

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : *Physiopathologie moléculaire, cellulaire et intégrée*

---

Présentée et soutenue par *Aurélie FABRE*  
Le 28 Octobre 2010

**Titre :**  
*REGULATION ET IMPLICATION PHYSIOLOGIQUE  
DE LA VOIE ECTO-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>  
DANS LE TRANSPORT RETOUR DU CHOLESTEROL*

---

### JURY

*Pr. Albert GROEN  
Dr. Philippe COSTET  
Pr. Bertrand PERRET  
Dr. Laurent MARTINEZ  
Dr. Xavier COLLET*

*Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Invité*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie - Santé - Biotechnologie*  
**Unité de recherche :** *INSERM U563, CPTP*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. Laurent MARTINEZ, Dr. Xavier COLLET*



**À mes parents et mon frère, Eric,  
merci pour votre amour et votre soutien,  
je vous dois beaucoup...**



**À Frédéric,  
merci pour ton amour  
et de m'avoir donné la force nécessaire  
pour aller jusqu'au bout...**



# REMERCIEMENTS

Ces premières lignes témoignent de ma gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

**Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury de thèse.**

Monsieur le **Professeur Bertrand Perret**, merci de m'avoir fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse. Je vous suis également reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre département.

Messieurs le **Professeur Albert Groen** et le **Docteur Philippe Costet**, je suis honorée de votre investissement dans la lecture de cette thèse et je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le **Docteur Xavier Collet**, merci pour ta participation à mon jury. Je te remercie également pour m'avoir accueillie dans ton équipe, pour tes encouragements et ton soutien tout au long de ces années.

Monsieur le **Docteur Laurent Martinez**, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe Avenir, de m'avoir stimulée et soutenue pendant ces cinq années. Je te remercie également pour avoir supervisé ce travail avec beaucoup de bienveillance ainsi que pour tes idées et précieux conseils qui nous ont permis d'avancer dans ce travail. Merci pour ton temps, ta patience et ton aide tout au long de cette thèse et durant l'écriture de ce manuscrit.

**Je remercie bien sûr l'ensemble des membres du bâtiment C qui ont rendu ces années très agréables et enrichissantes. J'ai eu la chance de rencontrer durant ces années passées dans ce « DOM-TOM » du CPTP des amis formidables.**

### **Mes compagnons des manip souris**

**Michel**, « mon » ou plutôt « notre » Super Michel, ce fut un réel honneur et plaisir de travailler avec toi. Je te dis un grand merci pour toute ton aide, ta gentillesse et pour la patience que tu as eu pour m'assister au cours de ces longues journées de cannulations dans la pièce animalerie. Tu m'as appris énormément de choses, je te dois beaucoup pour mon savoir-faire en expérimentation animale. Merci pour m'avoir remotivée quand les manip ne marchaient pas, pour ta bonne humeur et tes chansonnettes qui rendaient ces journées moins difficiles.

Je remercie également **Guillaume** qui lui aussi m'a beaucoup aidé au cours des manip souris et de mes journées d'extraction lipidique. Merci pour ton amitié et tous ces bons moments que l'on a passé dans la pièce animalerie et en dehors. Travailler avec toi a été très agréable et très enrichissant, ta culture générale est immense (il faut l'avouer, tu es le seul à connaître le score de la finale de la coupe du monde de 1978, et la méthode de séduction des hyènes par exemple). Je te souhaite le meilleur pour ta carrière.

### **Ma grande soeur**

**Véro**, une grande sœur pour moi, je pourrais même dire une seconde maman. Un grand merci à toi de m'avoir encouragée et de m'avoir réconfortée quand le moral n'allait pas. Tu as toujours été là quand j'en avais besoin : la rédaction (une étape difficile pour moi), les corrections, l'impression des manuscrits pour les rapporteurs (petite info pour les suivants, Véro est une championne de la relieuse), les soirées sans Frédéric, ma soutenance (merci d'avoir annulé tes vacances de Toussaint pour me soutenir avant et pendant ma soutenance). Je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi. Merci pour tous ces bons moments que l'on a partagé et j'espère qu'ils seront encore nombreux. Je suis vraiment très heureuse d'avoir fait ta connaissance et j'espère que nos chemins continueront à se croiser pendant très longtemps pour des soirées « Mojito » (il nous reste encore beaucoup de Mojitos à tester sur Toulouse pour établir notre Top10). Je te souhaite que du bonheur autant au niveau personnel que professionnel.

## **Mes compagnons de sorties du labo**

### **Véro et Guillaume...**

**Coco**, je te remercie pour ton aide, ton soutien et ta disponibilité malgré ton planning quotidien surchargé. Je garde un très bon souvenir des moments et soirées que l'on a passés ensemble (je n'oublierais jamais la soirée « Verveine »). J'espère que tout se passera bien pour toi dans ta nouvelle équipe.

**Chris**, on a mis longtemps à se connaître mais ça valait le coup. Merci de ton soutien et de ta gentillesse (eh oui même une hyène peut être gentille). Je te souhaite le meilleur pour tes projets.

**Christine**, merci pour tous tes encouragements et je te souhaite le meilleur pour tes futurs projets.

**Nizar**, merci pour ton aide au cours de ma dernière année. Ça a été un plaisir pour moi de travailler et de cohabiter avec toi dans le même bureau. Je te souhaite bon courage pour ta thèse.

**Anne**, je peux même dire maintenant Docteur Fougerat. Merci pour ton extrême gentillesse, ta bonne humeur et ton entrain. Je garde un très bon souvenir de nos petits séjours à Biarritz et Avignon pour la NSFA. Je te souhaite plein de bonheur avec ta future famille et le meilleur pour tes futurs projets.

**Marianne**, la pro du badminton (fait attention à toi quand même, la raquette doit seulement taper dans le volant), merci pour ta gentillesse, ta convivialité et ta joie de vivre.

**Vincent**, le petit jeune du labo, ton arrivée au labo m'a fait prendre un sacré coup de vieux. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

**Emmanuel**, notre Sauveur de vie, merci pour ta simplicité, ta bonne humeur et ta gentillesse malgré ton emploi du temps surchargé entre l'Hôpital des Enfants et le labo. Tu fais un métier fabuleux et ça fait plaisir de rencontrer des personnes comme toi qui aiment autant leur métier. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

**Natalia et Emily**, notre Belge préféré, merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Je vous souhaite bon courage pour la suite.

**Stéphanie**, merci pour ta gentillesse, tes encouragements et ton soutien. Je te souhaite le meilleur pour tes projets personnels et professionnels (la prochaine fois c'est la bonne, tu vas l'avoir ce concours)

### **Mes compagnons du repas de midi**

**Véro**, ton « J'ai faim ! J'ai faim ! J'ai faim ! » me manque déjà.

**Muriel**, merci pour ton dynamisme et ta bonne humeur.

**Stéphanie, Anne, Armelle, Audrey, Justine, Véronique, Nicole, Fabienne et Yvette**, je vous remercie pour votre bonne humeur et tous ces bons moments passés à la table café pour le déjeuner, ce fut très agréable de partager cette petite pause avec vous.

### **Les autres habitants du bâtiment C**

**François**, une véritable bible sur les lipides, merci pour les réponses que tu as apporté à mes questions. Je te remercie également pour ta bonne humeur et ton rire communicatif que l'on pouvait entendre du 2<sup>ème</sup> étage au rez-de-chaussée.

**Justine et Véronique**, les pros de la lipidomique, merci pour vos services, votre bonne humeur et tous vos encouragements. Je garderai un bon souvenir des journées d'extraction lipidique passées dans votre labo.

**Stéphane et Gérald**, les inséparables, merci pour votre bonne humeur et votre humour.

**Eric**, merci pour ton soutien et tes encouragements. Je te souhaite le meilleur pour tes projets dans ta nouvelle équipe d'accueil.

**Céline et Annelise**, merci pour votre soutien et vos encouragements.

**Laetitia**, bon courage pour la reprise du sujet.

Tous les membres de l'équipe de **Jean-Luc Davignon, Michel, Myriam et Emily**, ce fut un grand plaisir de vous rencontrer.

**Je remercie également les différentes plateformes techniques** avec lesquelles j'ai pu interagir au cours de ces années : le service de zootechnie, le plateau technique d'imagerie cellulaire plus particulièrement **Sophie**, le plateau technique de cytométrie, notamment **Fatima** pour sa bonne humeur et sa disponibilité, et bien sûr le plateau de lipidomique, **Justine et Véronique**.

### **Mes ex-thésards préférés :**

**Camille, Flo et Pierre**, je vous remercie tout d'abord de vous être déplacés pour ma soutenance, ça m'a fait vraiment chaud au cœur. Promis, je vais moi aussi faire l'effort de venir vous voir dans vos pays d'adoption.

**Camille**, un très grand merci également pour tous ces bons moments passés ensemble au labo, en particulier dans la pièce animalerie, et en dehors du labo. Ce fut un réel plaisir pour moi de

travailler avec toi et de faire notre initiation en expérimentation animale ensemble. Je te remercie également pour les corrections que tu as apportés à mon manuscrit malgré tes journées surchargées. Je te souhaite le meilleur pour la poursuite de ta carrière (une multitude de publications dans ton nouveau labo) et tous mes vœux de bonheur pour toi et Lilian.

