Z., Rabinovitch, P. S. & Tabas, I. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in macrophages. *Circ. Res.* **114**, 421–433 (2014).
23. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)* **214**, 33–50 (2015).
24. Hermansson, A. *et al.* Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J. Exp. Med.* **207**, 1081–1093 (2010).
25. Hansson, G. K., Libby, P. & Tabas, I. Inflammation and plaque vulnerability. *J. Intern. Med.* **278**, 483–493 (2015).
26. Miteva, K., Madonna, R., De Caterina, R. & Van Linthout, S. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* (2018). doi:10.1016/j.vph.2018.04.006
27. Gautier, E. L. *et al.* Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation* **119**, 2367–2375 (2009).
28. Ait-Oufella, H. *et al.* Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* **12**, 178–180 (2006).
29. Subramanian, M., Thorp, E., Hansson, G. K. & Tabas, I. Treg-mediated suppression of atherosclerosis requires MYD88 signaling in DCs. *J. Clin. Invest.* **123**, 179–188 (2013).

30. Butcher, M. J. *et al.* Atherosclerosis-Driven Treg Plasticity Results in Formation of a Dysfunctional Subset of Plastic IFN γ + Th1/Tregs. *Circ. Res.* **119**, 1190–1203 (2016).
31. Engelbertsen, D. *et al.* T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 637–644 (2013).
32. Kyaw, T. *et al.* B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* **109**, 830–840 (2011).
33. Binder, C. J. *et al.* The role of natural antibodies in atherogenesis. *J. Lipid Res.* **46**, 1353–1363 (2005).
34. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
35. Myoishi, M. *et al.* Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* **116**, 1226–1233 (2007).
36. Dorweiler, B., Grechowa, I., Wallrath, A., Vahl, C. F. & Horke, S. Activation of the proapoptotic unfolded protein response in plaques of the human carotid artery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **48**, 248–257 (2014).
37. Garbin, U. *et al.* Expansion of necrotic core and shedding of MERTK receptor in human carotid plaques: a role for oxidized polyunsaturated fatty acids? *Cardiovasc. Res.* **97**, 125–133 (2013).
38. Libby, P. Collagenases and cracks in the plaque. *J. Clin. Invest.* **123**, 3201–3203 (2013).
39. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 125–138 (2008).
40. Slijkhuis, W., Mali, W. & Appelman, Y. A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis. *Neth Heart J* **17**, 140–144 (2009).

41. McMillan, G. C. Historical review of research on atherosclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **369**, 1–6 (1995).
42. Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr. Rev.* **47**, 23–25 (1989).
43. Finking, G. & Hanke, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* **135**, 1–7 (1997).
44. Kannel, W. B., Dawber, T. R., Kagan, A., Revotskie, N. & Stokes, J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **55**, 33–50 (1961).
45. Anderson, K. M., Castelli, W. P. & Levy, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* **257**, 2176–2180 (1987).
46. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* **62**, 707–714 (1977).
47. Castelli, W. P., Abbott, R. D. & McNamara, P. M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation* **67**, 730–734 (1983).
48. Wilson, P. W. *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837–1847 (1998).
49. Tsao, C. W. & Vasan, R. S. Cohort Profile: The Framingham Heart Study (FHS): overview of milestones in cardiovascular epidemiology. *Int J Epidemiol* **44**, 1800–1813 (2015).

50. Teslovich, T. M. *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **466**, 707–713 (2010).
51. Kathiresan, S. *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**, 56–65 (2009).
52. Ahangari, N., Ghayour Mobarhan, M., Sahebkar, A. & Pasdar, A. Molecular aspects of hypercholesterolemia treatment: current perspectives and hopes. *Ann. Med.* **50**, 303–311 (2018).
53. Benn, M., Watts, G. F., Tybjaerg-Hansen, A. & Nordestgaard, B. G. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur. Heart J.* **37**, 1384–1394 (2016).
54. Röhrl, C. & Stangl, H. Cholesterol metabolism-physiological regulation and pathophysiological deregulation by the endoplasmic reticulum. *Wien Med Wochenschr* (2018). doi:10.1007/s10354-018-0626-2
55. Okazaki, S. *et al.* Early statin treatment in patients with acute coronary syndrome: demonstration of the beneficial effect on atherosclerotic lesions by serial volumetric intravascular ultrasound analysis during half a year after coronary event: the ESTABLISH Study. *Circulation* **110**, 1061–1068 (2004).
56. Puri, R. *et al.* Non-HDL Cholesterol and Triglycerides: Implications for Coronary Atheroma Progression and Clinical Events. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2220–2228 (2016).
57. Maron, D. J., Fazio, S. & Linton, M. F. Current perspectives on statins. *Circulation* **101**, 207–213 (2000).

58. Nissen, S. E. *et al.* Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* **295**, 1556–1565 (2006).
59. Tang, X. *et al.* The effect of statin therapy on plaque regression following acute coronary syndrome: a meta-analysis of prospective trials. *Coron. Artery Dis.* **27**, 636–649 (2016).
60. Stone, N. J. Reducing residual risk in secondary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* **125**, 1958–1960 (2012).
61. Stone, N. J., Robinson, J. G. & Lichtenstein, A. The new cholesterol treatment guidelines. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1957 (2014).
62. Vavlukis, M. & Vavlukis, A. Adding ezetimibe to statin therapy: latest evidence and clinical implications. *Drugs Context* **7**, 212534 (2018).
63. Cannon, C. P. *et al.* Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2387–2397 (2015).
64. Tsujita, K. *et al.* Impact of Dual Lipid-Lowering Strategy With Ezetimibe and Atorvastatin on Coronary Plaque Regression in Patients With Percutaneous Coronary Intervention: The Multicenter Randomized Controlled PRECISE-IVUS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 495–507 (2015).
65. Lo Surdo, P. *et al.* Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* **12**, 1300–1305 (2011).
66. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H. & Hobbs, H. H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272 (2006).
67. Nicholls, S. J. *et al.* Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA* **316**, 2373–2384 (2016).

68. Libby, P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1225–1228 (2005).
69. Berk, B. C., Weintraub, W. S. & Alexander, R. W. Elevation of C-reactive protein in 'active' coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **65**, 168–172 (1990).
70. Liuzzo, G. *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N. Engl. J. Med.* **331**, 417–424 (1994).
71. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* **375**, 132–140 (2010).
72. Libby, P., Ridker, P. M., Hansson, G. K. & Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 2129–2138 (2009).
73. Ridker, P. M. *et al.* Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2195–2207 (2008).
74. Ridker, P. M. *et al.* Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* **98**, 839–844 (1998).
75. Ridker, P. M. *et al.* Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1959–1965 (2001).
76. Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F. & Rawlings, R. R. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 950–962 (2011).

77. Ishibashi, M. *et al.* Liver X Receptor Regulates Arachidonic Acid Distribution and Eicosanoid Release in Human Macrophages: A Key Role for Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2013). doi:10.1161/ATVBAHA.112.300812
78. Innes, J. K. & Calder, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **132**, 41–48 (2018).
79. Kralisch, S. & Fasshauer, M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* **56**, 10–21 (2013).
80. Rubinow, K. B. *et al.* Acyl-CoA synthetase 1 is induced by Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide and is required for phospholipid turnover in stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* **288**, 9957–9970 (2013).
81. Kanter, J. E., Tang, C., Oram, J. F. & Bornfeldt, K. E. Acyl-CoA synthetase 1 is required for oleate and linoleate mediated inhibition of cholesterol efflux through ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 358–364 (2012).
82. Cyrus, T., Yao, Y., Ding, T., Dogné, J. M. & Praticò, D. A novel thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor, BM-573, reduces development and progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* **561**, 105–111 (2007).
83. Gabrielsen, A. *et al.* Thromboxane synthase expression and thromboxane A2 production in the atherosclerotic lesion. *J. Mol. Med.* **88**, 795–806 (2010).
84. Bäck, M., Sultan, A., Ovchinnikova, O. & Hansson, G. K. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ. Res.* **100**, 946–949 (2007).

85. Helgadottir, A. *et al.* The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat. Genet.* **36**, 233–239 (2004).
86. Bäck, M. *et al.* Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17501–17506 (2005).
87. Waddington, E., Sienuarine, K., Puddey, I. & Croft, K. Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **292**, 234–244 (2001).
88. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 36–46 (2010).
89. Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=resolvin+D1+limits+5-lipoxyg%C3%A9nase+fredman>. (Accessed: 18th November 2017)
90. Chatterjee, A. *et al.* Biosynthesis of proresolving lipid mediators by vascular cells and tissues. *FASEB J.* **31**, 3393–3402 (2017).
91. Wu, B., Mottola, G., Schaller, M., Upchurch, G. R. & Conte, M. S. Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications. *Mol. Aspects Med.* **58**, 72–82 (2017).
92. Circulating inflammation-resolving lipid mediators RvD1 and DHA are decreased in patients with acutely symptomatic carotid disease. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=circulating+inflammation-resolving+lipid+mediator+RvD1+and+DHA+are+decreased+in+patients>. (Accessed: 18th November 2017)

93. Fredman, G. *et al.* An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat Commun* **7**, 12859 (2016).
94. Bazan, H. A. *et al.* Diminished omega-3 fatty acids are associated with carotid plaques from neurologically symptomatic patients: Implications for carotid interventions. *Vascul. Pharmacol.* **51**, 331–336 (2009).
95. Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**, 1003–1018 (2013).
96. Bujak, M. *et al.* Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* **173**, 57–67 (2008).
97. Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
98. Grebe, A., Hoss, F. & Latz, E. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circulation Research* **122**, 1722–1740 (2018).
99. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
100. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **21**, 677–687 (2015).
101. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
102. Karasawa, T. & Takahashi, M. The crystal-induced activation of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *Inflamm Regen* **37**, 18 (2017).
103. Baroja-Mazo, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* **15**, 738–748 (2014).

104. Isoda, K. *et al.* Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1068–1073 (2004).
105. Elhage, R. *et al.* Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **97**, 242–244 (1998).
106. Devlin, C. M., Kuriakose, G., Hirsch, E. & Tabas, I. Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6280–6285 (2002).
107. Isoda, K. *et al.* Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation* **108**, 516–518 (2003).
108. Chamberlain, J. *et al.* Interleukin-1beta and signaling of interleukin-1 in vascular wall and circulating cells modulates the extent of neointima formation in mice. *Am. J. Pathol.* **168**, 1396–1403 (2006).
109. Chamberlain, J., Gunn, J., Francis, S., Holt, C. & Crossman, D. Temporal and spatial distribution of interleukin-1 beta in balloon injured porcine coronary arteries. *Cardiovasc. Res.* **44**, 156–165 (1999).
110. Kirii, H. *et al.* Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 656–660 (2003).
111. Bhaskar, V. *et al.* Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **216**, 313–320 (2011).
112. Gage, J., Hasu, M., Thabet, M. & Whitman, S. C. Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Can J Cardiol* **28**, 222–229 (2012).

113. Zheng, F., Xing, S., Gong, Z., Mu, W. & Xing, Q. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm.* **2014**, 507208 (2014).
114. Guillén, I., Blanes, M., Gómez-Lechón, M. J. & Castell, J. V. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am. J. Physiol.* **269**, R229-235 (1995).
115. Galea, J. *et al.* Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1000–1006 (1996).
116. Dewberry, R., Holden, H., Crossman, D. & Francis, S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2394–2400 (2000).
117. Patti, G. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist: a sensitive marker of instability in patients with coronary artery disease. *J. Thromb. Thrombolysis* **14**, 139–143 (2002).
118. Kastrati, A. *et al.* Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 2168–2173 (2000).
119. Shi, X., Xie, W.-L., Kong, W.-W., Chen, D. & Qu, P. Expression of the NLRP3 Inflammasome in Carotid Atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **24**, 2455–2466 (2015).
120. Afrasyab, A. *et al.* Correlation of NLRP3 with severity and prognosis of coronary atherosclerosis in acute coronary syndrome patients. *Heart Vessels* **31**, 1218–1229 (2016).
121. Portincasa, P. Colchicine, Biologic Agents and More for the Treatment of Familial Mediterranean Fever. The Old, the New, and the Rare. *Curr. Med. Chem.* **23**, 60–86 (2016).

122. Emmi, G. *et al.* Use of Interleukin-1 Blockers in Pericardial and Cardiovascular Diseases. *Curr Cardiol Rep* **20**, 61 (2018).
123. Moriya, J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol* (2018). doi:10.1016/j.jjcc.2018.05.010
124. Kendrick, J. *et al.* Effect of lovastatin on primary prevention of cardiovascular events in mild CKD and kidney function loss: a post hoc analysis of the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *Am. J. Kidney Dis.* **55**, 42–49 (2010).
125. Ridker, P. M. *et al.* Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet* **391**, 319–328 (2018).
126. Kleveland, O. *et al.* Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur. Heart J.* **37**, 2406–2413 (2016).
127. Hong, D. S. *et al.* MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 α in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol.* **15**, 656–666 (2014).
128. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 104–116 (2015).
129. Yvan-Charvet, L. *et al.* Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* **118**, 1837–1847 (2008).

130. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* **11**, 155–161 (2010).
131. Björkbacka, H. *et al.* Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat. Med.* **10**, 416–421 (2004).
132. Venteclef, N. *et al.* GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRBeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* **24**, 381–395 (2010).
133. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* **25**, 57–70 (2007).
134. Rosenson, R. S. *et al.* Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* **125**, 1905–1919 (2012).
135. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. The acute phase response inhibits reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **51**, 682–684 (2010).
136. Sherer, Y. & Shoenfeld, Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**, 99–106 (2006).
137. McGillicuddy, F. C. *et al.* Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* **119**, 1135–1145 (2009).
138. Shao, B. *et al.* Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase. *Circ. Res.* **114**, 1733–1742 (2014).
139. Huang, Y. *et al.* An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nat. Med.* **20**, 193–203 (2014).

140. Coller, B. S. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 658–670 (2005).
141. Westerterp, M. *et al.* ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ. Res.* **114**, 157–170 (2014).
142. Ganjali, S. *et al.* Monocyte-to-HDL-cholesterol ratio as a prognostic marker in cardiovascular diseases. *J. Cell. Physiol.* (2018). doi:10.1002/jcp.27028
143. Tolani, S. *et al.* Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic stem cell proliferation and monocytosis: studies in mice and FH children. *Atherosclerosis* **229**, 79–85 (2013).
144. van Kampen, E., Jaminon, A., van Berkel, T. J. C. & Van Eck, M. Diet-induced (epigenetic) changes in bone marrow augment atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 833–841 (2014).
145. Willy, P. J. *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* **9**, 1033–1045 (1995).
146. Apfel, R. *et al.* A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7025–7035 (1994).
147. Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 459–481 (2000).
148. Auboeuf, D. *et al.* Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 1319–1327 (1997).

149. Chen, M., Beaven, S. & Tontonoz, P. Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J. Lipid Res.* **46**, 2570–2579 (2005).
150. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**, 1866–1870 (2001).
151. Wiebel, F. F. & Gustafsson, J. A. Heterodimeric interaction between retinoid X receptor alpha and orphan nuclear receptor OR1 reveals dimerization-induced activation as a novel mechanism of nuclear receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3977–3986 (1997).
152. Edwards, P. A., Kennedy, M. A. & Mak, P. A. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 249–256 (2002).
153. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728–731 (1996).
154. Hiebl, V., Ladurner, A., Latkolik, S. & Dirsch, V. M. Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnol. Adv.* (2018). doi:10.1016/j.biotechadv.2018.03.003
155. Gabbi, C., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å. Action mechanisms of Liver X Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 647–650 (2014).
156. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121–141 (2000).

157. Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K. & Beltowski, J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **61**, 736–759 (2007).
158. Lehmann, J. M. *et al.* Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 3137–3140 (1997).
159. Yang, C. *et al.* Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **281**, 27816–27826 (2006).
160. Fu, X. *et al.* 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 38378–38387 (2001).
161. Björkhem, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J. Clin. Invest.* **110**, 725–730 (2002).
162. Leonarduzzi, G., Sottero, B. & Poli, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.* **13**, 700–710 (2002).
163. Schroepfer, G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
164. Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A. & Saez, E. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* **581**, 1721–1726 (2007).
165. Houck, K. A. *et al.* T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab.* **83**, 184–187 (2004).
166. Ou, J. *et al.* Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6027–6032 (2001).

167. Yoshikawa, T. *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem.* **277**, 1705–1711 (2002).
168. Forman, B. M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G. J. & Evans, R. M. The orphan nuclear receptor LXRA is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10588–10593 (1997).
169. Berrodin, T. J. *et al.* Identification of 5 α , 6 α -epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity. *Mol. Pharmacol.* **78**, 1046–1058 (2010).
170. Thomas, J. *et al.* A chemical switch regulates fibrate specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) versus liver X receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 2403–2410 (2003).
171. Chinetti, G. *et al.* PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* **7**, 53–58 (2001).
172. Forcheron, F., Cachefo, A., Thevenon, S., Pinteur, C. & Beylot, M. Mechanisms of the triglyceride- and cholesterol-lowering effect of fenofibrate in hyperlipidemic type 2 diabetic patients. *Diabetes* **51**, 3486–3491 (2002).
173. Laffitte, B. A. *et al.* Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7558–7568 (2001).
174. Jiang, W. *et al.* Inhibition of LXRA signaling by vitamin D receptor: possible role of VDR in bile acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 176–184 (2006).
175. Chiang, J. Y., Kimmel, R. & Stroup, D. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRA). *Gene* **262**, 257–265 (2001).

176. Tobin, K. A. R. *et al.* Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 10691–10697 (2002).
177. Lundholm, L. *et al.* Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J. Mol. Endocrinol.* **32**, 879–892 (2004).
178. Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L. & von Eckardstein, A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 655–666 (2006).
179. Tontonoz, P. Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 129–137 (2011).
180. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 28240–28245 (2000).
181. Kennedy, M. A. *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* **1**, 121–131 (2005).
182. Brunham, L. R. *et al.* Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ. Res.* **99**, 672–674 (2006).
183. Wang, M.-D. *et al.* Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways. *J. Lipid Res.* **48**, 633–645 (2007).
184. Rigamonti, E. *et al.* Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ. Res.* **97**, 682–689 (2005).
185. Laffitte, B. A. *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 507–512 (2001).

186. Mak, P. A. *et al.* Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 31900–31908 (2002).
187. Cao, G. *et al.* Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**, 39561–39565 (2002).
188. Laffitte, B. A. *et al.* The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2182–2191 (2003).
189. Masson, D. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse. *J. Lipid Res.* **45**, 543–550 (2004).
190. Goodwin, B. *et al.* Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* **17**, 386–394 (2003).
191. Verreault, M. *et al.* The liver X-receptor alpha controls hepatic expression of the human bile acid-glucuronidating UGT1A3 enzyme in human cells and transgenic mice. *Hepatology* **44**, 368–378 (2006).
192. Repa, J. J. *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–18800 (2002).
193. Back, S. S. *et al.* Cooperative transcriptional activation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 genes by nuclear receptors including Liver-X-Receptor. *BMB Rep* **46**, 322–327 (2013).
194. Yu, L. *et al.* Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* **278**, 15565–15570 (2003).

195. Duval, C. *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1259–1263 (2006).
196. Ahn, S. B., Jun, D. W., Jang, K., Lee, B. H. & Shin, K. J. Duodenal Niemann-Pick C1-like 1 expression was negatively correlated with liver X receptor expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J. Intern. Med.* (2018). doi:10.3904/kjim.2017.100
197. Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A. & Brown, M. S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35–46 (2006).
198. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjan, R. & Tontonoz, P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* **325**, 100–104 (2009).
199. Ulven, S. M., Dalen, K. T., Gustafsson, J.-A. & Nebb, H. I. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **73**, 59–63 (2005).
200. Shimano, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* **40**, 439–452 (2001).
201. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W. C. & Ntambi, J. M. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6786–6798 (2006).
202. Joseph, S. B. *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 11019–11025 (2002).
203. Cha, J.-Y. & Repa, J. J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* **282**, 743–751 (2007).

204. Hegarty, B. D. *et al.* Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 791–796 (2005).
205. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–2838 (2000).
206. Kirchgessner, T. G. *et al.* Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **24**, 223–233 (2016).
207. Ito, A. *et al.* LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife* **4**, e08009 (2015).
208. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
209. Castrillo, A., Joseph, S. B., Marathe, C., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* **278**, 10443–10449 (2003).
210. Fontaine, C. *et al.* Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ. Res.* **101**, 40–49 (2007).
211. Reis e Sousa, C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* **16**, 27–34 (2004).
212. Töröcsik, D. *et al.* Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J. Immunol.* **184**, 5456–5465 (2010).
213. Go, A. S. *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **129**, 399–410 (2014).

214. Bornfeldt, K. E. & Tabas, I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.* **14**, 575–585 (2011).
215. Bradshaw, E. M. *et al.* Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J. Immunol.* **183**, 4432–4439 (2009).
216. Litherland, S. A. *et al.* Aberrant monocyte prostaglandin synthase 2 (PGS2) expression in type 1 diabetes before and after disease onset. *Pediatr Diabetes* **4**, 10–18 (2003).
217. Shanmugam, N., Kim, Y. S., Lanting, L. & Natarajan, R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* **278**, 34834–34844 (2003).
218. Cipollone, F. *et al.* The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* **108**, 1070–1077 (2003).
219. Kanter, J. E. *et al.* Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E715-724 (2012).
220. Koehrer, P. *et al.* Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy. *PLoS ONE* **9**, e106912 (2014).
221. Denimal, D. *et al.* Significant abnormalities of the HDL phosphosphingolipidome in type 1 diabetes despite normal HDL cholesterol concentration. *Atherosclerosis* **241**, 752–760 (2015).
222. Burke, A. P. *et al.* Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1266–1271 (2004).

223. Moreno, P. R. *et al.* Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* **102**, 2180–2184 (2000).
224. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* **111**, 6130–6185 (2011).
225. Barber, M. N. *et al.* Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLoS ONE* **7**, e41456 (2012).
226. Croset, M., Brossard, N., Polette, A. & Lagarde, M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem. J.* **345 Pt 1**, 61–67 (2000).
227. Okudaira, M. *et al.* Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. *J. Lipid Res.* **55**, 2178–2192 (2014).
228. Kazachkov, M., Chen, Q., Wang, L. & Zou, J. Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids* **43**, 895–902 (2008).
229. Shiu, S. W. M., Tan, K. C. B., Huang, Y. & Wong, Y. Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. *Atherosclerosis* **198**, 441–447 (2008).
230. Ménégaut, L. *et al.* Specific enrichment of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine in carotid atheroma plaque from type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* (2016). doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.004

231. Pete, M. J. & Exton, J. H. Purification of a lysophospholipase from bovine brain that selectively deacylates arachidonoyl-substituted lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **271**, 18114–18121 (1996).
232. Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Sugiura, T. & Waku, K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 281–288 (1996).
233. Aoki, J., Inoue, A. & Okudaira, S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 513–518 (2008).
234. Rother, E. *et al.* Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* **108**, 741–747 (2003).
235. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol* **54**, 2129–2138 (2009).
236. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
237. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 104–116 (2015).
238. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* **11**, 155–161 (2010).
239. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).

240. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
241. Spann, N. J. *et al.* Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* **151**, 138–152 (2012).
242. Wang, B. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* (2018). doi:10.1038/s41574-018-0037-x
243. Venteclef, N. *et al.* GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* **24**, 381–395 (2010).
244. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* **25**, 57–70 (2007).
245. Ito, A. *et al.* LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife* **4**, e08009 (2015).
246. Fontaine, C. *et al.* Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ. Res.* **101**, 40–49 (2007).
247. Monaco, C. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation* **120**, 2462–2469 (2009).
248. Rébé, C. *et al.* Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circ. Res.* **105**, 393–401 (2009).
249. Tripathi, S. *et al.* Meta- and Orthogonal Integration of Influenza ‘OMICS’ Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe* **18**, 723–735 (2015).

250. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2009).
251. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
252. Zuercher, W. J. *et al.* Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **53**, 3412–3416 (2010).
253. Zhang, W. *et al.* Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *J. Neuroimmunol.* **174**, 63–73 (2006).
254. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
255. Na, T.-Y. *et al.* Positive cross-talk between hypoxia inducible factor-1 α and liver X receptor α induces formation of triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2949–2956 (2011).
256. Moreno-Manzano, V. *et al.* FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J. Biol. Chem.* **285**, 1333–1342 (2010).
257. Kase, E. T. *et al.* Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* **54**, 1108–1115 (2005).
258. Walczak, R. *et al.* Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 9905–9911 (2004).
259. Sluimer, J. C. *et al.* Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1258–1265 (2008).

260. Folco, E. J., Sukhova, G. K., Quillard, T. & Libby, P. Moderate Hypoxia Potentiates Interleukin-1 β Production in Activated Human Macrophages. *Circ Res* **115**, 875–883 (2014).
261. Pehkonen, P. *et al.* Genome-wide landscape of liver X receptor chromatin binding and gene regulation in human macrophages. *BMC Genomics* **13**, 50 (2012).
262. Feldmann, R. *et al.* Genome-wide analysis of LXR α activation reveals new transcriptional networks in human atherosclerotic foam cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3518–3531 (2013).
263. Walczak-Drzewiecka, A., Ratajewski, M., Pułaski, Ł. & Dastyk, J. DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1028–1032 (2010).
264. Pierre, C. C. *et al.* Methylation-dependent regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha gene expression by the transcription factor Kaiso. *Biochim. Biophys. Acta* **1849**, 1432–1441 (2015).
265. Muse, E. D. *et al.* Cell-specific discrimination of desmosterol and desmosterol mimetics confers selective regulation of LXR and SREBP in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E4680–E4689 (2018).
266. Sarrazy, V. *et al.* Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of ApoE(-/-) Mice. *Circ. Res.* **118**, 1062–1077 (2016).
267. Folco, E. J. *et al.* Hypoxia But Not Inflammation Augments Glucose Uptake in Human Macrophages: Implications for Imaging Atherosclerosis With 18Fluorine-Labeled 2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography. *Journal of the American College of Cardiology* **58**, 603–614 (2011).

268. Nishizawa, T. *et al.* Testing the role of myeloid cell glucose flux in inflammation and atherosclerosis. *Cell Rep* **7**, 356–365 (2014).
269. Westerterp, M. *et al.* Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis and Atherogenesis. *Circulation* (2018).
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032636
270. Kirchgessner, T. G. *et al.* Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **24**, 223–233 (2016).
271. Hong, C. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 433–444 (2014).
272. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
273. Lampropoulou, V. *et al.* Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* **24**, 158–166 (2016).
274. Groh, L., Keating, S. T., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Riksen, N. P. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* **40**, 203–214 (2018).
275. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=moulton+heller+konerding>. (Accessed: 9th May 2018)
276. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337–1340 (2001).

277. Koslowski, M., Luxemburger, U., Türeci, O. & Sahin, U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1 α . *Oncogene* **30**, 876–882 (2011).
278. Wang, G. L. & Semenza, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 4304–4308 (1993).
279. Wang, G. L. & Semenza, G. L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**, 21513–21518 (1993).
280. Na, T.-Y. *et al.* Positive cross-talk between hypoxia inducible factor-1 α and liver X receptor α induces formation of triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2949–2956 (2011).
281. Varin, A. *et al.* Liver X receptor activation promotes polyunsaturated fatty acid synthesis in macrophages: relevance in the context of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1357–1365 (2015).
282. Matsuura, Y. *et al.* Altered glucose metabolism and hypoxic response in alloxan-induced diabetic atherosclerosis in rabbits. *PLoS ONE* **12**, e0175976 (2017).
283. Ross, S. & Paré, G. Pharmacogenetics of Stroke. *Stroke* **49**, 2541–2548 (2018).
284. Ogawa, H. *et al.* Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA* **300**, 2134–2141 (2008).
285. Gilpin, V. L., American Diabetes Association, American Heart Association & American College of Cardiology Foundation. Review of an article: aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes. A position statement of the American Diabetes Association (ADA), a scientific statement of the American Heart Association(AHA), and an expert consensus document of the American College of

Cardiology Foundation (ACCF). *Diabetes Care*, 33:6; June 2010; 1395-1402. *J Vasc Nurs* **28**, 154–155 (2010).

286. Bazan, H. A. *et al.* Circulating inflammation-resolving lipid mediators RvD1 and DHA are decreased in patients with acutely symptomatic carotid disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **125**, 43–47 (2017).