**Pierre**, je te remercie pour les bons moments que l'on a passés durant notre agréable cohabitation dans le même bureau, même labo mais également dans les mêmes bars. Un grand merci pour les différents conseils que tu as pu me donner au cours de ces années. Tes connaissances scientifiques dans divers domaines m'ont toujours impressionnées, tu seras un très bon chercheur, je n'en doute pas. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

**Flo**, nous avons passé très peu de temps en commun au labo, mais j'ai été très heureuse de faire ta connaissance. Je te remercie pour les corrections que tu as apportées à ce manuscrit. Je te souhaite le meilleur pour la poursuite de ta carrière.

**Claudia**, tu m'as manqué lors de cette journée. Heureusement que l'on peut papoter de temps en temps par mail.

Et pour finir, je souhaite remercier ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée de son amour au cours de mes études interminables. **Maman** et **Papa**, merci de me permettre de voir la fierté dans vos yeux. **Maman**, je sais que ma soutenance a été un moment très difficile pour toi, promis je ne te ferais plus jamais endurer ça. Je remercie également la famille de Frédéric qui n'a cessé de m'encourager et de me soutenir.

Et **Frédéric**, bien sûr, avec tout mon amour, merci pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour et la patience que tu as eu au cours de ces dernières années et plus particulièrement au cours de ces derniers mois. La voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> n'a plus de secret pour toi maintenant. Je te dédie tout mon amour et il est grand comme le taux de cholestérol cumulé de tous les terriens (et je crois que ça ne va pas faire en diminuant au cours des prochaines années...).



# SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>p.7</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>p.11</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>p.13</b>
<b>CHAPITRE I:</b>	
<b>HOMEOSTASIE DU CHOLESTEROL ET REGULATIONS</b> .....	
<b>1) Les lipoprotéines : les transporteurs de cholestérol</b> .....	<b>p.19</b>
<b>2) Les différentes sources du cholestérol</b> .....	<b>p.21</b>
2-1) Voie exogène : Absorption intestinale et régulations.....	p.22
2-1-1) Les récepteurs impliqués .....	p.22
2-1-2) Régulations de l'absorption intestinale.....	p.24
2-1-2-1) Régulation LXR (Liver X receptor) dépendante.....	p.24
2-1-2-2) Régulation LXR indépendante.....	p.24
2-1-3) Le devenir du cholestérol absorbé.....	p.25
2-1-3-1) Voie de sécrétion du cholestérol dépendante de l'apoB48 :	
les chylomicrons.....	p.25
2-1-3-2) Voie de sécrétion du cholestérol indépendante de l'apoB48:	
les HDL intestinales.....	p.28
2-2) Voie endogène : synthèse endogène du cholestérol et régulations.....	p.29
<b>3) Apport du cholestérol aux tissus périphériques</b> .....	<b>p.32</b>
3-1) Assemblage hépatique des VLDL.....	p.32
3-2) Voie d'apport aux tissus périphériques.....	p.34
<b>4) Transport retour du cholestérol (RCT)</b> .....	<b>p.37</b>
4-1) Structure des HDL.....	p.38
4-2) Biogenèse des HDL.....	p.38
4-2-1) ApoA-I et formation des pré $\beta$ -HDL.....	p.38
4-2-2) Efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques.....	p.40
4-2-2-1) ABCA1.....	p.41
4-2-2-2) ABCG1.....	p.43
4-2-2-3) SR-B1.....	p.44
4-3) Remodelage plasmatique des HDL.....	p.44
4-3-1) LCAT (Lecithin : Cholesterol Acyltransferase).....	p.44
4-3-2) PLTP (Phospholipid Transfer Protein).....	p.45
4-3-3) CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein).....	p.47

4-3-4) Lipase hépatique et lipase endothéliale .....	p.48
4-4) Captation hépatique des HDL .....	p.50
4-4-1) SR-B1 et la captation sélective du cholestérol ester .....	p.51
4-4-2) La voie ecto-F <sub>1</sub> -ATPase/ P2Y <sub>13</sub> .....	p.55
4-4-2-1) Collaboration de deux sites de liaison hépatiques aux HDL pour l'endocytose de l'holoparticule HDL .....	p.55
4-4-2-2) Le site de haute affinité : l'ecto-F <sub>1</sub> -ATPase .....	p.55
4-4-2-3) P2Y <sub>13</sub> : le récepteur à l'ADP .....	p.58
4-4-2-4) Cascade de signalisation en aval de P2Y <sub>13</sub> .....	p.59
4-5) Elimination biliaire du cholestérol .....	p.61
4-5-1) Biosynthèse des acides biliaires .....	p.62
4-5-2) Transport hépatobiliaire des acides biliaires .....	p.64
4-5-3) Transport hépatobiliaire du cholestérol .....	p.65
4-5-4) Cycle entérohépatique des acides biliaires .....	p.66
4-6) Régulation du transport retour du cholestérol par les récepteurs nucléaires .....	p.68
4-6-1) Les LXRs .....	p.68
4-6-2) FXR .....	p.70
<b>5) L'excrétion transintestinale du cholestérol : le TICE .....</b>	<b>p.72</b>
5-1) Mise en évidence d'un nouveau rôle de l'intestin dans le RCT .....	p.72
5-2) Quels sont les transporteurs impliqués dans le TICE ? .....	p.73
5-3) Mécanismes régulant le TICE .....	p.74

## **CHAPITRE II: ATHEROSCLEROSE:**

### **APPROCHES THERAPEUTIQUES CIBLANT LES HDL .....**

<b>1) Athérosclérose et HDL .....</b>	<b>p.79</b>
1-1) Développement de l'athérosclérose .....	p.79
1-1-1) Initiation: Dysfonction et activation de l'endothélium .....	p.82
1-1-2) Développement de la strie lipidique et inflammation .....	p.84
1-1-3) Développement de la chape fibreuse .....	p.86
1-1-4) Instabilité de la plaque d'athérome et thrombose .....	p.88
1-2) Différents rôles athéroprotecteurs des HDL .....	p.90
1-2-1) Propriétés anti-oxydantes des HDL .....	p.90
1-2-2) Propriétés anti-inflammatoires des HDL .....	p.91
1-2-3) Propriétés protectives des HDL sur l'endothélium .....	p.94
1-2-4) Propriétés anti-thrombotiques des HDL .....	p.98
1-2-5) Altération des propriétés athéroprotectrices des HDL .....	p.100

<b>2) Approches thérapeutiques ciblant les HDL</b> .....	<b>p.101</b>
2-1) Augmentation des taux de HDL plasmatiques.....	p.102
2-1-1) Stratégies non pharmacologiques.....	p.102
2-1-1-1) L'exercice physique.....	p.102
2-1-1-2) La consommation d'alcool.....	p.103
2-1-1-3) La perte de poids.....	p.103
2-1-1-4) L'arrêt du tabac.....	p.103
2-1-2) Stratégies pharmacologiques courantes.....	p.104
2-1-2-1) Statines.....	p.104
2-1-2-2) Fibrates.....	p.105
2-1-2-3) Acide nicotinique ou Niacine.....	p.107
2-1-3) Nouvelles stratégies pharmacologiques.....	p.109
2-1-3-1) Augmentation des taux d'apoA-I.....	p.109
2-1-3-2) Inhibiteurs de la CETP.....	p.113
2-1-4) L'augmentation des taux plasmatiques de HDL est-elle vraiment la bonne stratégie?.....	p.115
2-2) Amélioration de la fonctionnalité des HDL.....	p.117
2-2-1) Peptide mimétique de l'apoA-I.....	p.117
2-2-2) Infusion d'apoA-I Milano.....	p.119
2-2-3) Stimuler la voie du RCT.....	p.121
2-2-3-1) Stimulation de l'efflux de cholestérol : agonistes du LXR.....	p.121
2-2-3-2) Action au niveau de la captation hépatique: augmenter le catabolisme des HDL.....	p.123

### **CHAPITRE III:**

#### **RESULTATS EXPERIMENTAUX ET PERSPECTIVES..... p.127**

<b>1) ARTICLE 1 : Mise en évidence d'une activité ecto-adénylate kinase régulant la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> d'endocytose des HDL par les hépatocytes humains</b> .....	<b>p.129</b>
1-1) Introduction.....	p.129
1-2) Article 1.....	p.131
1-3) Un ABC transporteur pourrait être responsable de l'activité adénylate kinase à la surface des hépatocytes.....	p.140
1-4) Conclusion.....	p.141
<b>2) ARTICLE 2 : Importance physiologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le transport retour du cholestérol</b> .....	<b>p.143</b>
2-1) Introduction.....	p.143
2-2) Article 2.....	p.145
2-3) Conclusion.....	p.153

<b>3) Implication du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose</b> .....	<b>p.154</b>
3-1) Introduction.....	p.154
3-2) Matériels et Méthodes.....	p.155
3-3) Résultats.....	p.156
3-3-1) Implication de P2Y <sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose en conditions de régime hypercholestérolémiant (HCD).....	p.156
3-3-2) Effet de l'inactivation de P2Y <sub>13</sub> sur le développement de l'athérosclérose chez des souris invalidées pour l'apoE.....	p.157
3-4) Conclusion.....	p.158
<b>4) Perspectives générales</b> .....	<b>p.159</b>
4-1) Voie ecto-F <sub>1</sub> -ATPase/P2Y <sub>13</sub> : mécanismes moléculaires et régulations.....	p.159
4-1-1) Caractérisation de la protéine à activité adénylate kinase à la surface des hépatocytes.....	p.159
4-1-2) Adressage de la F <sub>1</sub> -ATPase à la membrane plasmique.....	p.160
4-1-3) Régulation de l'expression de la F <sub>1</sub> -ATPase en surface cellulaire.....	p.161
4-2) Voie ecto-F <sub>1</sub> -ATPase/P2Y <sub>13</sub> et l'athérosclérose.....	p.163
4-2-1) P2Y <sub>13</sub> et la biogenèse des HDL.....	p.163
4-2-2) P2Y <sub>13</sub> , RCT et développement de l'athérosclérose.....	p.164
4-2-3) P2Y <sub>13</sub> et l'inflammation.....	p.165
4-2-4) Effet de l'activation de P2Y <sub>13</sub> sur le RCT et l'athérosclérose.....	p.166
4-2-5) Etude du RCT et du développement de l'athérosclérose dans un modèle invalidé pour P2Y <sub>13</sub> et SR-B1.....	p.166
4-2-6) Etude du développement de l'athérosclérose et du RCT dans un modèle "humanisé".....	p.167
4-2-7) P2Y <sub>13</sub> : une nouvelle cible en thérapeutique humaine ?.....	p.167
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>p.171</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>p.213</b>
ANNEXE 1: ARTICLE 3.....	p.215
ANNEXE 2.....	p.223
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>p.225</b>





## ABREVIATIONS

<b>ABC</b>	Adenosine triphosphate Binding Cassette
<b>ABCA1</b>	ATP Binding Cassette A1
<b>ABCB4</b>	ATP Binding Cassette B4
<b>ABCB4<sup>-/-</sup></b>	Souris invalidées pour ABCB4
<b>ABCB11</b>	ATP Binding Cassette B11
<b>ABCG1</b>	ATP Binding Cassette G1
<b>ABCG5</b>	ATP Binding Cassette G5
<b>ABCG8</b>	ATP Binding Cassette G8
<b>ACAT2</b>	Acylcoenzyme 17 cholesteryl acyltransferase 2
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AG</b>	Acides gras
<b>AK</b>	Adénylate Kinase
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>APC</b>	Protéine C activée
<b>apo</b>	Apolipoprotéine
<b>apoA-IM</b>	Apolipoprotéine A-I Milano
<b>apoE<sup>-/-</sup></b>	Souris invalidées pour l'apolipoprotéine E
<b>APR</b>	Acute Phase Response
<b>ARBITER</b>	Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing cholesterol
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ASBT</b>	Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BA</b>	Acides biliaires
<b>BAECs</b>	Cellules Endothéliales d'Aorte Bovine
<b>BAT</b>	Bile Acid Coenzyme A : amino acid N-acyltransferase
<b>BECAIT</b>	Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial
<b>bFGF</b>	basic Fibroblast Growth Factor
<b>bHLH-LZ</b>	basic-helix-loop-helix-leucine zipper
<b>BSEP</b>	Bile Salt Export Pump
<b>CA</b>	Acide cholique
<b>CDCA</b>	Acide chénodésoxycholique
<b>CETP</b>	Cholesterol Ester Transfer Protein
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
<b>CLA-1</b>	Homologue humain de SR-B1
<b>CMH-I</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
<b>CMH-II</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
<b>CMLs</b>	Cellules Musculaires Lisses
<b>CRP</b>	C-Reactive Protein
<b>CXCL-16</b>	CXC-Chemokine ligand 16
<b>CYP7A1</b>	Cholestérol 7 $\alpha$ hydroxylase
<b>CYP7B1</b>	Oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase
<b>CYP8B1</b>	Sterol 12 $\alpha$ hydroxylase
<b>CYP27A1</b>	Stérol 27-hydroxylase

<b>DGAT2</b>	Diacylglycerol AcylTransferase 2
<b>DMHCA</b>	N,N-diméthyl-3 $\beta$ -hydroxy-cholenamide
<b>DMPC</b>	Dimyristoylphosphatidylcholine
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DPPC</b>	Dipalmitoylphosphatidylcholine
<b>Drp1</b>	Dynamamin-related protein 1
<b>eNOS</b>	Oxyde nitrique synthétase endothéliale
<b>EPCs</b>	Précurseurs de cellules endothéliales
<b>ERASE</b>	Effect of rHDL on Atherosclerosis Safety and Efficacy
<b>FAS</b>	Fatty Acid Synthase
<b>FGF15</b>	Fibroblast Growth Factor 15
<b>FGFR4</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor 4
<b>Fis1</b>	Mitochondrial fission 1 protein
<b>FT</b>	Facteur Tissulaire
<b>FTF</b>	Fetoprotein Tanscription Factor
<b>FXR</b>	Farnesoid X Receptor
<b>FXREs</b>	FXR responsive elements
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>GPIHBP1</b>	Glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1
<b>HCD</b>	High Cholesterol Diet
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>HDL<sub>2</sub>-TG</b>	HDL <sub>2</sub> enrichies en triglycérides
<b>HDLr</b>	HDL reconstituées
<b>HepG<sub>2</sub></b>	Cellules d'hépatocarcinome humain
<b>HMG-CoA</b>	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A
<b>HSD3B7</b>	3beta-hydroxy C27 steroid deshydrogenase: isomérase
<b>HSP60</b>	Heat-Shock Protein 60
<b>HUVECs</b>	Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
<b>IBABP</b>	Intestinal Bile Acid-Binding Protein
<b>ICAM-1</b>	Inter Cellular Adhesion Molecule-1
<b>IDL</b>	Intermediate Density Lipoprotein
<b>IF<sub>1</sub></b>	Inhibitor Factor 1
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IGF-1</b>	Insulin Growth Factor 1
<b>IL-1</b>	Interleukin 1
<b>IL-10</b>	Interleukin 10
<b>ILLUMINATE</b>	Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact IN Atherosclerosis Events
<b>ILLUSTRATE</b>	Investigation of Lipid Level Management Using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis by CETP Inhibition and HDL Elevation
<b>IMT</b>	Intima-media thickness
<b>Kd</b>	Constante de dissociation

<b>LCAT</b>	Lecithin-Cholesterol Acyltransferase
<b>LEE</b>	Limitante Elastique Externe
<b>LEI</b>	Limitante Elastique Interne
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>LDLox</b>	LDL oxydées
<b>LDLR</b>	Récepteur des LDL
<b>LDLR<sup>-/-</sup></b>	Souris invalidées pour le LDLR
<b>LE</b>	Lipase Endothéliale
<b>LH</b>	Lipase Hépatique
<b>LOX-1</b>	Lecitin-type Oxidised low density lipoprotein-1
<b>LPL</b>	Lipoprotéine lipase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LRH-1</b>	Liver Receptor Homolog-1
<b>LRP</b>	LDL receptor-related protein
<b>LSF</b>	Lysosulfatide
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>LXR</b>	Liver X Receptor
<b>LXRE</b>	LXR response element
<b>MAPL</b>	Mitochondria-Anchored Protein Ligase
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein-1
<b>M-CSF</b>	Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>MDR1</b>	Multi Drug Resistance 1
<b>MIP-2</b>	Macrophage-Inflammatory Protein-2
<b>MMPs</b>	Matrix Metallo-proteases
<b>MPO</b>	Myélopéroxydase
<b>MTP</b>	Microsomal triglyceride transfert Protein
<b>NDPK</b>	Nucléoside DiPhosphoKinase
<b>NCTP</b>	Na <sup>+</sup> /Taurocholate cotransporting polypeptide
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor κB
<b>NO</b>	Oxyde Nitrique
<b>NPC1L1</b>	Niemann-Pick C1 like 1
<b>nSREPB</b>	nuclearSREBP
<b>OATP</b>	Organic Anion Transporting Polypeptide
<b>OPA1</b>	Optic atrophy protein 1
<b>PAECs</b>	Cellules endothéliales aortiques de porc
<b>PAF</b>	Platelet-Activating Factor
<b>PAF-AH</b>	Platelet-Activating Factor AcetylHydrolase
<b>PCSK9</b>	Proprotein Convertase subtilisin/kexin 9
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostacycline
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PKC</b>	Protéine Kinase C
<b>PL</b>	Phospholipides
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLTP</b>	Phospholipid Transfer Protein