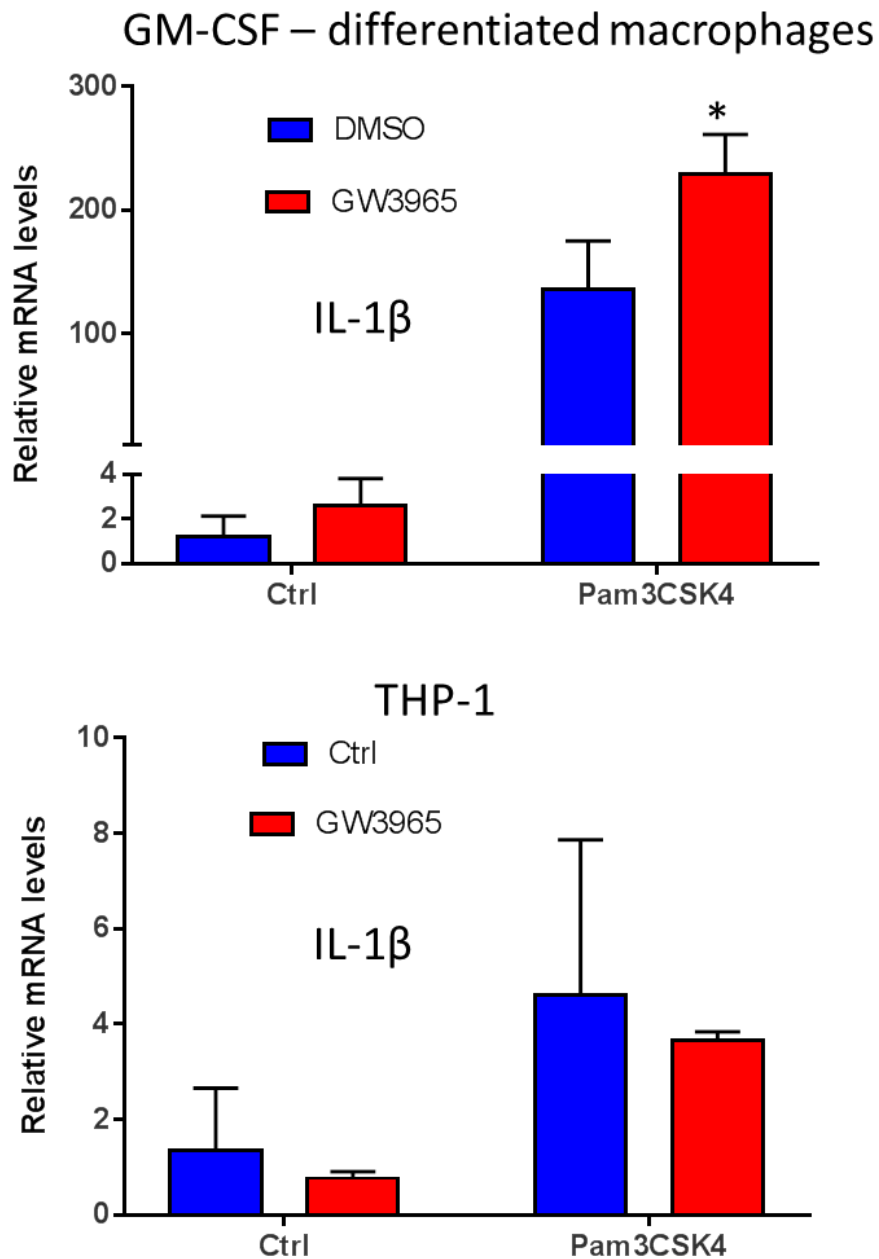


Figure S1 (related to Figure 1): LXR activation differentially impacts TLRs expression and cytokine response in human and mouse macrophages. (A) Relative mRNA levels of *IL1β* 4h after Pam3CSK4 stimulation. Macrophages were differentiated as described in figure 1A, except that M-CSF was replaced by GM-CSF at the same concentration, THP-1 were differentiated with PMA for 48h *P<0.05 Vs DMSO, Student t test.

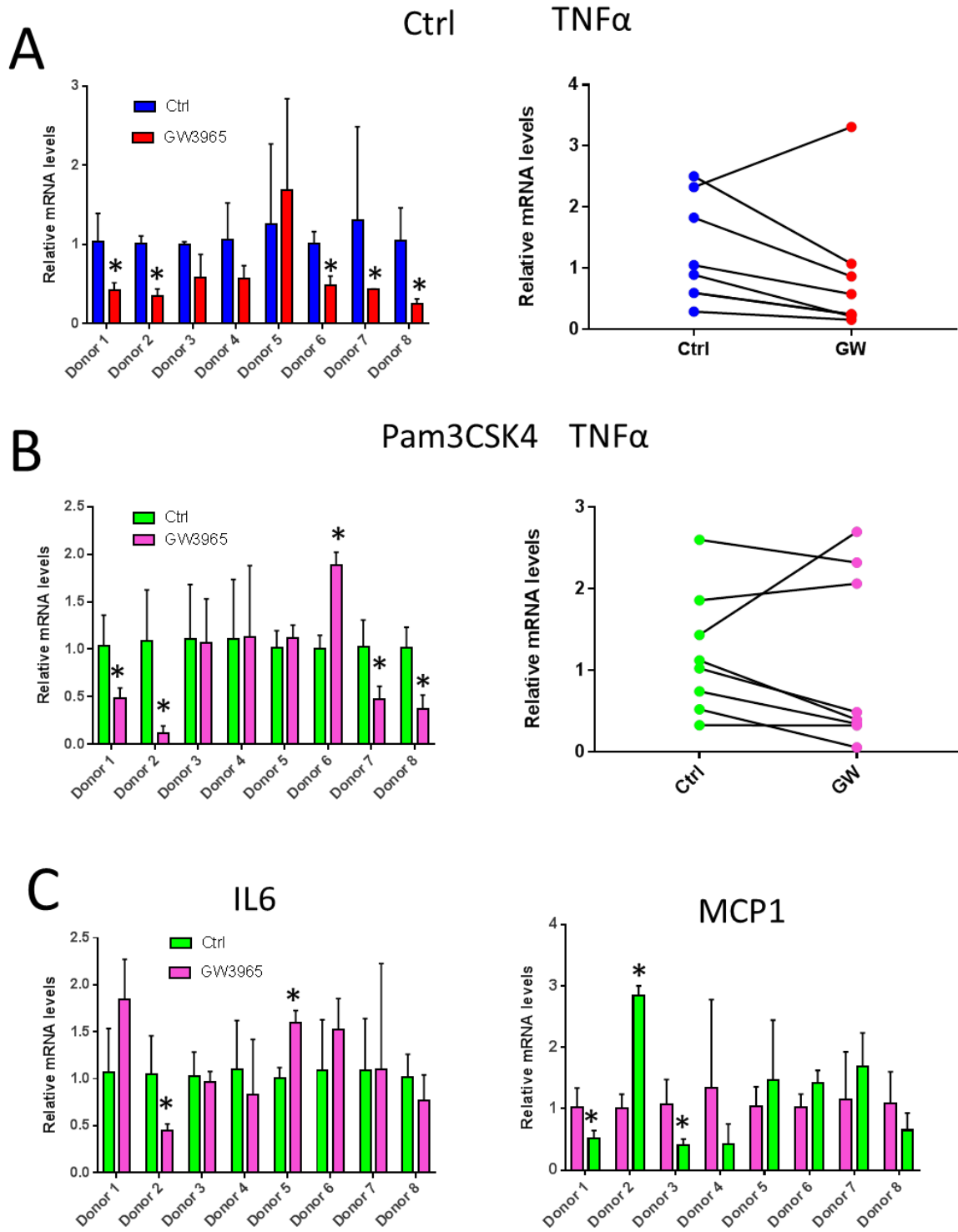


Figure S2 (related to Figure 2) : LXR activation increases IL1 β production in human macrophages. (A) *TNF α* mRNA levels in unstimulated macrophages treated or not with GW3965 for 48h. In the left panel data are normalized at 1 for each donor in the DMSO conditions * $P < 0.05$ Vs DMSO Student t test; In the right panel relative expression levels are calculated for each donor. (B) *TNF α* mRNA levels 4 hours after Pam3CSK4 stimulation, same representation. (C) Relative *IL6* and *MCP1* mRNA levels in macrophages 4 hours after Pam3CSK4 stimulation * $P < 0.05$ Vs DMSO same stimulation conditions, Student t test

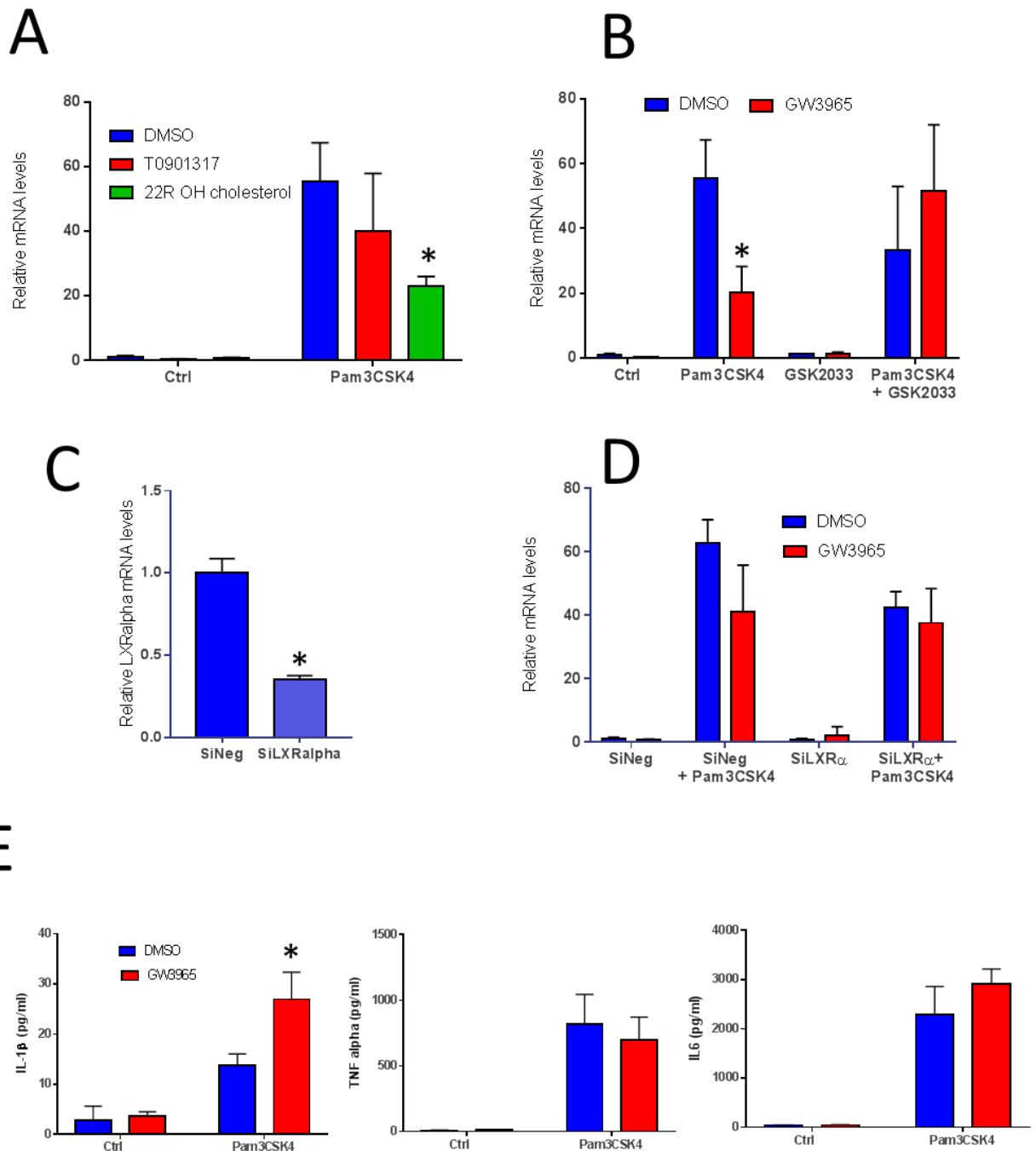


Figure S3 (related to Figure 2): LXR activation increases IL-1 β production in human macrophages. (A) Relative *TNF α* mRNA levels in macrophages treated with different LXR agonist *P<0.05 Vs DMSO 2 way anova Sidak test. (B) Relative *TNF α* mRNA levels in macrophages treated with DMSO or the LXR antagonist GSK2033. *P<0.05 Vs DMSO 2 way anova Sidak test. (C) *LXR α* mRNA levels in human macrophages transfected with negative or *LXR α* SiRNA. *P<0.05 Vs SiNeg Student t test. (D) Relative *TNF α* mRNA levels in macrophages treated with negative or *LXR α* SiRNA. (E) cytokine levels in cell supernatants determined by flow cytometry *p<0.05 Vs DMSO Student t test. Data are expressed as means \pm S.D

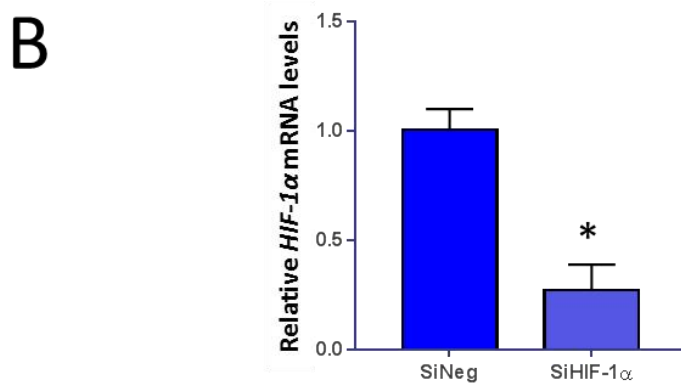
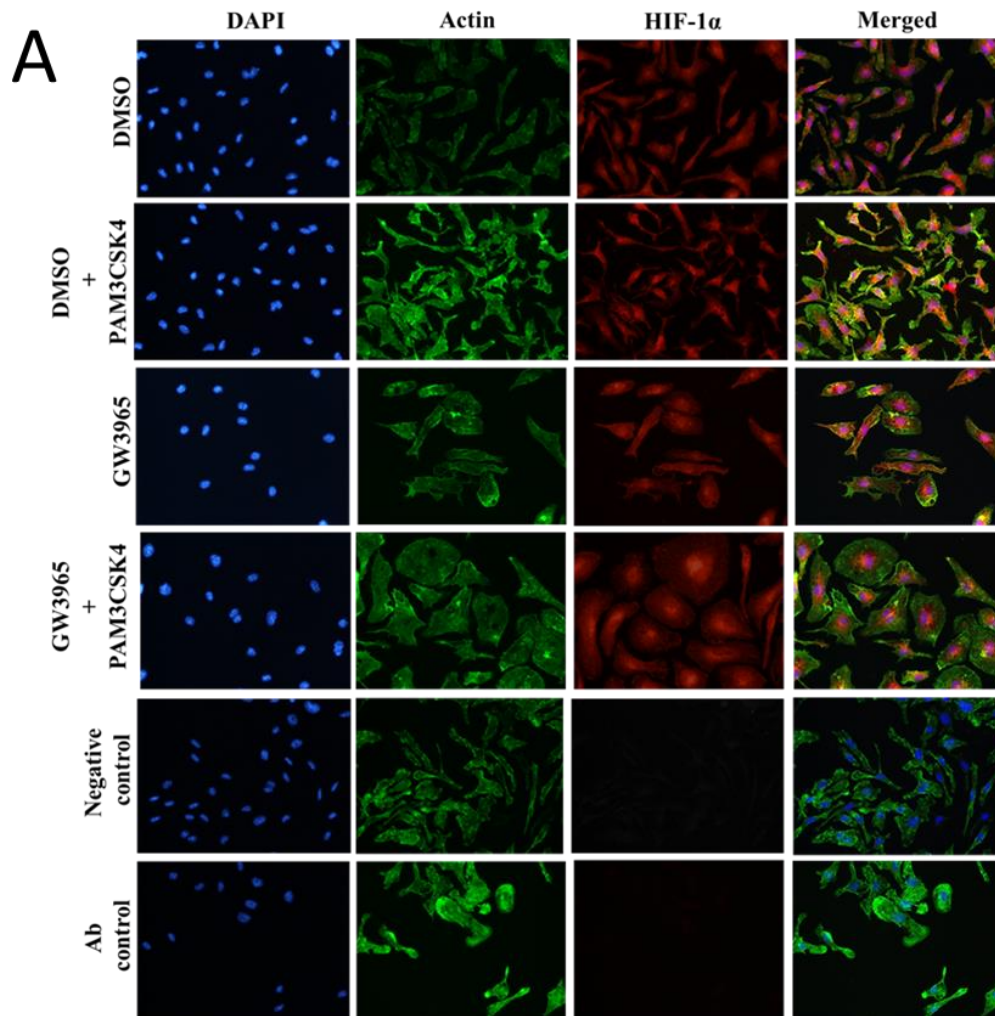


Figure S4 (related to Figure 3) : LXR-mediated HIF-1 α induction increases IL-1 β expression. (A) Representative immunostaining of HIF-1 α (red) in mouse macrophages. Nuclei are stained with DAPI and F-actin with phalloidin (green). (B) *HIF-1 α* mRNA levels in human macrophages transfected with negative or HIF-1 α SiRNA. *P<0.05 Vs SiNeg, Student t test.