<b>PON</b>	Paraoxonase
<b>PPAR</b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>pro-apoA-I</b>	Pro-apolipoprotéine A-I
<b>PUMA-G<sup>-/-</sup></b>	Souris invalidées pour le récepteur PUMA-G
<b>RCPG</b>	Récepteurs Couplés aux Protéines G
<b>RCT</b>	Transport Retour du Cholestérol
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>ROCK</b>	Kinases dépendantes des Rho
<b>ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>RXR</b>	Retinoid X Receptor
<b>S1P</b>	Sphingosine-1-Phosphate
<b>SAA</b>	Sérum Amyloïde A
<b>SCAP</b>	SREBP cleavage activating protein
<b>ScR</b>	Récepteur « Scavenger »
<b>SHP</b>	Small Heterodimer Partner
<b>SNP</b>	Polymorphisme nucléotidique simple
<b>shRNA</b>	Short hairpin RNA
<b>siRNA</b>	Short interference RNA
<b>SPC</b>	Sphingosyl-phosphorylcholine
<b>SR-AI</b>	Scavenger Receptor A type 1
<b>SR-B1</b>	Scavenger Receptor class B1
<b>SRE</b>	Sterol Responsive Element
<b>SREBPs</b>	Sterol Regulatory Element Binding Proteins
<b>StAR</b>	Steroidogenic Acute Regulatory
<b>t<sub>1/2</sub></b>	temps de demi-vie
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>TG</b>	Triglycérides
<b>TGF-β</b>	Transforming Growth Factor β
<b>TGF-β2</b>	Transforming Growth Factor- β2
<b>TICE</b>	Transintestinal Cholesterol Excretion
<b>TLRs</b>	Toll-like receptors
<b>TNFα</b>	Tumor Necrosis Factor α
<b>UDP</b>	Uridine diphosphate
<b>UTP</b>	Uridine triphosphate
<b>VA-HIT</b>	Veterans Affairs High Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell-Activation Molecule-1
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VLA-4</b>	Very Late Antigen-4
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein
<b>vWF</b>	Facteur de von Villebrand

## RESUME

Le rôle athéroprotecteur des HDL (High Density Lipoprotein) est principalement attribué à leur participation essentielle à la voie de Transport Retour du Cholestérol (RCT) dans laquelle les HDL épurent les cellules des tissus périphériques de leur excès de cholestérol pour ramener celui-ci au foie, où il sera éliminé *via* les voies biliaires. Notre équipe a décrit à la surface d'hépatocytes humains une nouvelle voie de captation des HDL dans laquelle l'apoA-I, la protéine majoritaire des HDL, se lie et active une ecto-F<sub>1</sub>-ATPase induisant la production d'ADP extracellulaire. Ce dernier active une signalisation dépendante du récepteur nucléotidique P2Y<sub>13</sub>, qui stimule *in fine* l'endocytose des holoparticules HDL (protéines et lipides).

Dans ces travaux, nous avons mis en évidence à la surface des hépatocytes humains un mécanisme de régulation de cette nouvelle voie d'endocytose des HDL. Celui-ci implique la participation d'une enzyme à activité adénylate kinase (AK : 2ADP → ATP + AMP). Nous avons observé qu'un traitement sur des hépatocytes humains (HepG<sub>2</sub> ou hépatocytes primaires humains) avec un inhibiteur d'activité AK, Ap5A, inhibe fortement la conversion de l'ADP en ATP dans le milieu extracellulaire. De plus, un traitement avec l'Ap5A stimule l'endocytose de HDL radiomarquées par les hépatocytes, effet qui est aboli en présence d'IF<sub>1</sub>, un inhibiteur de l'activité ATPase de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. Ainsi, à la surface des hépatocytes humains, une activité AK régule de façon constitutive et négativement l'endocytose des HDL en consommant l'ADP extracellulaire généré par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase.

Mes travaux ont également permis de démontrer l'implication physiologique de la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> dans le RCT *in vivo* chez la souris. En effet, après injection de macrophages chargés en cholestérol radiomarqué, nous avons observé une diminution de la radioactivité associée aux acides biliaires et aux lipides neutres dans les fèces des souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> en comparaison avec des souris sauvages. De plus, l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> chez la souris induit une diminution de la concentration hépatique en cholestérol et des sécrétions biliaires en cholestérol. Inversement, une activation de P2Y<sub>13</sub> par un traitement avec le Cangrelor, un agoniste partiel de P2Y<sub>13</sub>, induit une augmentation des sécrétions biliaires en cholestérol chez des souris sauvages ainsi que chez des souris invalidées pour SR-B1. Des résultats préliminaires suggèrent que l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> induit une augmentation du développement de l'athérosclérose chez la souris. Ainsi, une activation de la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique contre l'athérosclérose.



## AVANT PROPOS

Le cholestérol est un lipide essentiel de la cellule eucaryote. Il est un constituant vital des membranes plasmiques et permet de leur conférer fluidité et perméabilité. De plus, le cholestérol est le précurseur de différentes molécules telles que les hormones stéroïdiennes, la vitamine D et les acides biliaires, ces derniers étant indispensables à l'absorption intestinale du cholestérol.

L'homéostasie du cholestérol est un équilibre subtil entre son absorption intestinale à partir de l'alimentation, sa biosynthèse endogène essentiellement hépatique et son élimination dans les fèces sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires. Une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol peut être à l'origine d'une hypercholestérolémie qui est un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence que le taux plasmatique de HDL (High Density Lipoprotein) est inversement corrélé avec l'incidence des maladies cardiovasculaires. Le rôle athéroprotecteur des HDL est principalement attribué à leur participation essentielle dans la voie de Transport Retour du Cholestérol (RCT) qui est l'une des principales voies d'élimination du cholestérol dans l'organisme. Dans cette voie de transport retour du cholestérol, les HDL captent le cholestérol au niveau des cellules périphériques, puis le ramènent au niveau du foie où il sera dans un second temps sécrété dans la bile. Une partie de ce cholestérol sécrété dans la bile sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires sera réabsorbée par l'intestin et le reste sera éliminé dans les fèces. Par leur rôle dans le RCT et leurs différentes autres propriétés athéroprotectrices (anti-oxydant, anti-inflammatoire, anti-thrombotique, protection de l'endothélium...), les HDL apparaissent comme des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de l'athérosclérose.

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années au métabolisme des HDL et plus précisément à la captation hépatique de ces lipoprotéines qui constitue l'une des dernières étapes du RCT. Les travaux de l'équipe ont permis d'identifier au niveau d'hépatocytes humains, une nouvelle voie d'endocytose des HDL. Dans cette voie, la liaison de l'apoA-I, la protéine majoritaire des HDL, sur une ecto-F<sub>1</sub>-ATPase stimule son activité ATP hydrolase. L'ADP extracellulaire ainsi généré va induire l'activation du récepteur purinergique P2Y<sub>13</sub> conduisant à l'endocytose des holoparticules HDL (protéines et lipides) par un site de liaison de basse affinité d'identité encore inconnue. Cette nouvelle voie d'endocytose des HDL pourrait constituer une potentielle nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose. Ainsi, au cours de mon doctorat, je me suis intéressée aux

mécanismes de régulation de cette voie d'endocytose des HDL par les hépatocytes humains. Mes travaux ont permis de mettre en évidence, à la surface des hépatocytes humains, une activité adénylate kinase qui régule négativement et de façon constitutive l'endocytose des HDL en consommant l'ADP extracellulaire généré par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. La suite de mon doctorat s'est concentrée sur l'étude de l'implication physiologique *in vivo* de cette voie dans le métabolisme du cholestérol chez la souris. Mes travaux ont permis de démontrer l'implication physiologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le RCT. De plus, des résultats préliminaires suggèrent que le récepteur P2Y<sub>13</sub> est impliqué dans le développement de l'athérosclérose. Ainsi, la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> et plus précisément le récepteur P2Y<sub>13</sub> pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose.

Afin de mieux aborder l'ensemble de ces résultats, ce mémoire est composé d'un premier chapitre décrivant les différents éléments participant à l'homéostasie du cholestérol tels que le RCT qui sera décrit avec plus de précisions. Le second chapitre décrira le développement de l'athérosclérose, ainsi que les différents rôles athéroprotecteurs des HDL et les différentes stratégies thérapeutiques existantes ou futures ciblant les HDL pour le traitement de l'athérosclérose. Le troisième chapitre sera consacré aux différents résultats expérimentaux obtenus au cours de ce doctorat et aux perspectives ouvertes par ces travaux.





# **CHAPITRE I**

## **HOMEOSTASIE DU CHOLESTEROL ET REGULATIONS**



L'homéostasie du cholestérol est principalement maintenue par un contrôle précis de la balance du cholestérol entre les apports d'origine alimentaire (absorption intestinale) ou de la synthèse endogène majoritairement hépatique et les dépenses qui correspondent à son utilisation et son élimination de l'organisme. Le foie et l'intestin jouent un rôle capital dans l'homéostasie du cholestérol du fait de leur capacité à sécréter et à internaliser le cholestérol grâce au métabolisme des lipoprotéines.

Il existe 4 voies essentielles dans le métabolisme du cholestérol :

- la voie entéro-hépatique permettant le transport du cholestérol d'origine exogène (alimentaire) de l'intestin vers le foie
- la voie d'apport qui correspond au transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques
- la voie de transport retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il sera éliminé *via* les voies biliaires ou resécrété
- la voie d'excrétion du cholestérol transintestinale (TICE) qui correspond à la sécrétion de cholestérol du sang vers la lumière intestinale.