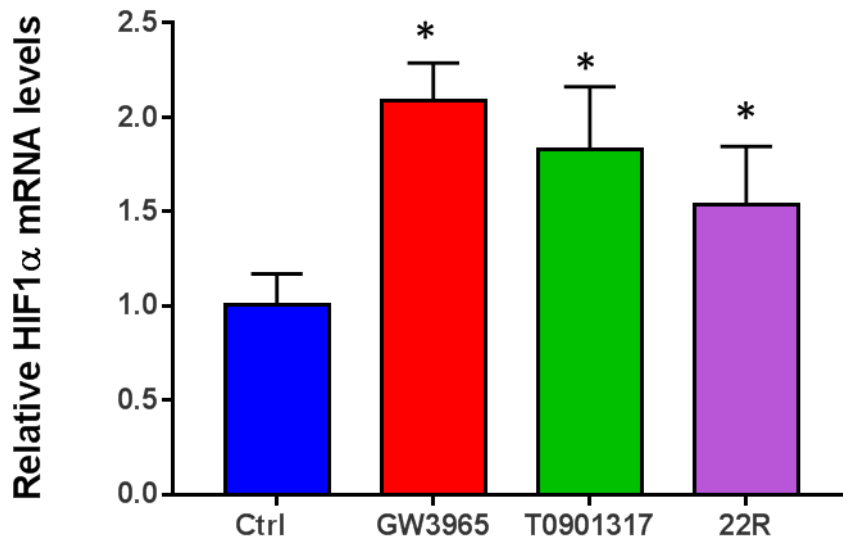


Figure S5 (related to figure 4): Induction of HIF-1 α by LXR agonists precedes IL-1 β activation. (A) Relative *HIF1 α* mRNA levels in differentiated macrophages were treated with different LXR agonists at 1 μ M for 6h * $P < 0.05$ Vs DMSO same stimulation conditions and same time point One way anova Fisher LSD.

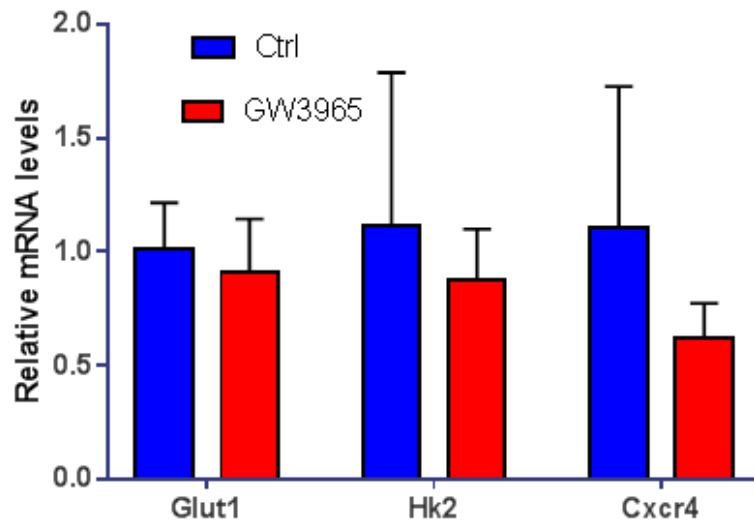


Figure S6 (related to figure 5): LXRs activate other HIF-1 α dependent pathways (A) mRNA levels of HIF1 α target genes in mouse bone marrow derived macrophages treated or not for 48h with GW3965 at 1 μ M .

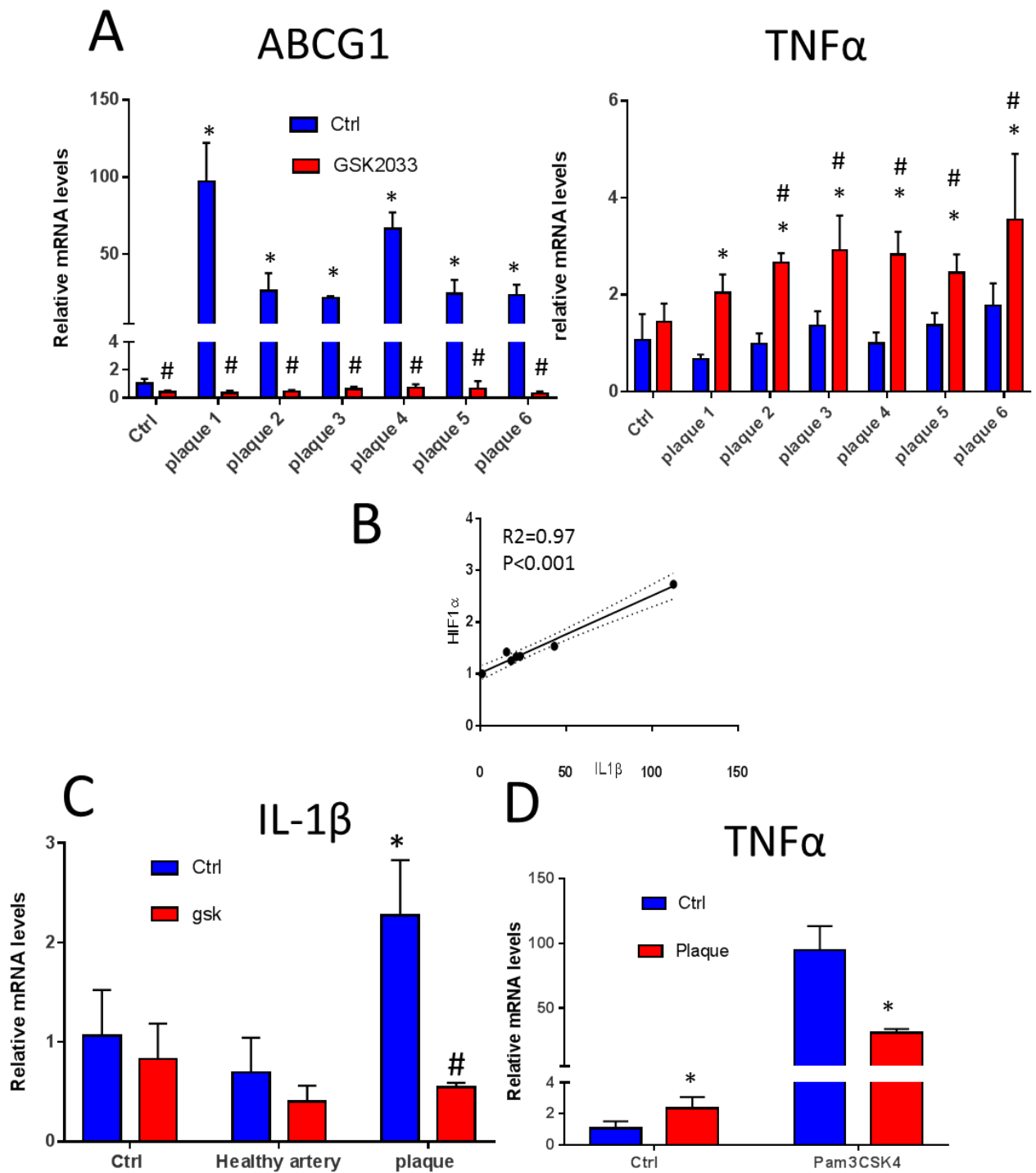


Figure S7 related to Figure 6: Atheroma plaque homogenates activate IL-1 β through an LXR dependent mechanism. (A) mRNA levels of target genes in macrophages treated with atheroma plaques homogenates with or without the LXR antagonist GSK 2033 for 48h. * $P<0.05$ Vs Ctrl ; # $P<0.05$ Vs no GSK2033 same plaque samples, 2 way anova. (B) Correlation between *HIF1 α* and *IL1 β* mRNA levels after exposure to plaque extracts from different donors. Pearson 2 tailed. (C) *IL1 β* mRNA levels in macrophages treated with healthy artery or plaque samples. . * $P<0.05$ Vs Ctrl ; # $P<0.05$ Vs no GSK2033 same plaque samples 2 way anova (D) *TNF α* mRNA levels in macrophages treated for 48h with or without plaque homogenates before Pam3CSK4 activation (4h). * $P<0.05$ Vs without plaque extract. 2 way anova.

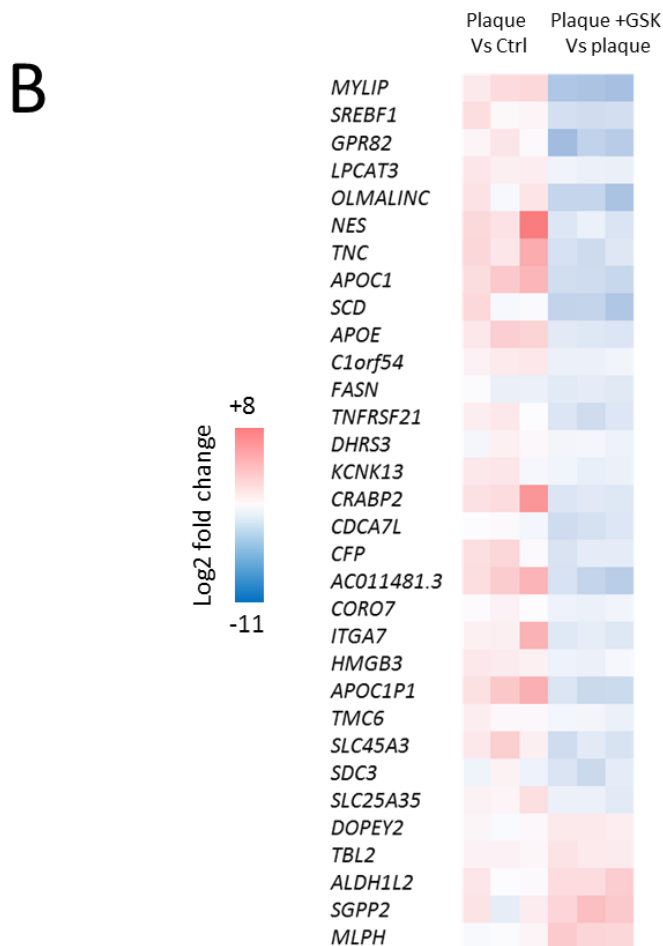
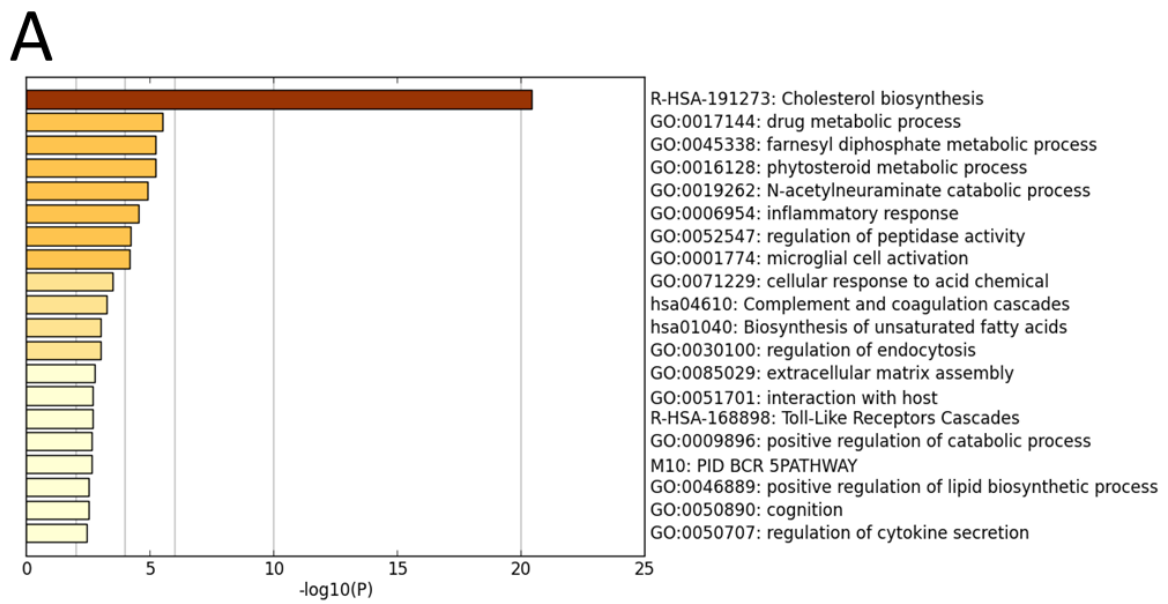


Figure S8 (related to figure 6) : (A) GO term analysis of down-regulated genes after 48h exposure to plaques homogenates. (B) Heatmap of genes differentially expressed in plaque-exposed group Vs plaque + GSK2033.

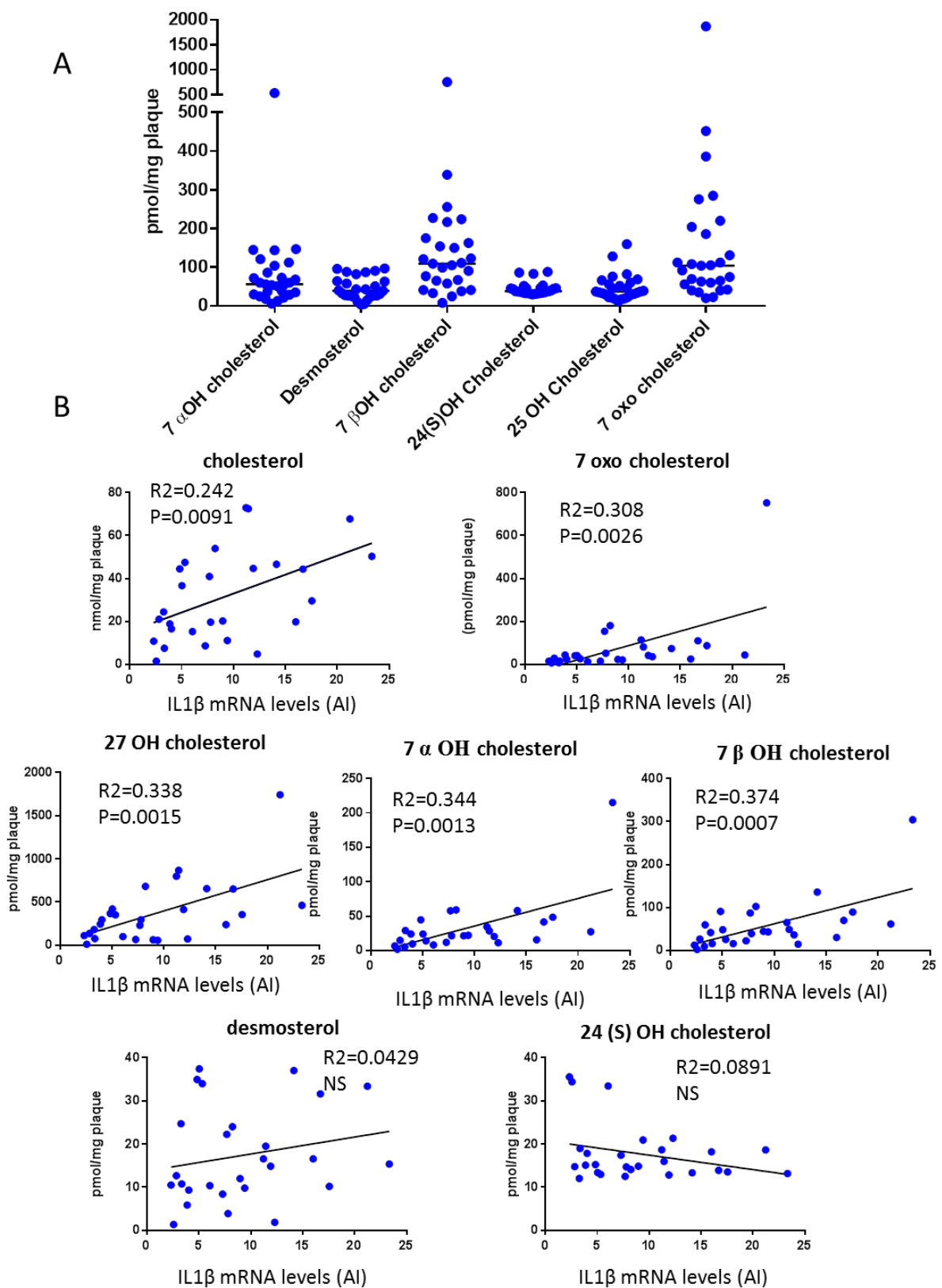


Figure S9 related to figure 7: Oxysterol content of plaques A) Oxysterol content in human atheroma plaques (data are expressed as pmol/mg of tissue). B) Correlation between oxysterol levels and *IL1 β* mRNA levels in primary macrophages treated with same plaque homogenate (Pearson two tailed).