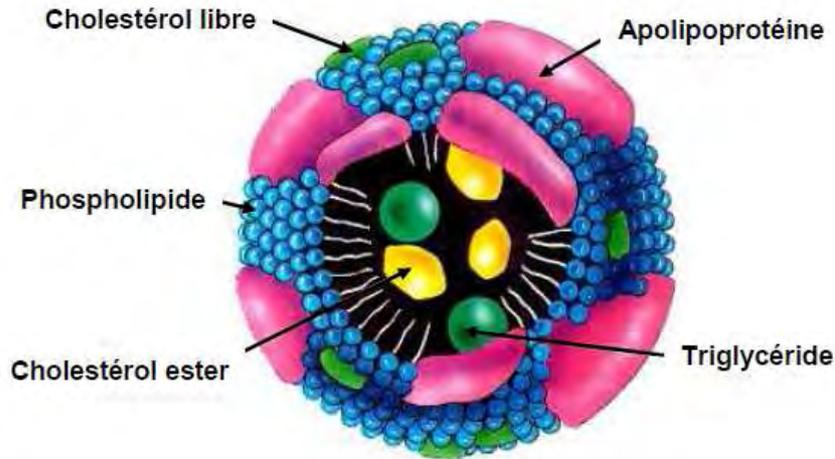
Ainsi, l'homéostasie du cholestérol implique de nombreux échanges du cholestérol entre les tissus périphériques et le foie.

### **1) Les lipoprotéines : les transporteurs de cholestérol**

Etant un composé hydrophobe, le cholestérol n'est pas soluble dans les liquides biologiques (sang, lymphe,...). Il ne peut donc pas circuler sous forme libre dans les compartiments extracellulaires et il nécessite d'être véhiculé par des particules de transport : les lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont des édifices macromoléculaires sphériques hydrosolubles qui sont constituées :

- d'une coque externe amphiphile composée d'une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol et une ou plusieurs molécules protéiques appelées apolipoprotéines
- d'un cœur hydrophobe composé de triglycérides, d'esters de cholestérol et de petites quantités d'autres molécules hydrophobes comme des vitamines liposolubles (**Figure 1**).



**Figure 1: Représentation schématique d'une lipoprotéine**  
d'après [www.prevention.ch/ima31305.jpg](http://www.prevention.ch/ima31305.jpg)

On distingue principalement 5 grandes classes de lipoprotéines qui assurent chacune des fonctions spécifiques et qui sont séparées suivant leur densité par ultracentrifugation : les chylomicrons ( $d < 0,93$ ), les VLDL (Very Low Density Lipoprotein,  $0,93 < d < 1,006$ ), les IDL (Intermediate Density Lipoprotein,  $1,006 < d < 1,019$ ), les LDL (Low Density Lipoprotein,  $1,019 < d < 1,063$ ) et les HDL (High Density Lipoprotein,  $1,063 < d < 1,21$ ). Les HDL peuvent être séparées en 2 sous-populations : HDL<sub>2</sub> ( $1,063 < d < 1,125$ ) et HDL<sub>3</sub> ( $1,125 < d < 1,21$ ) (**Tableau 1**).

Les lipoprotéines peuvent également être séparées en fonction de leur migration électrophorétique sur gel d'agarose et classées en pré $\beta$ ,  $\beta$  et  $\alpha$  lipoprotéines correspondant respectivement aux VLDL, LDL et HDL, les chylomicrons restant au niveau du dépôt (**Tableau 1**). Les différentes classes de lipoprotéines se distinguent également de par leur composition en lipides et en apolipoprotéines. Ainsi les chylomicrons et les VLDL sont très riches en triglycérides tandis que les IDL, les LDL et les HDL transportent majoritairement du cholestérol (**Tableau 2**).

De par leur composition en apolipoprotéines, chaque classe de lipoprotéines dispose d'un devenir métabolique qui lui est propre faisant intervenir divers enzymes et récepteurs. Ainsi, schématiquement on distingue des lipoprotéines impliquées dans la voie entéro-hépatique (les chylomicrons), dans la voie d'apport de cholestérol aux tissus périphériques (les VLDL, IDL et LDL) et dans la voie de transport retour du cholestérol (les HDL).

Lipoprotéines	Densité g/ml	Mobilité électrophorétique	Diamètre nm	Poids moléculaire kDa
Chylomicrons	< 0.93	Dépôt	75-1200	100000
VLDL	0.93-1.006	Pré $\beta$	30-80	6000
IDL	1.006-1.019	Pré $\beta$	25-35	4000
LDL	1.019-1.063	$\beta$	18-25	1800
HDL <sub>2</sub>	1.063-1.125	$\alpha$	9-12	400
HDL <sub>3</sub>	1.125-1.210	$\alpha$	5-9	200

Tableau 1: Propriété physiques des lipoprotéines

Lipoprotéines	Cholestérol %	Triglycérides %	Lipides totaux %	Protéines %	Apolipoprotéines
Chylomicrons	4	88	98-99	1	apoB48, apoA-I, C, E
VLDL	23	56	90-93	8	apoB100, C, E
IDL	43	29	89	11	apoB100, C, E
LDL	58	13	79	21	apoB100
HDL <sub>2</sub>	26	2	60	40	apoA-I, A-II
HDL <sub>3</sub>	13	1	43	57	apoA-I

Tableau 2: Composition des lipoprotéines plasmatiques

## 2) Les différentes sources du cholestérol

Le cholestérol présent dans l'organisme provient de 2 origines distinctes :

- une source dite exogène qui correspond au cholestérol d'origine alimentaire absorbé par l'intestin.
- une source dite endogène due à la synthèse de cholestérol, majoritairement par le foie.

Chez l'homme, l'alimentation fournit environ 400 mg de cholestérol par jour et le foie produit environ 1 g de cholestérol par jour. Les tissus périphériques (intestin, tissu adipeux...) produisent aussi du cholestérol mais en quantité plus faible par rapport au foie. Afin de maintenir l'homéostasie du cholestérol, l'ensemble de ces apports doit être utilisé ou éliminé par l'organisme.

## **2-1) Voie exogène : Absorption intestinale et régulations**

Chez l'homme, l'absorption du cholestérol a lieu dans l'intestin grêle au niveau de la partie proximale du jéjunum, où le cholestérol d'origine alimentaire et le cholestérol biliaire sont disponibles au niveau de la lumière intestinale. Approximativement, 50% du cholestérol présents dans la lumière intestinale sont absorbés et le reste est excrété dans les fèces. Environ 2/3 du cholestérol absorbé sont d'origine biliaire et 1/3 provient de l'alimentation (Davis and Altmann, 2009).

Du fait de son caractère hydrophobe, le cholestérol doit être solubilisé dans des micelles pour pouvoir être capté par les entérocytes. La solubilisation micellaire est la résultante des propriétés détergentes des acides biliaires synthétisés par le foie et sécrétés dans la lumière intestinale, cette étape est essentielle pour l'absorption intestinale du cholestérol. En effet, l'absorption intestinale du cholestérol est quasi nulle chez des souris déficientes pour CYP7A1 qui ont un pool d'acides biliaires fortement diminué (Voshol et al., 2001).

Seul le cholestérol libre peut être incorporé dans les micelles et absorbé par les entérocytes. Les 10 à 15% du cholestérol alimentaire qui sont sous forme estérifiée devront donc être hydrolysés par une cholestérol estérase pour pouvoir être absorbés.

### **2-1-1) Les récepteurs impliqués**

L'absorption intestinale du cholestérol a longtemps était considérée comme étant un processus passif bien que ce processus soit très sélectif. En effet le cholestérol est absorbé avec une haute affinité ce qui n'est pas le cas des phytostérols qui ont pourtant une structure très proche du cholestérol.

C'est en 1990, que l'équipe de Hauser a montré, en utilisant des vésicules issues de membrane de bordure en brosse, que le mécanisme d'absorption intestinale du cholestérol nécessitait un transporteur (Thurnhofer and Hauser, 1990).

En 2004, une étude de Altmann *et al* réalisée *in silico* à partir d'une banque de cDNA extraits de la muqueuse jéjunale de rat a permis d'identifier la protéine NPC1L1 (Niemann-Pick C1 like 1) comme étant le récepteur principal impliqué dans le transport du cholestérol au travers de la bordure en brosse des entérocytes (Altmann et al., 2004). NPC1L1 est une protéine glycosylée fortement exprimée dans le jéjunum où elle est localisée au niveau de la membrane apicale des entérocytes. Chez les souris déficientes pour NPC1L1, on peut observer une diminution de 70% de l'absorption intestinale du cholestérol et les 30% d'absorption restante sont insensibles à un traitement avec l'Ezetimibe qui est un inhibiteur de l'absorption intestinale (Altmann et al., 2004). Il a été montré que l'Ezetimibe se lie à des

cellules exprimant NPC1L1 ainsi qu'au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et que cette capacité de liaison est absente lorsque NPC1L1 est délété. Ainsi, NPC1L1 est la cible majeure de l'Ezetimibe (Garcia-Calvo et al., 2005). Les souris déficientes pour NPC1L1 sont résistantes à l'hypercholestérolémie induite par un régime enrichi en cholestérol et lorsque ces souris sont croisées avec des souris déficientes pour l'apoE, elles sont résistantes au développement de l'athérosclérose (Davis et al., 2007), ce qui confirme que NPC1L1 pourrait être une cible thérapeutique majeure dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose.