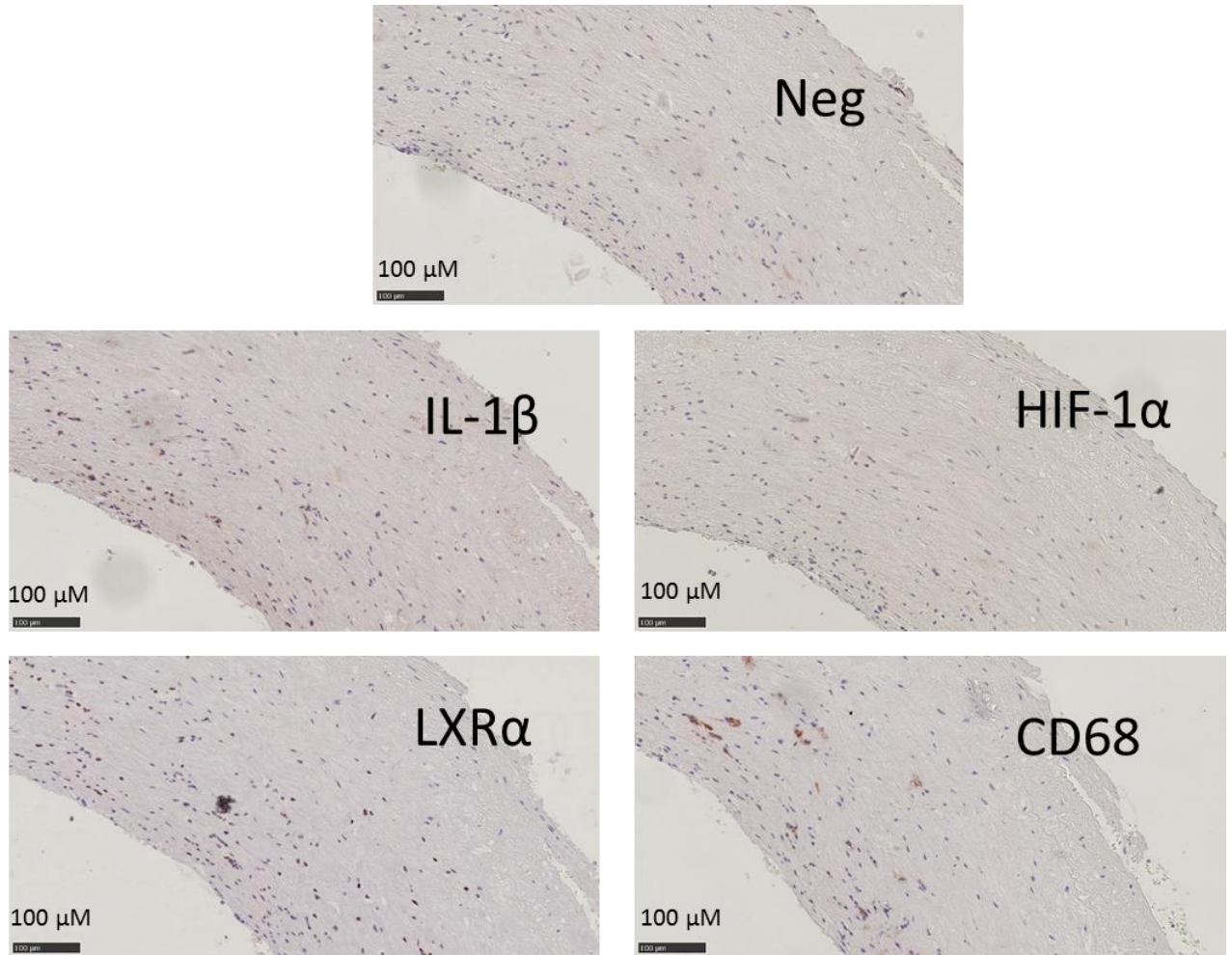


Figure S10 (related to figure 7): LXR α and HIF1 α colocalize with IL1 β in macrophage-rich area of human atherosclerotic lesions from carotid arteries. A) Representative immunohistochemical staining of serial sections of healthy regions of human carotid arteries for CD68, LXR α , HIF-1 α , IL-1 β and negative control (without primary antibody). Magnification is indicated on each picture.

Table S1

Clinical parameters of the patients undergoing endarterectomy (n=27). Data expressed as mean \pm S.D for age and BMI

| | |
|--|-------------------|
| <hr/> <i>Clinical data</i> <hr/> | |
| Age | 72.18 \pm 10.12 |
| Gender (M/F) | 19 /8 |
| BMI (kg/m ²)* | 26.9 \pm 3.32 |
| Smoking | 20 |
| Arterial Hypertension | 24 |
| <hr/> <i>Stroke</i> <hr/> | |
| None | 17 |
| past | 6 |
| acute | 4 |
| <hr/> <i>Atheroma plaque echogenicity</i> <hr/> | |
| Hyper- (calcification) | 11 |
| Hypo- (high lipids content) | 6 |
| Not available | 10 |

*Data not available for 2 patients

III. Résultats et discussion

Nos travaux se sont focalisés sur l'étude de la réponse inflammatoire des macrophages après une stimulation pendant 48 heures des récepteurs LXRs par des agonistes synthétiques ou par des oxystérols, ligands naturels de LXR. Nos résultats mettent en évidence l'existence d'un lien spécifique dans les macrophages humains entre LXR et sécrétion d'IL-1 β . Si nos résultats ont d'abord confirmé les données de la littérature, à savoir que le prétraitement des macrophages humains par des agonistes LXR s'accompagne d'une induction de TLR4 et d'une potentialisation de la réponse pro-inflammatoire des cellules au traitement par du LPS, effets absents dans les macrophages murins, ils apportent également de nouvelles données surprenantes. En effet, il apparaît que les agonistes LXR potentialisent la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages humains après une stimulation par des agonistes TLR2 (PAM3CSK4) alors que le gène *TLR2* n'est pas une cible de LXR et n'est aucunement induit par 48 heures de traitement par du GW3965. De plus, cette potentialisation de la réponse pro-inflammatoire TLR2-dépendante est spécifique d'IL-1 β puisqu'il n'y a aucun effet des agonistes LXR sur la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF α et IL-6, après une stimulation des récepteurs TLR2. Enfin, même en l'absence de stimulation par des agonistes TLR2, le traitement des macrophages par des agonistes LXR provoque une induction de la transcription du gène *IL1B*, certes modérée, mais significative. Les agonistes LXR restent en revanche sans effet sur la sécrétion d'IL-1 β -TLR2 dépendante dans les macrophages murins. Ces résultats laissent donc supposer que le lien qui relie LXR et sécrétion d'IL-1 β chez l'Homme est spécifique et indépendant de la réponse pro-inflammatoire via NF- κ B, et qu'il passe par de nouveaux mécanismes autres que la voie TLR4.

Quand les macrophages acquièrent un phénotype pro-inflammatoire, ils subissent un switch métabolique qui se traduit par une activation massive de la glycolyse aux dépens de la phosphorylation oxydative. Puisque le pyruvate alimente préférentiellement la glycolyse, le cycle de Krebs est bloqué ce qui se traduit à la fois par une augmentation des ROS issus de la mitochondrie et par une accumulation de succinate et de succinate oxydé qui favorisant alors la stabilisation de l'*Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), facteur de transcription impliqué dans l'hypoxie et l'inflammation^{272,273}. De nombreux gènes codant pour des enzymes ou des transporteurs impliqués dans la glycolyse sont d'ailleurs des cibles de HIF-1 α ce qui permet une consommation massive de glucose par les cellules en situation d'hypoxie²⁷⁴. Puisque le gène *IL1B* est également une cible de HIF-1 α , nous avons cherché à observer

quels pouvaient être les effets des agonistes LXR sur le facteur de transcription HIF-1 α . Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le traitement des macrophages humains par un agoniste LXR s'accompagne d'une élévation des taux d'ARNm de *HIF1A* et d'une accumulation intracellulaire d'HIF-1 α , effets non retrouvés dans les macrophages murins. Nous avons également confirmé par immunofluorescence la présence d'HIF-1 α dans les macrophages humains et constaté une intensification du marquage lorsque les cellules ont été traitées 48 heures par du GW3965 par rapport au traitement contrôle. Le traitement par du GW3965, par contre, n'intensifie pas le marquage d'HIF-1 α dans les macrophages murins. L'induction d'HIF-1 α précède l'induction d'IL-1 β puisqu'un traitement de 6h par du GW3965 entraîne déjà une élévation des ARNm d'*HIF1A* mais pas encore ceux d'*IL1B*. Ceci laisse supposer l'existence d'un mécanisme par lequel HIF-1 α favoriserait la sécrétion d'IL-1 β lors d'un traitement par des agonistes LXR. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation significative de l'acétylation des histones au niveau du site de liaison HRE (*hypoxia response element*) d'HIF-1 α sur le promoteur du gène *IL1B* lorsque les cellules sont traitées pendant 48 heures avec du GW3965. Ceci suggère que lors d'un traitement par des agonistes LXR, HIF-1 α serait responsable d'une mise en état permissif du promoteur du gène *IL1B* ce qui permettrait une activation massive de sa transcription et de la sécrétion d'IL-1 β lors de la stimulation par PAM3CSK4, agoniste TLR2. Nous avons donc cherché à voir si ce mécanisme pouvait être transposé à d'autres gènes cibles d' HIF-1 α , notamment ceux impliqués dans la glycolyse. Nous retrouvons une induction des ARNm d'*ADM*, *HK2*, *CXCR4* et *SLC2A1* dans les macrophages humains traités pendant 48 heures par du GW3965. Là encore, ce traitement reste sans effet ou beaucoup plus modéré sur les macrophages murins.

Les plaques d'athérome se développent dans un environnement hypoxique puisque la diffusion de l'oxygène dans la lésion est très limitée mais également parce que les cellules du foyer inflammatoire en sont de grandes consommatrices. En réponse à l'hypoxie, une angiogenèse locale se développe dans la lésion, et provoque une augmentation de volume associée à un risque de rupture et d'hémorragie intra-plaque ²⁷⁵. En parallèle, les taux cellulaires d' HIF-1 α augmentent et ce facteur de transcription est abondamment présent dans les lésions d'athérome. Puisque les plaques d'athérome contiennent de forts taux de particules LDL-oxydées et sont riches en oxystérols, nous avons voulu voir si le contenu de plaques d'athérome avait les mêmes effets pro-inflammatoires que les agonistes synthétiques LXR sur

les macrophages primaires humains. Nos résultats indiquent que le traitement des macrophages par des homogénats de plaques d'athérome carotidien provoque une élévation des taux d'ARNm d'*IL1B* qui est corrélée à une élévation des ARNm d'*HIF1A*. Ces effets disparaissent en présence d'un antagoniste synthétique de LXR (GSK 2033). Ainsi, ceci suggère que le lien qui relie LXR, HIF-1 α et sécrétion d'IL-1 β dans les macrophages humains, pourrait être impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Le fait que nous retrouvions une colocalisation de LXR, HIF-1 α , IL-1 β et du marqueur macrophagique CD68, sur des coupes de plaques d'athérome issues d'endartériectomies carotidiennes renforce cette hypothèse.

Nos résultats pourraient ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques, fondées sur une inhibition de LXR dans le but de bloquer ses effets sur la production d'IL-1 β , cytokine qui contribue massivement au développement et à l'inflammation des lésions d'athérosclérose. Néanmoins, une telle approche pourrait aussi avoir des effets délétères et favoriser le développement de la maladie athéromateuse si l'efflux cellulaire de cholestérol venait à être également inhibé. Aussi, serait-il nécessaire de s'orienter vers des agonistes ou des antagonistes sélectifs pour inhiber spécifiquement l'interaction LXR-HIF-1 α tout en préservant l'induction d'ABCA1 par LXR et l'efflux cellulaire de cholestérol des cellules. Ceci nécessiterait alors de mieux caractériser le mécanisme reliant LXR et HIF- α . Il n'a pas été décrit, à notre connaissance, de site de liaison LXRE au niveau du promoteur d'*HIF1A*. Le facteur de transcription HIF-1 α est réputé pour avoir une demi-vie très courte de l'ordre de quelques minutes car cette protéine est produite en réponse à une situation d'hypoxie et est très vite dégradée au niveau du protéasome après prolyl-hydroxylation lorsque les taux d'oxygène augmentent ²⁷⁶. Nos expérimentations n'ont cependant pas été conduites en situation d'hypoxie. Aussi, peut-on imaginer qu'une interaction physique entre LXR et HIF-1 α exerce un rôle de stabilisation sur HIF-1 α lequel pourrait alors s'accumuler, d'autant qu'il a été décrit que HIF-1 α a la capacité de s'autoréguler positivement puisque le promoteur de son gène contient un site de liaison HRE²⁷⁷⁻²⁸⁰. Néanmoins, nos résultats indiquent des effets diamétralement opposés sur la réponse inflammatoire entre macrophages humains et macrophages murins, or le promoteur du gène *Hif1a* contient également un site HRE. Nous avons cherché à étudier les effets d'un blocage de la respiration mitochondriale et surtout d'une induction de la glycolyse dans les macrophages après un traitement par des agonistes LXR avec ou sans stimulation des récepteurs TLR2. Nos résultats démontrent des effets

complètement opposés entre macrophages humains et murins : si les agonistes LXR intensifient la glycolyse des macrophages humains, ils restent sans effet sur les macrophages murins. Ceci suggère des différences métaboliques importantes entre macrophages humains et murins lors de la réponse inflammatoire. Hypoxie et glycolyse sont fortement liées puisque la glycolyse pourvoit la cellule en molécules d'ATP quand la phosphorylation oxydative est déficiente. On peut donc envisager que les voies qui régulent HIF-1 α dans les macrophages humains et dans les macrophages murins sont différentes, ce qui pourrait expliquer en partie que les agonistes LXR qui potentialisent la réponse IL-1 β pro-inflammatoire chez l'Homme via un mécanisme qui implique HIF-1 α , tendent à être au contraire anti-inflammatoire chez la souris.

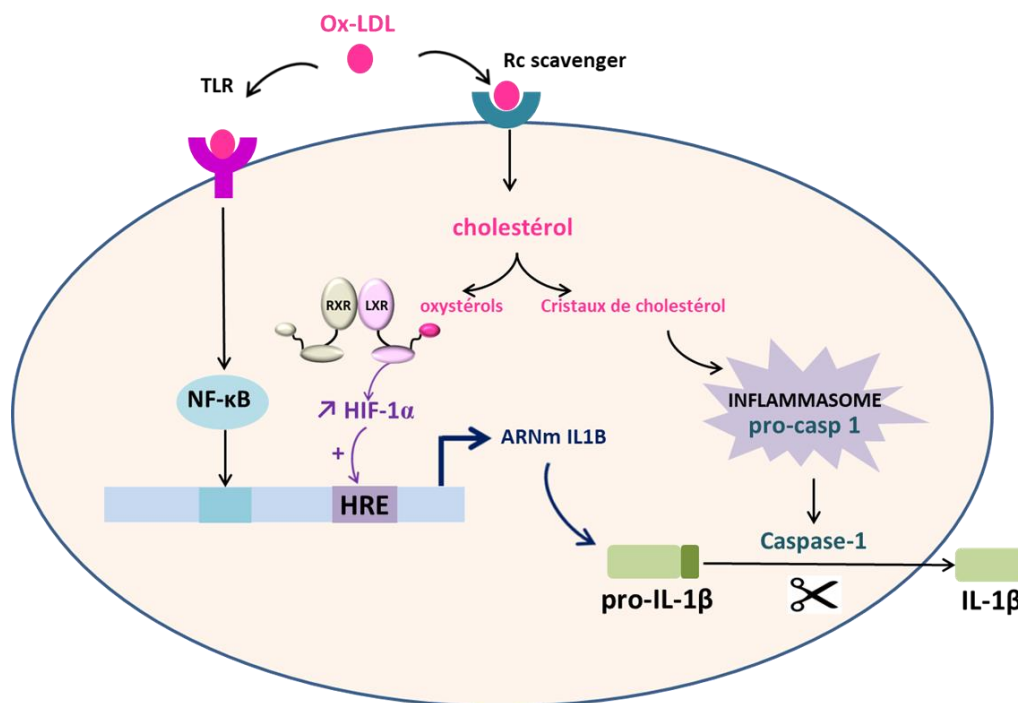


Figure 17 : Schéma récapitulatif de la sécrétion d'IL-1 β en réponse à une stimulation des récepteurs LXR via un mécanisme dépendant d'HIF-1 α .

Les particules ox-LDL stimulent les récepteurs TLRs et activent la voie NF- κ B. Elles sont captées par les récepteurs scavengers puis internalisées par le macrophage. Le cholestérol accumulé est oxydé en oxystérols qui activent le récepteur LXR. L'activation de LXR provoque une accumulation secondaire d'HIF-1 α et potentialise les effets de sa liaison au niveau du site HRE du promoteur du gène *IL1B*. La transcription d'IL1B lors d'une activation de la voie NF- κ B est alors maximisée. Le cholestérol accumulé forme également des cristaux de cholestérol qui activent l'infammasome NLRP3 ce qui permet le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β active qui est alors sécrétée par la cellule.

LXR: liver X receptor ; *RXR* : retinoic X receptor ; *TLRs* : Toll-like receptors; *NF- κ B*: nuclear factor kappa B; *HRE*: hypoxia response element; *NLRP3* : nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3; *Rc scavenger*: récepteur scavenger; *pro-casp1*: pro-caspase 1; *HIF-1 α* : hypoxia inducible factor-1-alpha; *ox-LDL*: particules de LDL oxydées; *ARNm*: ARN messenger; *IL-1 β* : interleukine-1 β

CONCLUSION GENERALE

Les plaques d'athérome constituent des foyers inflammatoires importants où les macrophages notamment sécrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires dont des espèces lipidiques issues du métabolisme l'acide arachidonique ou des cytokines pro-inflammatoires. Les travaux présentés ici décrivent donc deux approches pour explorer les processus impliqués dans l'inflammation au cours de l'athérosclérose. La première étude se focalise sur la physiopathologie athéromateuse au cours du diabète puisque les maladies cardiovasculaires sont la première complication associée à cette pathologie. Nous avons ainsi mis en évidence des perturbations du métabolisme de l'acide arachidonique au sein des plaques d'athérome carotidiennes au cours du diabète qui se traduisent par un enrichissement des plaques de sujets diabétiques en 2-arachidonoyl-lysophosphatodylcholine (2-AA-LPC) par rapport aux sujets non-diabétiques. Les plaques d'athérome des sujets diabétiques sont réputées pour avoir des corps nécrotiques plus volumineux et être plus inflammatoires que les plaques de sujets non-diabétiques. Le 2-AA-LPC apparaît donc comme un potentiel marqueur de vulnérabilité des plaques. La seconde étude présentée décrit une induction d'IL-1 β par l'activation de LXR selon un mécanisme dépendant d'HIF-1 α dans des macrophages primaires humains, voie d'induction qui semble par ailleurs être fonctionnelle au sein de plaques d'athérome carotidiennes humaines ce qui permet d'envisager de nouvelles stratégies pour inhiber la production d'IL-1 β .

Si les deux mécanismes pro-inflammatoires présentés ici sont différents sur le plan métabolique, ils alimentent le même processus : la progression et l'instabilité de la plaque d'athérome. Dans de futures études il sera intéressant d'explorer les mécanismes moléculaires pouvant potentiellement relier ces deux voies. Néanmoins, des données de la littérature suggèrent d'ores et déjà un lien entre LXR et métabolisme de l'acide arachidonique d'une part, et une dérégulation de la voie HIF-1 α dans des modèles de diabète au niveau de la plaque d'athérome d'autre part.

Ainsi, notre équipe a récemment décrit que les agonistes LXR pouvaient moduler le métabolisme des acides gras en régulant les enzymes de biosynthèse des acides gras polyinsaturés tel l'acide arachidonique mais aussi en modulant directement l'incorporation

d'acide arachidonique dans les phospholipides via l'enzyme LPCAT3^{77,281}. Se pose alors la question de savoir si ces modulations des taux d'acide arachidonique par LXR au sein des macrophages s'accompagnent également de variations d'un de ses dérivés, le 2-AA-LPC, que nous avons décrit comme un marqueur de vulnérabilité des plaques d'athérome dans le contexte du diabète.

De la même façon, il serait d'un grand intérêt de regarder s'il existe une différence d'expression d'HIF-1 α et d'IL-1 β entre des plaques d'athérome carotidien de sujets diabétiques et de sujets non-diabétiques. Quelques études rapportent en effet que le diabète pourrait être associé à des variations de la réponse à l'hypoxie d'HIF-1 α au sein des plaques d'athérome²⁸². Nous allons très prochainement mettre en œuvre ce projet puisqu'une nouvelle étude qui vise à étudier plus en détail le métabolisme du 2-AA-LPC dans des plaques d'athérome carotidien de diabétiques versus non-diabétiques est en cours (MASCADI : Métabolisme de l'Acide Arachidonique dans la Sténose Carotidienne au cours du Diabète).

Nos résultats ouvrent également des perspectives pour des approches thérapeutiques plus ciblées dans le domaine de l'athérosclérose. En effet, des molécules ciblant directement le métabolisme de l'acide arachidonique sont utilisées en prévention cardiovasculaire. Par exemple, les antiagrégants plaquettaires sont largement utilisés dans la prévention des maladies cardiovasculaires et en particulier l'aspirine qui en ciblant les cycloxygénases tend à diminuer la production de PGE₂ pro-inflammatoire et de TXA₂ pro-agrégant²⁸³. Néanmoins, si le diabète augmente significativement le risque cardiovasculaire, l'efficacité de l'aspirine chez les diabétiques en l'absence de lésions athéromateuses n'a pas encore été établie et l'utilisation de l'aspirine à faible dose en préventif n'est pour le moment recommandée que chez les patients avec un risque cardiovasculaire supérieur à 10% dans les dix ans à venir^{284,285}. De plus, l'aspirine n'agit pas au niveau des voies de biosynthèse supposées du 2-AA-LPC et de ses dérivés. Enfin, ces thérapies restent sans effet sur la biosynthèse de médiateurs lipidiques qui peuvent également être impliqués dans la vulnérabilité des plaques. Il a en effet été décrit qu'un déficit en médiateurs lipidiques de résolution de l'inflammation (résolvines et lipoxines) au sein des plaques d'athérome favorisait l'inflammation et la rupture des plaques athéromateuses²⁸⁶. Nous cherchons d'ailleurs à mettre en évidence un éventuel appauvrissement en résolvine D1 des plaques d'athérome carotidien de sujets diabétiques dans des plaques recueillies au cours de l'étude MASCADI. Dans ce contexte, il est possible d'imaginer que les patients diabétiques, en raison des altérations spécifiques du métabolisme

de l'acide arachidonique que nous avons retrouvées pourraient bénéficier en priorité de ces traitements innovants par des médiateurs de résolution de l'inflammation, analogues des résolvines.

Notre deuxième étude identifie pour la première fois une voie de régulation d'IL-1 β via HIF-1 α au cours de l'athérosclérose qui dépend de l'activation de LXR. Ceci laisse envisager plusieurs cibles thérapeutiques potentielles pour bloquer l'induction d'IL-1 β au sein des macrophages des lésions athérosclérotiques. Inhiber LXR au moyen d'antagonistes permettrait de bloquer cette voie de régulation d'IL-1 β mais impacterait également les autres voies de régulation de LXR, y compris l'efflux cellulaire de cholestérol qui a un effet athéroprotecteur et anti-inflammatoire. Une possibilité serait de développer des agonistes sélectifs, puisqu'il a déjà été rapporté qu'il existe des activations sélectives des gènes cibles de LXR en fonction de l'agoniste utilisé. Par exemple, le desmostérol, à l'inverse des agonistes non stéroïdiens, inhibe *SREBF1* et semble posséder des propriétés anti-inflammatoires. La protéine HIF-1 α serait également une cible prometteuse même si ce facteur de transcription régule lui aussi plusieurs voies cellulaires qui pourraient être impactées secondairement par cette inhibition. Notamment, les conséquences sur l'activation de la glycolyse au niveau des macrophages de la plaque d'athérome par la voie LXR-HIF-1 α reste à explorer. Aussi, apparaît-il comme un enjeu clef de mieux caractériser l'interaction entre LXR et HIF-1 α via des approches moléculaires, pour notamment identifier les domaines de LXR impliqués dans l'activation de HIF-1 α . Cette caractérisation donnerait un rationnel pour développer des thérapies ciblées sur la régulation d'IL-1 β dépendante de l'axe LXR-HIF-1 α et pour ralentir la progression de l'athérosclérose.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **390**, 1151–1210 (2017).
2. Barquera, S. *et al.* Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch. Med. Res.* **46**, 328–338 (2015).
3. Doll, R. & Hill, A. B. The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report. 1954. *BMJ* **328**, 1529–1533; discussion 1533 (2004).
4. Lewington, S. *et al.* Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* **360**, 1903–1913 (2002).
5. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration *et al.* Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* **376**, 1670–1681 (2010).
6. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* **302**, 412–423 (2009).
7. Rao Kondapally Seshasai, S. *et al.* Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N. Engl. J. Med.* **364**, 829–841 (2011).
8. Ray, K. K. *et al.* Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* **373**, 1765–1772 (2009).
9. Palmer, S. C. *et al.* Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **305**, 1119–1127 (2011).

10. Kono, K. *et al.* Composition and plaque patterns of coronary culprit lesions and clinical characteristics of patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* **82**, 344–351 (2012).
11. Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J. & Lewington, S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ. Res.* **118**, 535–546 (2016).
12. Tabas, I., García-Cardena, G. & Owens, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell Biol.* **209**, 13–22 (2015).
13. Kim, J. M. *et al.* Mechanism of Ang II involvement in activation of NF- κ B through phosphorylation of p65 during aging. *Age (Dordr)* **34**, 11–25 (2012).
14. Tabas, I., Williams, K. J. & Borén, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* **116**, 1832–1844 (2007).
15. Dai, G. *et al.* Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14871–14876 (2004).
16. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2045–2051 (2012).
17. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q. & Papayannopoulos, V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* **349**, 316–320 (2015).
18. Robbins, C. S. *et al.* Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* **19**, 1166–1172 (2013).
19. Gu, L. *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**, 275–281 (1998).

20. O'Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
21. Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G. K. & Yan, Z. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* **105**, 1158–1161 (2002).
22. Wang, Y., Wang, G. Z., Rabinovitch, P. S. & Tabas, I. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in macrophages. *Circ. Res.* **114**, 421–433 (2014).
23. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)* **214**, 33–50 (2015).
24. Hermansson, A. *et al.* Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J. Exp. Med.* **207**, 1081–1093 (2010).
25. Hansson, G. K., Libby, P. & Tabas, I. Inflammation and plaque vulnerability. *J. Intern. Med.* **278**, 483–493 (2015).
26. Miteva, K., Madonna, R., De Caterina, R. & Van Linthout, S. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* (2018). doi:10.1016/j.vph.2018.04.006
27. Gautier, E. L. *et al.* Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation* **119**, 2367–2375 (2009).
28. Ait-Oufella, H. *et al.* Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* **12**, 178–180 (2006).
29. Subramanian, M., Thorp, E., Hansson, G. K. & Tabas, I. Treg-mediated suppression of atherosclerosis requires MYD88 signaling in DCs. *J. Clin. Invest.* **123**, 179–188 (2013).
30. Butcher, M. J. *et al.* Atherosclerosis-Driven Treg Plasticity Results in Formation of a Dysfunctional Subset of Plastic IFN γ ⁺ Th1/Tregs. *Circ. Res.* **119**, 1190–1203 (2016).