D'autres transporteurs, tels que SR-B1 (Scavenger Receptor class B1), ont également été suspectés de jouer un rôle dans l'absorption intestinale du cholestérol. En effet, une surexpression de SR-B1 au niveau de l'intestin chez la souris conduit à une augmentation de l'absorption du cholestérol et des triglycérides dans des expériences d'absorption à court terme (Bietrix et al., 2006). Cependant, l'inactivation de SR-B1 chez la souris induit une faible augmentation de l'absorption du cholestérol, suggérant que SR-B1 ne joue pas un rôle essentiel dans l'absorption intestinale du cholestérol (Mardones et al., 2001).

Deux autres protéines exprimées au niveau de la membrane apicale des entérocytes qui appartiennent à la famille des ABC (Adenosine triphosphate Binding Cassette) transporteurs : ABCG5 et ABCG8 sont également impliquées dans l'absorption intestinale du cholestérol. Pour être fonctionnelles ces protéines doivent être hétérodimérisées. Au niveau hépatique, ces deux protéines jouent un rôle dans l'efflux biliaire du cholestérol. Chez l'homme, une mutation dans le gène codant pour l'une de ces deux protéines provoque une beta-sitostérolémie, pathologie caractérisée par une accumulation dans l'organisme de phytostérols, stérols végétaux structurellement proches du cholestérol, due à une augmentation de leur absorption intestinale et une diminution de leur élimination biliaire. Les souris déficientes pour ABCG5/G8 ont une sécrétion en cholestérol biliaire diminuée et une absorption des phytostérols augmentée mais aucun effet n'est observé sur l'absorption du cholestérol (Yu et al., 2002a). Cependant, la surexpression d'ABCG5/G8 chez la souris induit une diminution de l'absorption du cholestérol ce qui suggère que, dans certaines conditions, ces deux ABC transporteurs jouent un rôle dans l'efflux du cholestérol au niveau intestinal (Yu et al., 2002b).

## **2-1-2) Régulations de l'absorption intestinale**

### **2-1-2-1) Régulation LXR (Liver X receptor) dépendante**

Les LXRs (LXR  $\alpha$  et  $\beta$ ) sont des récepteurs nucléaires activés par des dérivés de cholestérol oxydés, les oxystérols. Les deux isoformes existantes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) régulent l'expression de gènes en se liant au promoteur de gènes cibles. Après activation, le LXR s'hétérodimérise avec une isoforme de RXR (Retinoid X Receptor). Cet hétérodimère LXR/RXR va se lier à une séquence consensus LXRE (LXR response element) présente au niveau du promoteur des gènes cibles. En condition d'accumulation intracellulaire d'oxystérols, résultant d'une augmentation de la concentration en cholestérol, les LXRs induisent la transcription de différents gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol.

Il a été montré qu'une activation du LXR par l'administration d'agonistes, tels que le TO901317 chez la souris, induit une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol résultant de la régulation de l'expression de différents gènes tels que ABCG5/G8 et NPC1L1. En effet, l'activation du LXR augmente l'expression d'ABCG5/G8 (Yu et al., 2003) et diminue l'expression de NPC1L1 (Duval et al., 2006) qui interviennent respectivement dans les mécanismes d'efflux et d'absorption du cholestérol au niveau des villosités intestinales.

### **2-1-2-2) Régulation LXR indépendante**

Un autre mécanisme de régulation de l'expression de NPC1L1 fait intervenir le récepteur nucléaire PPAR $\delta$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta$ ). Une activation de PPAR $\delta$  par un agoniste de synthèse, le GW610742 (un ligand de haute affinité pour PPAR $\delta$ ), induit chez la souris une diminution de 43% de l'absorption intestinale du cholestérol qui coïncide avec une expression inchangée d'ABCG5/G8 mais une diminution de l'expression intestinale de NPC1L1 (van der Veen et al., 2005).

Certains composants présents dans l'alimentation sont également capables de moduler l'absorption intestinale du cholestérol. En effet, il été démontré que les phytostérols qui sont des composés non nutritifs possédant une structure très similaire au cholestérol sont capables de diminuer l'absorption du cholestérol, vraisemblablement par compétition avec le cholestérol au niveau de l'incorporation dans les micelles à l'intérieur de la lumière intestinale (AbuMweis et al., 2009) (Ikeda et al., 1989).

### **2-1-3) Le devenir du cholestérol absorbé**

#### **2-1-3-1) Voie de sécrétion du cholestérol dépendante de l'apoB48 :**

##### **les chylomicrons**

Après avoir été absorbé au pôle apical des entérocytes, le cholestérol est estérifié par l'enzyme ACAT2 (Acylcoenzyme 17 cholesteryl acyltransférase 2) au niveau du réticulum endoplasmique, avant d'être ensuite assemblé dans les chylomicrons.

Les chylomicrons sont synthétisés exclusivement dans l'intestin pour transporter les lipides et les vitamines liposolubles alimentaires dans le sang. Les chylomicrons sont de très grosses particules sphériques riches en triglycérides. Le cœur de cette lipoprotéine est composé de triglycérides, de cholestérol ester et de vitamines liposolubles, alors que sa surface est composée d'une monocouche de phospholipides dans laquelle s'insèrent du cholestérol libre et diverses apolipoprotéines comme l'apoA-I, l'apoA-IV et les apoC, l'apolipoprotéine principale étant l'apoB48.

Il est proposé que l'assemblage des chylomicrons implique deux étapes indépendantes (Cartwright and Higgins, 2001). La première correspond à la synthèse de «chylomicrons primordiaux» qui sont des particules d'apoB48 enrichies en phospholipides et cholestérol. L'association de phospholipides et cholestérol aux molécules d'apoB48 se déroule au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et fait intervenir la protéine MTP (Microsomal triglyceride transfert Protein) (Hussain et al., 2003). Cette association de lipides aux molécules d'apoB48 *via* la MTP prévient la dégradation par le protéasome de l'apoB48 (Fisher and Ginsberg, 2002). Chez l'homme, des mutations de la MTP entraînent une abétalipoprotéïnémie caractérisée par des stéatorrhées sévères et une importante réduction du taux de lipides plasmatiques (cholestérol et triglycérides) (Lammert and Wang, 2005).

Dans la seconde étape, ces lipoprotéines sont transférées dans la lumière du RE, où elles vont maturer en particules plus larges appelées pré-chylomicrons, en fusionnant avec des particules pauvres en protéines et riches en lipides (triglycérides et cholestérol ester) (Mansbach and Siddiqi). Ces pré-chylomicrons sont ensuite transportés vers le cis-Golgi dans des vésicules de transport comportant le complexe protéique COPII (Sar1b, Sec23/24, et Sec13/31) nécessaire à la fusion de ces vésicules avec l'appareil de Golgi (Siddiqi et al., 2003). Des mutations du gène SARA-2 qui code pour la protéine Sar1b entraînent une rétention des chylomicrons dans le RE, due à un défaut du transport des chylomicrons dans la cellule (Jones et al., 2003).

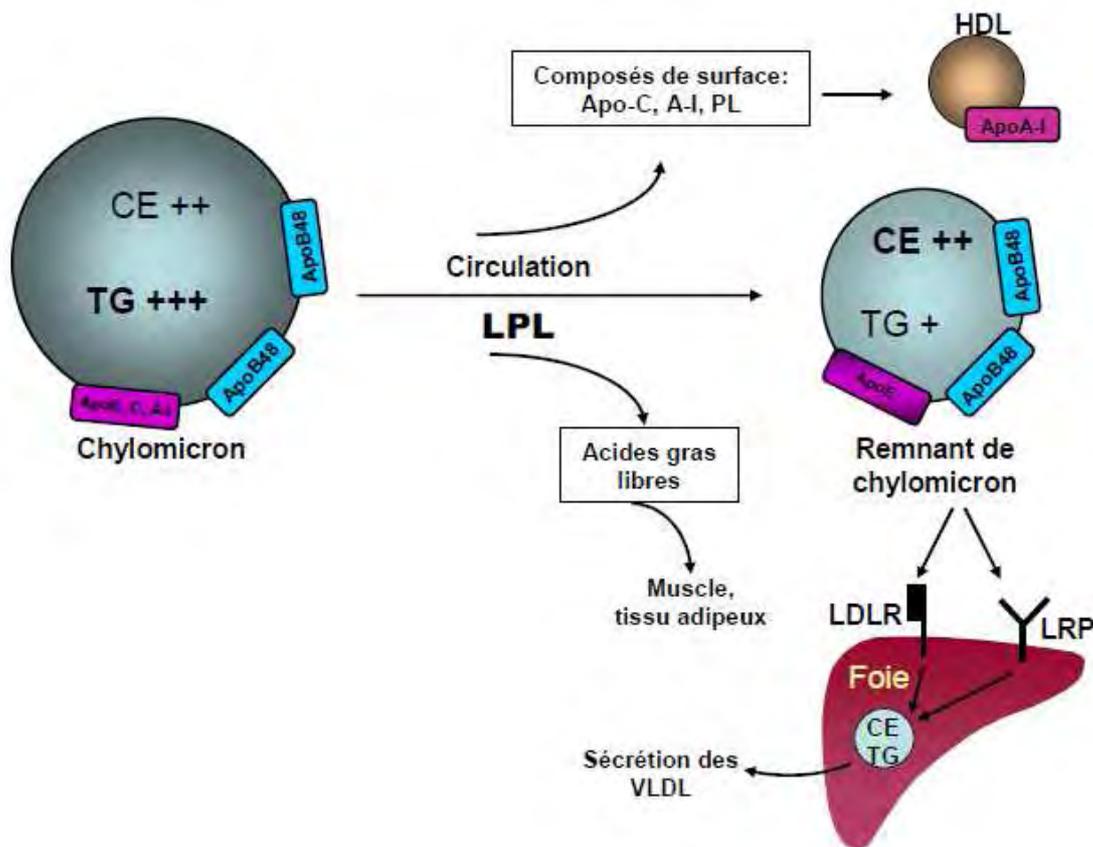
Une fois fusionnées avec le Golgi, les vésicules libèrent les pré-chylomicrons dans la lumière du Golgi où ils vont acquérir de l'apoA-I. Les chylomicrons sont ensuite transportés vers des domaines membranaires particuliers du pôle basal de l'entérocyte avant d'être sécrétés par exocytose dans la lamina propria et vers la voie lymphatique (Sabesin and Frase, 1977).