31. Engelbertsen, D. *et al.* T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 637–644 (2013).
32. Kyaw, T. *et al.* B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* **109**, 830–840 (2011).
33. Binder, C. J. *et al.* The role of natural antibodies in atherogenesis. *J. Lipid Res.* **46**, 1353–1363 (2005).
34. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
35. Myoishi, M. *et al.* Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* **116**, 1226–1233 (2007).
36. Dorweiler, B., Grechowa, I., Wallrath, A., Vahl, C. F. & Horke, S. Activation of the proapoptotic unfolded protein response in plaques of the human carotid artery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **48**, 248–257 (2014).
37. Garbin, U. *et al.* Expansion of necrotic core and shedding of Mertk receptor in human carotid plaques: a role for oxidized polyunsaturated fatty acids? *Cardiovasc. Res.* **97**, 125–133 (2013).
38. Libby, P. Collagenases and cracks in the plaque. *J. Clin. Invest.* **123**, 3201–3203 (2013).
39. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 125–138 (2008).
40. Slijkhuis, W., Mali, W. & Appelman, Y. A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis. *Neth Heart J* **17**, 140–144 (2009).
41. McMillan, G. C. Historical review of research on atherosclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **369**, 1–6 (1995).

42. Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr. Rev.* **47**, 23–25 (1989).
43. Finking, G. & Hanke, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* **135**, 1–7 (1997).
44. Kannel, W. B., Dawber, T. R., Kagan, A., Revotskie, N. & Stokes, J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **55**, 33–50 (1961).
45. Anderson, K. M., Castelli, W. P. & Levy, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* **257**, 2176–2180 (1987).
46. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* **62**, 707–714 (1977).
47. Castelli, W. P., Abbott, R. D. & McNamara, P. M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation* **67**, 730–734 (1983).
48. Wilson, P. W. *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837–1847 (1998).
49. Tsao, C. W. & Vasan, R. S. Cohort Profile: The Framingham Heart Study (FHS): overview of milestones in cardiovascular epidemiology. *Int J Epidemiol* **44**, 1800–1813 (2015).
50. Teslovich, T. M. *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **466**, 707–713 (2010).
51. Kathiresan, S. *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**, 56–65 (2009).

52. Ahangari, N., Ghayour Mobarhan, M., Sahebkar, A. & Pasdar, A. Molecular aspects of hypercholesterolemia treatment: current perspectives and hopes. *Ann. Med.* **50**, 303–311 (2018).
53. Benn, M., Watts, G. F., Tybjaerg-Hansen, A. & Nordestgaard, B. G. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur. Heart J.* **37**, 1384–1394 (2016).
54. Röhrl, C. & Stangl, H. Cholesterol metabolism-physiological regulation and pathophysiological deregulation by the endoplasmic reticulum. *Wien Med Wochenschr* (2018). doi:10.1007/s10354-018-0626-2
55. Okazaki, S. *et al.* Early statin treatment in patients with acute coronary syndrome: demonstration of the beneficial effect on atherosclerotic lesions by serial volumetric intravascular ultrasound analysis during half a year after coronary event: the ESTABLISH Study. *Circulation* **110**, 1061–1068 (2004).
56. Puri, R. *et al.* Non-HDL Cholesterol and Triglycerides: Implications for Coronary Atheroma Progression and Clinical Events. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2220–2228 (2016).
57. Maron, D. J., Fazio, S. & Linton, M. F. Current perspectives on statins. *Circulation* **101**, 207–213 (2000).
58. Nissen, S. E. *et al.* Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* **295**, 1556–1565 (2006).
59. Tang, X. *et al.* The effect of statin therapy on plaque regression following acute coronary syndrome: a meta-analysis of prospective trials. *Coron. Artery Dis.* **27**, 636–649 (2016).

60. Stone, N. J. Reducing residual risk in secondary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* **125**, 1958–1960 (2012).
61. Stone, N. J., Robinson, J. G. & Lichtenstein, A. The new cholesterol treatment guidelines. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1957 (2014).
62. Vavlukis, M. & Vavlukis, A. Adding ezetimibe to statin therapy: latest evidence and clinical implications. *Drugs Context* **7**, 212534 (2018).
63. Cannon, C. P. *et al.* Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2387–2397 (2015).
64. Tsujita, K. *et al.* Impact of Dual Lipid-Lowering Strategy With Ezetimibe and Atorvastatin on Coronary Plaque Regression in Patients With Percutaneous Coronary Intervention: The Multicenter Randomized Controlled PRECISE-IVUS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 495–507 (2015).
65. Lo Surdo, P. *et al.* Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* **12**, 1300–1305 (2011).
66. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H. & Hobbs, H. H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272 (2006).
67. Nicholls, S. J. *et al.* Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA* **316**, 2373–2384 (2016).
68. Libby, P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1225–1228 (2005).
69. Berk, B. C., Weintraub, W. S. & Alexander, R. W. Elevation of C-reactive protein in ‘active’ coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **65**, 168–172 (1990).

70. Liuzzo, G. *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N. Engl. J. Med.* **331**, 417–424 (1994).
71. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* **375**, 132–140 (2010).
72. Libby, P., Ridker, P. M., Hansson, G. K. & Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 2129–2138 (2009).
73. Ridker, P. M. *et al.* Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2195–2207 (2008).
74. Ridker, P. M. *et al.* Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* **98**, 839–844 (1998).
75. Ridker, P. M. *et al.* Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1959–1965 (2001).
76. Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F. & Rawlings, R. R. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 950–962 (2011).
77. Ishibashi, M. *et al.* Liver X Receptor Regulates Arachidonic Acid Distribution and Eicosanoid Release in Human Macrophages: A Key Role for Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2013). doi:10.1161/ATVBAHA.112.300812
78. Innes, J. K. & Calder, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **132**, 41–48 (2018).

79. Kralisch, S. & Fasshauer, M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* **56**, 10–21 (2013).
80. Rubinow, K. B. *et al.* Acyl-CoA synthetase 1 is induced by Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide and is required for phospholipid turnover in stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* **288**, 9957–9970 (2013).
81. Kanter, J. E., Tang, C., Oram, J. F. & Bornfeldt, K. E. Acyl-CoA synthetase 1 is required for oleate and linoleate mediated inhibition of cholesterol efflux through ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 358–364 (2012).
82. Cyrus, T., Yao, Y., Ding, T., Dogné, J. M. & Praticò, D. A novel thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor, BM-573, reduces development and progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* **561**, 105–111 (2007).
83. Gabrielsen, A. *et al.* Thromboxane synthase expression and thromboxane A2 production in the atherosclerotic lesion. *J. Mol. Med.* **88**, 795–806 (2010).
84. Bäck, M., Sultan, A., Ovchinnikova, O. & Hansson, G. K. 5-Lipoxygenase-activating protein: a potential link between innate and adaptive immunity in atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circ. Res.* **100**, 946–949 (2007).
85. Helgadottir, A. *et al.* The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat. Genet.* **36**, 233–239 (2004).
86. Bäck, M. *et al.* Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17501–17506 (2005).

87. Waddington, E., Sienuarine, K., Puddey, I. & Croft, K. Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **292**, 234–244 (2001).
88. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 36–46 (2010).
89. Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=resolvin+D1+limits+5-lipoxyg%C3%A9nase+fredman>. (Accessed: 18th November 2017)
90. Chatterjee, A. *et al.* Biosynthesis of proresolving lipid mediators by vascular cells and tissues. *FASEB J.* **31**, 3393–3402 (2017).
91. Wu, B., Mottola, G., Schaller, M., Upchurch, G. R. & Conte, M. S. Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications. *Mol. Aspects Med.* **58**, 72–82 (2017).
92. Circulating inflammation-resolving lipid mediators RvD1 and DHA are decreased in patients with acutely symptomatic carotid disease. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=circulating+inflammation-resolving+lipid+mediator+RvD1+and+DHA+are+decreased+in+patients>. (Accessed: 18th November 2017)
93. Fredman, G. *et al.* An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat Commun* **7**, 12859 (2016).
94. Bazan, H. A. *et al.* Diminished omega-3 fatty acids are associated with carotid plaques from neurologically symptomatic patients: Implications for carotid interventions. *Vascul. Pharmacol.* **51**, 331–336 (2009).

95. Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**, 1003–1018 (2013).
96. Bujak, M. *et al.* Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* **173**, 57–67 (2008).
97. Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
98. Grebe, A., Hoss, F. & Latz, E. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circulation Research* **122**, 1722–1740 (2018).
99. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
100. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **21**, 677–687 (2015).
101. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
102. Karasawa, T. & Takahashi, M. The crystal-induced activation of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *Inflamm Regen* **37**, 18 (2017).
103. Baroja-Mazo, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* **15**, 738–748 (2014).
104. Isoda, K. *et al.* Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1068–1073 (2004).
105. Elhage, R. *et al.* Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **97**, 242–244 (1998).

106. Devlin, C. M., Kuriakose, G., Hirsch, E. & Tabas, I. Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6280–6285 (2002).
107. Isoda, K. *et al.* Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation* **108**, 516–518 (2003).
108. Chamberlain, J. *et al.* Interleukin-1beta and signaling of interleukin-1 in vascular wall and circulating cells modulates the extent of neointima formation in mice. *Am. J. Pathol.* **168**, 1396–1403 (2006).
109. Chamberlain, J., Gunn, J., Francis, S., Holt, C. & Crossman, D. Temporal and spatial distribution of interleukin-1 beta in balloon injured porcine coronary arteries. *Cardiovasc. Res.* **44**, 156–165 (1999).
110. Kirii, H. *et al.* Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 656–660 (2003).
111. Bhaskar, V. *et al.* Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **216**, 313–320 (2011).
112. Gage, J., Hasu, M., Thabet, M. & Whitman, S. C. Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Can J Cardiol* **28**, 222–229 (2012).
113. Zheng, F., Xing, S., Gong, Z., Mu, W. & Xing, Q. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm.* **2014**, 507208 (2014).
114. Guillén, I., Blanes, M., Gómez-Lechón, M. J. & Castell, J. V. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am. J. Physiol.* **269**, R229-235 (1995).

115. Galea, J. *et al.* Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1000–1006 (1996).
116. Dewberry, R., Holden, H., Crossman, D. & Francis, S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2394–2400 (2000).
117. Patti, G. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist: a sensitive marker of instability in patients with coronary artery disease. *J. Thromb. Thrombolysis* **14**, 139–143 (2002).
118. Kastrati, A. *et al.* Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 2168–2173 (2000).
119. Shi, X., Xie, W.-L., Kong, W.-W., Chen, D. & Qu, P. Expression of the NLRP3 Inflammasome in Carotid Atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **24**, 2455–2466 (2015).
120. Afrasyab, A. *et al.* Correlation of NLRP3 with severity and prognosis of coronary atherosclerosis in acute coronary syndrome patients. *Heart Vessels* **31**, 1218–1229 (2016).
121. Portincasa, P. Colchicine, Biologic Agents and More for the Treatment of Familial Mediterranean Fever. The Old, the New, and the Rare. *Curr. Med. Chem.* **23**, 60–86 (2016).
122. Emmi, G. *et al.* Use of Interleukin-1 Blockers in Pericardial and Cardiovascular Diseases. *Curr Cardiol Rep* **20**, 61 (2018).
123. Moriya, J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol* (2018). doi:10.1016/j.jjcc.2018.05.010
124. Kendrick, J. *et al.* Effect of lovastatin on primary prevention of cardiovascular events in mild CKD and kidney function loss: a post hoc analysis of the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *Am. J. Kidney Dis.* **55**, 42–49 (2010).

125. Ridker, P. M. *et al.* Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet* **391**, 319–328 (2018).
126. Kleveland, O. *et al.* Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur. Heart J.* **37**, 2406–2413 (2016).
127. Hong, D. S. *et al.* MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 α in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol.* **15**, 656–666 (2014).
128. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 104–116 (2015).
129. Yvan-Charvet, L. *et al.* Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* **118**, 1837–1847 (2008).
130. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* **11**, 155–161 (2010).
131. Björkbacka, H. *et al.* Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat. Med.* **10**, 416–421 (2004).
132. Venteclef, N. *et al.* GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* **24**, 381–395 (2010).

133. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* **25**, 57–70 (2007).
134. Rosenson, R. S. *et al.* Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* **125**, 1905–1919 (2012).
135. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. The acute phase response inhibits reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **51**, 682–684 (2010).
136. Sherer, Y. & Shoenfeld, Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**, 99–106 (2006).
137. McGillicuddy, F. C. *et al.* Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* **119**, 1135–1145 (2009).
138. Shao, B. *et al.* Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase. *Circ. Res.* **114**, 1733–1742 (2014).
139. Huang, Y. *et al.* An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nat. Med.* **20**, 193–203 (2014).
140. Collier, B. S. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 658–670 (2005).
141. Westerterp, M. *et al.* ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ. Res.* **114**, 157–170 (2014).
142. Ganjali, S. *et al.* Monocyte-to-HDL-cholesterol ratio as a prognostic marker in cardiovascular diseases. *J. Cell. Physiol.* (2018). doi:10.1002/jcp.27028
143. Tolani, S. *et al.* Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic stem cell proliferation and monocytosis: studies in mice and FH children. *Atherosclerosis* **229**, 79–85 (2013).

144. van Kampen, E., Jaminon, A., van Berkel, T. J. C. & Van Eck, M. Diet-induced (epigenetic) changes in bone marrow augment atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 833–841 (2014).
145. Willy, P. J. *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* **9**, 1033–1045 (1995).
146. Apfel, R. *et al.* A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7025–7035 (1994).
147. Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 459–481 (2000).
148. Auboeuf, D. *et al.* Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 1319–1327 (1997).
149. Chen, M., Beaven, S. & Tontonoz, P. Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J. Lipid Res.* **46**, 2570–2579 (2005).
150. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**, 1866–1870 (2001).
151. Wiebel, F. F. & Gustafsson, J. A. Heterodimeric interaction between retinoid X receptor alpha and orphan nuclear receptor OR1 reveals dimerization-induced activation as a novel mechanism of nuclear receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3977–3986 (1997).
152. Edwards, P. A., Kennedy, M. A. & Mak, P. A. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 249–256 (2002).

153. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728–731 (1996).
154. Hiebl, V., Ladurner, A., Latkolik, S. & Dirsch, V. M. Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnol. Adv.* (2018). doi:10.1016/j.biotechadv.2018.03.003
155. Gabbi, C., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å. Action mechanisms of Liver X Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 647–650 (2014).
156. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121–141 (2000).
157. Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K. & Beltowski, J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **61**, 736–759 (2007).
158. Lehmann, J. M. *et al.* Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 3137–3140 (1997).
159. Yang, C. *et al.* Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **281**, 27816–27826 (2006).
160. Fu, X. *et al.* 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 38378–38387 (2001).
161. Björkhem, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J. Clin. Invest.* **110**, 725–730 (2002).
162. Leonarduzzi, G., Sottero, B. & Poli, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.* **13**, 700–710 (2002).

163. Schroepfer, G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
164. Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A. & Saez, E. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* **581**, 1721–1726 (2007).
165. Houck, K. A. *et al.* T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab.* **83**, 184–187 (2004).
166. Ou, J. *et al.* Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6027–6032 (2001).
167. Yoshikawa, T. *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem.* **277**, 1705–1711 (2002).
168. Forman, B. M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G. J. & Evans, R. M. The orphan nuclear receptor LXRA is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10588–10593 (1997).
169. Berrodin, T. J. *et al.* Identification of 5 α , 6 α -epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity. *Mol. Pharmacol.* **78**, 1046–1058 (2010).
170. Thomas, J. *et al.* A chemical switch regulates fibrate specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) versus liver X receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 2403–2410 (2003).
171. Chinetti, G. *et al.* PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* **7**, 53–58 (2001).