Sécrétés dans la lymphe mésentérique, les chylomicrons vont rejoindre la circulation générale *via* le canal thoracique. Sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) liée à l'endothélium des vaisseaux et activée par l'apoCII, les triglycérides transportés par les chylomicrons vont être hydrolysés en acides gras libres qui diffuseront librement dans les cellules où ils seront, soit oxydés pour produire de l'énergie (muscle), soit ré-estérifiés pour être stockés (tissus adipeux). La LPL est associée à l'endothélium des vaisseaux par des groupements héparane-sulfates et est active sous forme de dimère. En effet, la forme dimérique a une plus grande affinité pour les groupements héparane-sulfates que la forme monomérique (Lookene et al., 1997). De plus, de récentes études ont montré que la GPIHBP1 (Glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1) constitue également un site de liaison important pour la LPL *in vivo* (Weinstein et al., 2008).

Ayant perdu la plus grande partie de ses triglycérides par l'action de la LPL, le chylomicron est relativement enrichi en cholestérol ester pour former une particule plus dense et de plus petite taille : le remnant de chylomicron. Cette diminution de taille s'accompagne d'une perte des composés de surface (apoA-I, apoCII et phospholipides) qui sont pris en charge par les HDL. Les remnants vont être rapidement captés par le foie pour être catabolisés (**Figure 2**). Seuls les remnants de taille inférieure à 100 nm vont pouvoir passer au travers des fenêtres de la barrière endothéliale et pénétrer dans l'espace de Disse au contact des hépatocytes (Fraser et al., 1995). Dans l'espace de Disse, les chylomicrons vont être séquestrés par une interaction avec les protéoglycanes de type héparane-sulfates, présents à la surface des hépatocytes et vont acquérir des molécules additionnelles d'apoE qui constitue un ligand important pour leur captation par le foie (Yu et al., 1999). En effet, des souris invalidées pour l'apoE présentent une très faible clairance des remnants (Zhang et al., 1992).

La captation hépatique des remnants de chylomicrons fait majoritairement intervenir le récepteur des LDL (LDLR ou récepteur apoB/E) et le récepteur LRP (LDL receptor-related protein). Des souris déficientes pour le LDLR présentent une accumulation de remnants dans l'espace de Disse tandis que l'inactivation du LRP n'entraîne pas de diminution significative de l'épuration des remnants. Toutefois, l'inactivation du LRP dans des souris déficientes pour le LDLR induit une plus grande accumulation de remnants dans l'espace de Disse (Rohlmann

et al., 1998). Chez les souris déficientes pour le LRP, l'absence d'accumulation de remnants est due à une augmentation concomitante de la quantité de LDLR à la surface des hépatocytes (Rohlmann et al., 1998). Ceci démontre donc l'implication de ces deux récepteurs dans la captation hépatique des remnants de chylomicrons. La reconnaissance par le LRP nécessite l'acquisition par les remnants d'une quantité suffisante d'apoE sécrétée par le foie (Linton et al., 1998). Le récepteur SR-B1 est également impliqué dans la captation des remnants, en effet des souris surexprimant SR-B1 au niveau hépatique présentent une augmentation du catabolisme des remnants de chylomicrons (Out et al., 2005). Une fois captées, les particules de cholestérol ester vont être hydrolysées dans le lysosome, et une grande proportion du cholestérol résultant de cette hydrolyse sera ré-empaquetée et sécrétée par le foie sous la forme de VLDL. Les résidus de triglycérides (TG) restant dans les remnants de chylomicrons constituent également une source importante d'acides gras (AG) pour la formation des VLDL (Jung et al., 1999).



**Figure 2: Métabolisme des chylomicrons**

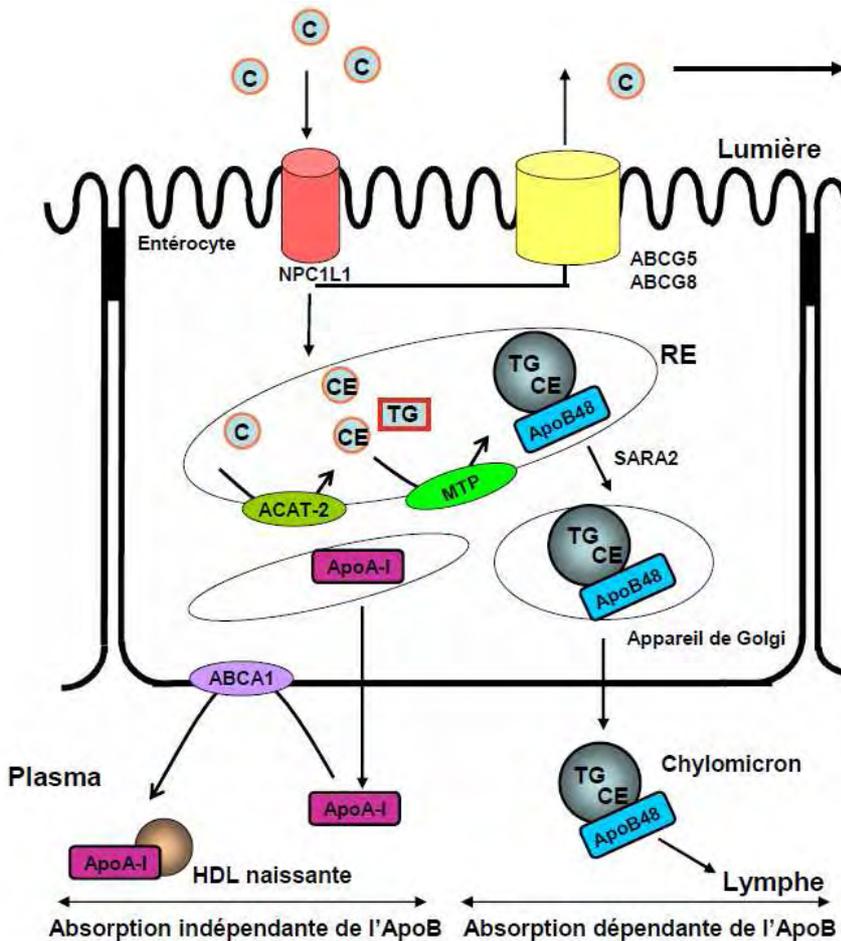
Sous l'action de la LPL, les triglycérides (TG) des chylomicrons vont être hydrolysés en acides gras libres. Ce réarrangement du chylomicron est associé à une perte des composés de surface qui seront pris en charge par les HDL. Après avoir acquis de nouvelles molécules d'apoE, le chylomicron va être reconnu par le LDLR et le LRP au niveau du foie.

**2-1-3-2) Voie de sécrétion du cholestérol indépendante de l'apoB48:**

**les HDL intestinales**

Il existe une autre voie de sécrétion du cholestérol absorbé par l'entérocyte qui est indépendante de l'apoB48. En effet, Iqbal *et al* ont démontré, par des études *in vitro* sur des cellules Caco-2, qu'il existait un efflux de cholestérol au niveau de la membrane basale entérocytaire vers des lipoprotéines contenant de l'apoA-I mais pas d'apoB (Iqbal and Hussain, 2005). Chez des souris déficientes en apoA-I, l'absorption du cholestérol après un gavage est diminuée dans les premières heures tandis que sur 48h l'absorption se révèle normale. L'apoA-I semble donc être impliquée dans les phases précoces de l'absorption intestinale du cholestérol.

Cette voie apoB-indépendante est inhibée par le glyburide et augmentée par des agonistes du LXR, suggérant fortement l'implication d'un ABC transporteur tel que ABCA1 dans ce processus d'efflux de cholestérol (Hussain et al., 2005). Les souris invalidées pour ABCA1, spécifiquement au niveau intestinal, présentent une diminution de 30% des taux plasmatiques de HDL, ce qui suggère la participation de l'intestin dans la génération des HDL *via* ABCA1 (Brunham et al., 2006).