172. Forcheron, F., Cachefo, A., Thevenon, S., Pinteaur, C. & Beylot, M. Mechanisms of the triglyceride- and cholesterol-lowering effect of fenofibrate in hyperlipidemic type 2 diabetic patients. *Diabetes* **51**, 3486–3491 (2002).
173. Laffitte, B. A. *et al.* Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7558–7568 (2001).
174. Jiang, W. *et al.* Inhibition of LXRA signaling by vitamin D receptor: possible role of VDR in bile acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 176–184 (2006).
175. Chiang, J. Y., Kimmel, R. & Stroup, D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* **262**, 257–265 (2001).
176. Tobin, K. A. R. *et al.* Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 10691–10697 (2002).
177. Lundholm, L. *et al.* Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J. Mol. Endocrinol.* **32**, 879–892 (2004).
178. Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L. & von Eckardstein, A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 655–666 (2006).
179. Tontonoz, P. Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 129–137 (2011).
180. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 28240–28245 (2000).
181. Kennedy, M. A. *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* **1**, 121–131 (2005).

182. Brunham, L. R. *et al.* Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ. Res.* **99**, 672–674 (2006).
183. Wang, M.-D. *et al.* Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways. *J. Lipid Res.* **48**, 633–645 (2007).
184. Rigamonti, E. *et al.* Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ. Res.* **97**, 682–689 (2005).
185. Laffitte, B. A. *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 507–512 (2001).
186. Mak, P. A. *et al.* Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 31900–31908 (2002).
187. Cao, G. *et al.* Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**, 39561–39565 (2002).
188. Laffitte, B. A. *et al.* The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2182–2191 (2003).
189. Masson, D. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse. *J. Lipid Res.* **45**, 543–550 (2004).
190. Goodwin, B. *et al.* Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* **17**, 386–394 (2003).

191. Verreault, M. *et al.* The liver X-receptor alpha controls hepatic expression of the human bile acid-glucuronidating UGT1A3 enzyme in human cells and transgenic mice. *Hepatology* **44**, 368–378 (2006).
192. Repa, J. J. *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–18800 (2002).
193. Back, S. S. *et al.* Cooperative transcriptional activation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 genes by nuclear receptors including Liver-X-Receptor. *BMB Rep* **46**, 322–327 (2013).
194. Yu, L. *et al.* Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* **278**, 15565–15570 (2003).
195. Duval, C. *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1259–1263 (2006).
196. Ahn, S. B., Jun, D. W., Jang, K., Lee, B. H. & Shin, K. J. Duodenal Niemann-Pick C1-like 1 expression was negatively correlated with liver X receptor expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J. Intern. Med.* (2018). doi:10.3904/kjim.2017.100
197. Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A. & Brown, M. S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35–46 (2006).
198. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R. & Tontonoz, P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* **325**, 100–104 (2009).
199. Ulven, S. M., Dalen, K. T., Gustafsson, J.-A. & Nebb, H. I. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **73**, 59–63 (2005).
200. Shimano, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* **40**, 439–452 (2001).

201. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W. C. & Ntambi, J. M. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6786–6798 (2006).
202. Joseph, S. B. *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 11019–11025 (2002).
203. Cha, J.-Y. & Repa, J. J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* **282**, 743–751 (2007).
204. Hegarty, B. D. *et al.* Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 791–796 (2005).
205. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–2838 (2000).
206. Kirchgessner, T. G. *et al.* Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **24**, 223–233 (2016).
207. Ito, A. *et al.* LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife* **4**, e08009 (2015).
208. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
209. Castrillo, A., Joseph, S. B., Marathe, C., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* **278**, 10443–10449 (2003).

210. Fontaine, C. *et al.* Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ. Res.* **101**, 40–49 (2007).
211. Reis e Sousa, C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* **16**, 27–34 (2004).
212. Töröcsik, D. *et al.* Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J. Immunol.* **184**, 5456–5465 (2010).
213. Go, A. S. *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **129**, 399–410 (2014).
214. Bornfeldt, K. E. & Tabas, I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.* **14**, 575–585 (2011).
215. Bradshaw, E. M. *et al.* Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J. Immunol.* **183**, 4432–4439 (2009).
216. Litherland, S. A. *et al.* Aberrant monocyte prostaglandin synthase 2 (PGS2) expression in type 1 diabetes before and after disease onset. *Pediatr Diabetes* **4**, 10–18 (2003).
217. Shanmugam, N., Kim, Y. S., Lanting, L. & Natarajan, R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* **278**, 34834–34844 (2003).
218. Cipollone, F. *et al.* The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* **108**, 1070–1077 (2003).
219. Kanter, J. E. *et al.* Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E715-724 (2012).

220. Koehrer, P. *et al.* Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy. *PLoS ONE* **9**, e106912 (2014).
221. Denimal, D. *et al.* Significant abnormalities of the HDL phosphosphingolipidome in type 1 diabetes despite normal HDL cholesterol concentration. *Atherosclerosis* **241**, 752–760 (2015).
222. Burke, A. P. *et al.* Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1266–1271 (2004).
223. Moreno, P. R. *et al.* Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* **102**, 2180–2184 (2000).
224. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* **111**, 6130–6185 (2011).
225. Barber, M. N. *et al.* Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLoS ONE* **7**, e41456 (2012).
226. Croset, M., Brossard, N., Polette, A. & Lagarde, M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem. J.* **345 Pt 1**, 61–67 (2000).
227. Okudaira, M. *et al.* Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. *J. Lipid Res.* **55**, 2178–2192 (2014).
228. Kazachkov, M., Chen, Q., Wang, L. & Zou, J. Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids* **43**, 895–902 (2008).
229. Shiu, S. W. M., Tan, K. C. B., Huang, Y. & Wong, Y. Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. *Atherosclerosis* **198**, 441–447 (2008).

230. Ménégaut, L. *et al.* Specific enrichment of 2-arachidonoyl-lysophosphatidylcholine in carotid atheroma plaque from type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* (2016). doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.004
231. Pete, M. J. & Exton, J. H. Purification of a lysophospholipase from bovine brain that selectively deacylates arachidonoyl-substituted lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **271**, 18114–18121 (1996).
232. Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Sugiura, T. & Waku, K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 281–288 (1996).
233. Aoki, J., Inoue, A. & Okudaira, S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 513–518 (2008).
234. Rother, E. *et al.* Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* **108**, 741–747 (2003).
235. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol* **54**, 2129–2138 (2009).
236. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
237. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 104–116 (2015).
238. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* **11**, 155–161 (2010).
239. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).

240. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
241. Spann, N. J. *et al.* Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* **151**, 138–152 (2012).
242. Wang, B. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* (2018). doi:10.1038/s41574-018-0037-x
243. Venteclef, N. *et al.* GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* **24**, 381–395 (2010).
244. Ghisletti, S. *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* **25**, 57–70 (2007).
245. Ito, A. *et al.* LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife* **4**, e08009 (2015).
246. Fontaine, C. *et al.* Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ. Res.* **101**, 40–49 (2007).
247. Monaco, C. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation* **120**, 2462–2469 (2009).
248. Rébé, C. *et al.* Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circ. Res.* **105**, 393–401 (2009).
249. Tripathi, S. *et al.* Meta- and Orthogonal Integration of Influenza ‘OMICs’ Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe* **18**, 723–735 (2015).
250. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2009).

251. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
252. Zuercher, W. J. *et al.* Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **53**, 3412–3416 (2010).
253. Zhang, W. *et al.* Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *J. Neuroimmunol.* **174**, 63–73 (2006).
254. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
255. Na, T.-Y. *et al.* Positive cross-talk between hypoxia inducible factor-1 α and liver X receptor α induces formation of triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2949–2956 (2011).
256. Moreno-Manzano, V. *et al.* FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J. Biol. Chem.* **285**, 1333–1342 (2010).
257. Kase, E. T. *et al.* Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* **54**, 1108–1115 (2005).
258. Walczak, R. *et al.* Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 9905–9911 (2004).
259. Sluimer, J. C. *et al.* Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1258–1265 (2008).
260. Folco, E. J., Sukhova, G. K., Quillard, T. & Libby, P. Moderate Hypoxia Potentiates Interleukin-1 β Production in Activated Human Macrophages. *Circ Res* **115**, 875–883 (2014).

261. Pehkonen, P. *et al.* Genome-wide landscape of liver X receptor chromatin binding and gene regulation in human macrophages. *BMC Genomics* **13**, 50 (2012).
262. Feldmann, R. *et al.* Genome-wide analysis of LXR α activation reveals new transcriptional networks in human atherosclerotic foam cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3518–3531 (2013).
263. Walczak-Drzewiecka, A., Ratajewski, M., Pułaski, Ł. & Dastyk, J. DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1028–1032 (2010).
264. Pierre, C. C. *et al.* Methylation-dependent regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha gene expression by the transcription factor Kaiso. *Biochim. Biophys. Acta* **1849**, 1432–1441 (2015).
265. Muse, E. D. *et al.* Cell-specific discrimination of desmosterol and desmosterol mimetics confers selective regulation of LXR and SREBP in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E4680–E4689 (2018).
266. Sarrazy, V. *et al.* Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of ApoE(-/-) Mice. *Circ. Res.* **118**, 1062–1077 (2016).
267. Folco, E. J. *et al.* Hypoxia But Not Inflammation Augments Glucose Uptake in Human Macrophages: Implications for Imaging Atherosclerosis With 18Fluorine-Labeled 2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography. *Journal of the American College of Cardiology* **58**, 603–614 (2011).
268. Nishizawa, T. *et al.* Testing the role of myeloid cell glucose flux in inflammation and atherosclerosis. *Cell Rep* **7**, 356–365 (2014).

269. Westerterp, M. *et al.* Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis and Atherogenesis. *Circulation* (2018). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032636
270. Kirchgessner, T. G. *et al.* Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **24**, 223–233 (2016).
271. Hong, C. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 433–444 (2014).
272. Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
273. Lampropoulou, V. *et al.* Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* **24**, 158–166 (2016).
274. Groh, L., Keating, S. T., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Riksen, N. P. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* **40**, 203–214 (2018).
275. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=moulton+heller+konerding>. (Accessed: 9th May 2018)
276. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337–1340 (2001).
277. Koslowski, M., Luxemburger, U., Türeci, O. & Sahin, U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1 α . *Oncogene* **30**, 876–882 (2011).

278. Wang, G. L. & Semenza, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 4304–4308 (1993).
279. Wang, G. L. & Semenza, G. L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**, 21513–21518 (1993).
280. Na, T.-Y. *et al.* Positive cross-talk between hypoxia inducible factor-1 α and liver X receptor α induces formation of triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2949–2956 (2011).
281. Varin, A. *et al.* Liver X receptor activation promotes polyunsaturated fatty acid synthesis in macrophages: relevance in the context of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1357–1365 (2015).
282. Matsuura, Y. *et al.* Altered glucose metabolism and hypoxic response in alloxan-induced diabetic atherosclerosis in rabbits. *PLoS ONE* **12**, e0175976 (2017).
283. Ross, S. & Paré, G. Pharmacogenetics of Stroke. *Stroke* **49**, 2541–2548 (2018).
284. Ogawa, H. *et al.* Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA* **300**, 2134–2141 (2008).
285. Gilpin, V. L., American Diabetes Association, American Heart Association & American College of Cardiology Foundation. Review of an article: aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes. A position statement of the American Diabetes Association (ADA), a scientific statement of the American Heart Association(AHA), and an expert consensus document of the American College of Cardiology Foundation (ACCF). *Diabetes Care*, 33:6; June 2010; 1395-1402. *J Vasc Nurs* **28**, 154–155 (2010).
286. Bazan, H. A. *et al.* Circulating inflammation-resolving lipid mediators RvD1 and DHA are decreased in patients with acutely symptomatic carotid disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **125**, 43–47 (2017).

Titre : Modulation de la réponse inflammatoire par les récepteurs LXRs. Etude comparative entre les macrophages humains et murins dans le contexte de l'athérosclérose

Mots clés : athérosclérose ; inflammation ; interleukine-1 β ; Hypoxia inducible factor 1 alpha

Résumé : Les thérapies anti-inflammatoires ciblant l'interleukine-1 β (IL-1 β) réduisent significativement la récurrence des événements cardiovasculaires. L'accumulation de cholestérol dans les macrophages et les plaques d'athérome favorise l'inflammation mais le rôle des récepteurs LXR (*Liver X Receptors*), senseurs du cholestérol intracellulaire, dans la régulation de la sécrétion d'IL-1 β est mal connu. Nous avons traité des macrophages murins et humains pendant 48 heures avec des agonistes LXR avant une stimulation des récepteurs TLR (*Toll-like Receptor*). Nous avons observé une augmentation spécifique des taux d'ARNm d'*IL1B* indépendamment de toute activation des TLRs. Ces effets étaient absents des macrophages murins et médiés par une activation d'HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*) par LXR. D'autres voies dépendantes d'HIF-1 α , telle la glycolyse, étaient également potentialisées par les agonistes LXR. De plus, l'activation de LXR couplée à une stimulation du récepteur TLR2 et à l'activation de l'inflammasome induisait une sécrétion d'IL-1 β par les macrophages. Le traitement des macrophages humains par des homogénats de plaques d'athérome carotidiennes augmentait significativement les taux d'ARNm d'*IL1B* de façon LXR-dépendante. Enfin, nous avons mis en évidence une colocalisation d'IL-1 β , d'HIF-1 α et de LXR α dans les zones macrophagiques des plaques d'athérome. Nous identifions donc ici une nouvelle voie régulée par LXR impliquée dans la production d'IL-1 β par les macrophages humains. Ceci pourrait ouvrir la voie au développement d'inhibiteurs de LXR ciblés sur la production d'IL-1 β .

Title: Modulation of the inflammatory response by LXRs receptors. Comparative study between human and murine macrophages in the context of atherosclerosis

Keywords: atherosclerosis; inflammation; interleukine-1 β ; Hypoxia inducible factor 1 alpha

Abstract: Anti-inflammatory therapy inhibiting interleukin-1 β (IL-1 β) significantly reduces the rate of recurrent cardiovascular events. The role of Liver X Receptors (LXRs), which are important cellular cholesterol sensors, in regulating IL-1 β production in human macrophages remains to be fully established. Mouse and human macrophages were treated with LXR agonists for 48h before Toll-Like Receptor stimulation. We observed that, LXR agonist treatment increases selectively *IL1B* mRNA levels independently of any TLR activation. This effect was restricted to human macrophages and was mediated by an activation of HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha) by LXRs. Interestingly, LXR agonist also potentiates other HIF-1 α dependent pathways such as glycolysis. Moreover, activation of LXR coupled with the induction of TLR2 by Pam3CSK4 and ATP-mediated activation of inflammasome resulted in an increased secretion of mature IL-1 β by macrophages. Treatment of human macrophages with homogenates from carotid plaques samples significantly increased *IL1B* mRNA levels in an LXR-dependent manner. Finally, we show that IL-1 β colocalizes with HIF-1 α and LXR α in macrophage-rich area of human carotid artery plaques. Our study identifies a new LXR-regulated pathway involved in the production of IL-1 β by human macrophages. Thus, our work opens up new perspectives regarding the development of selective LXR modulators to inhibit IL-1 β production.