**Figure 3: Absorption intestinale du cholestérol**

(d'après Kruit *et al*, 2006)  
Le cholestérol d'origine alimentaire et biliaire est capté par l'entérocyte au niveau de la bordure en brosse par l'action de NPC1L1. Au niveau du RE, le cholestérol sera estérifié et incorporé dans les chylomicrons qui seront ensuite sécrétés dans la lymphe. Le cholestérol non estérifié pourra être resécrété dans la lumière intestinale par l'action d'ABCG5/G8 ou sécrété vers l'apoA-I par l'action d'ABCA1.

## **2-2) Voie endogène : synthèse endogène du cholestérol et régulations**

Toutes les cellules sont capables de synthétiser le cholestérol qui constitue un composant essentiel des membranes cellulaires et un précurseur de diverses molécules telles que les hormones stéroïdiennes, les vitamines, les acides biliaires qui sont impliqués dans différents processus biologiques.

Le lieu principal de synthèse du cholestérol est le foie. L'étape limitante dans cette synthèse est la conversion d'une molécule d'HMG-CoA en mévalonate qui est catalysée par l'HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase). Cette enzyme est la cible des statines qui sont des drogues capables de diminuer les taux de cholestérol plasmatiques. L'HMG-CoA réductase est composée de 2 domaines distincts : un domaine N-terminal hydrophobe constitué de 8 segments transmembranaires qui ancrent la protéine dans la membrane du RE et un long domaine C-terminal cytosolique dans lequel se situe le site catalytique de l'enzyme.

La régulation de l'HMG-CoA réductase est très importante dans l'homéostasie du cholestérol. Cette enzyme-clé de la synthèse du cholestérol peut être régulée par des mécanismes de rétrocontrôle déclenchés par différents produits du métabolisme du mévalonate au niveau de la transcription, de la traduction, de l'activité catalytique ainsi qu'au niveau de son taux de dégradation. Le principal mécanisme modulateur de l'HMG-CoA réductase est le rétrocontrôle effectué par le cholestérol.

La régulation transcriptionnelle de l'HMG-CoA réductase est sous la dépendance des SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein) qui activent la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol. La famille des SREBPs est composée de 3 membres (SREBP-1a, 1c et 2) qui sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) synthétisés sous forme de précurseurs inactifs liés à la membrane du RE. Chaque précurseur est organisé en 3 domaines fonctionnels :

- un domaine N-terminal qui contient le domaine de transactivation, une région riche en sérine et proline et une région de liaison à l'ADN et de dimérisation (région bHLH-LZ).
- 2 domaines transmembranaires
- un domaine C-terminal constituant un domaine régulateur.

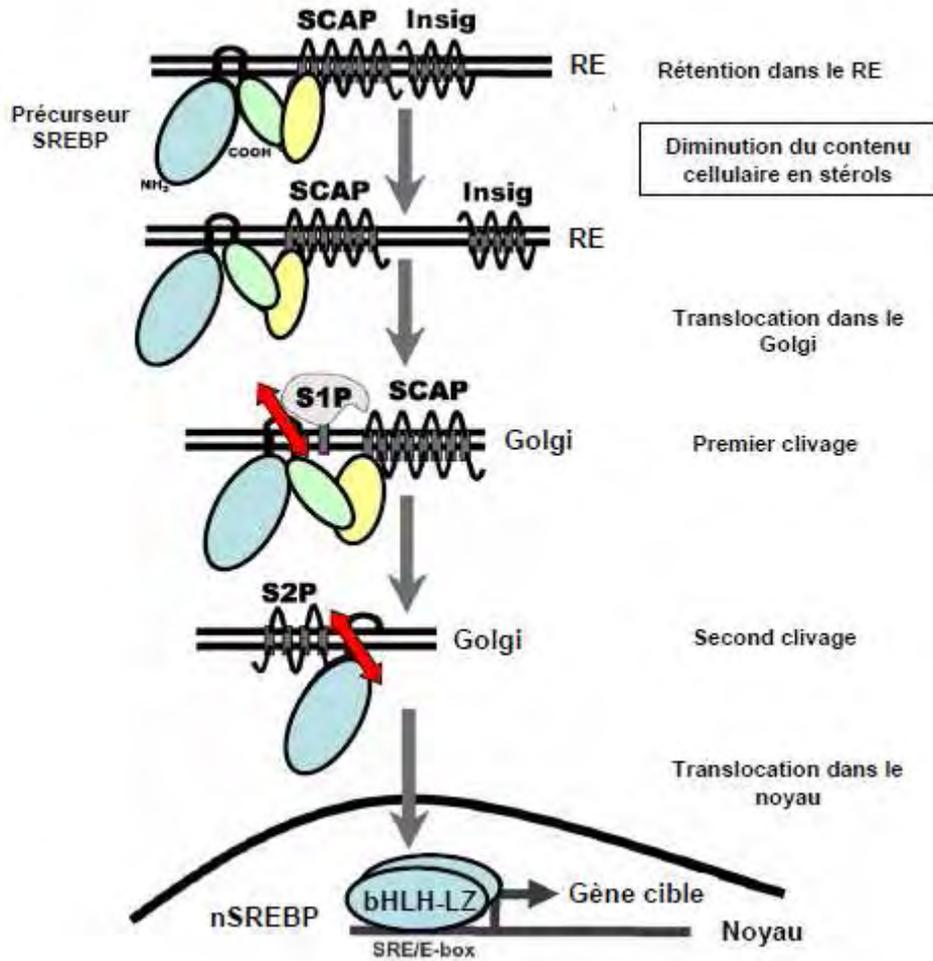
À la différence des autres membres de la famille des facteurs de transcription bHLH-LZ, les SREBPs possèdent un résidu tyrosine au sein de leur domaine « basic » en remplacement d'une arginine. Cette substitution d'acide aminé confère aux SREBPs, en plus de leur capacité de liaison à l'ADN au niveau des E-box (capacité commune à tous les membres de la famille

des bHLH-LZ), la capacité de se lier au niveau des séquences SRE (Sterol Responsive Element) (Eberle et al., 2004).

Des modèles de souris transgéniques surexprimant les formes nucléaires des SREBPs dans le foie ont permis d'identifier les gènes cibles des différentes isoformes de SREBP. Ainsi, l'isoforme SREBP-2 active préférentiellement la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol tandis que SREBP-1a et SREBP-1c induisent la transcription de gènes impliqués dans la lipogenèse (Horton et al., 2002; Horton et al., 2003).

Les précurseurs SREBPs sont retenus dans la membrane du RE par une association avec la protéine SCAP (SREBP cleavage activating protein). SCAP est une protéine sensible aux stérols qui escorte les précurseurs de SREBP du RE au Golgi où 2 protéases (S1P et S2P) vont successivement cliver le précurseur pour libérer la forme active nSREBP (nuclearSREBP) dans le cytoplasme (Sakai et al., 1998; Wang et al., 1994). Cette forme active qui contient la région bHLH-LZ pourra rentrer dans le noyau pour se lier aux séquences SRE au niveau des promoteurs de ses gènes cibles tels que l'HMG-CoA synthase et l'HMG-CoA réductase pour activer leur transcription (Brown and Goldstein, 1997) (**Figure 4**).

Le groupe de Brown et Goldstein a démontré que cette voie des SREBPs peut être contrôlée par le contenu cellulaire en stérols (DeBose-Boyd et al., 1999; Nohturfft et al., 2000). En présence de fortes concentrations de stérols, le complexe SCAP-SREBP est retenu dans la membrane du RE. Le blocage du complexe dans la membrane du RE est dû à la liaison de SCAP induite par les stérols à une des protéines de rétention du RE, Insig1 et 2 (Yabe et al., 2002; Yang et al., 2002). Quand la concentration en stérol diminue, le complexe SCAP-SREBP se déplace vers le Golgi où SREBP sera clivé et la forme active sera libérée dans le cytoplasme pour aller activer la transcription de ces gènes cibles au niveau du noyau (**Figure 4**).



**Figure 4: Voie d'activation de SREBP par clivage protéolytique** (d'après Eberlé *et al.*, 2004)

SREBP est un facteur de transcription synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif lié à la membrane du RE par une association avec la protéine SCAP qui interagit elle-même avec la protéine Insig. En condition de faible concentration intracellulaire en stérols, l'interaction entre SCAP et Insig diminue et le complexe SCAP/SREBP peut donc rejoindre l'appareil de Golgi où deux protéases (S1P et S2P) vont cliver SREBP pour libérer la forme active nSREBP dans le cytoplasme qui pourra aller activer la transcription de ces gènes cibles dans le noyau.

Les stérols peuvent également réguler l'activité de l'HMG-CoA réductase en accélérant sa dégradation. En effet, lorsque la concentration en cholestérol est élevée, SCAP et l'HMG-CoA réductase entrent en compétition pour la liaison avec Insig1. Si SCAP se lie à Insig1, le complexe SCAP-Insig1 est retenu dans le RE tandis que si l'HMG-CoA réductase se lie à Insig1, l'HMG-CoA réductase est ubiquitinylée et est rapidement dégradée par le protéasome (Sever *et al.*, 2003).

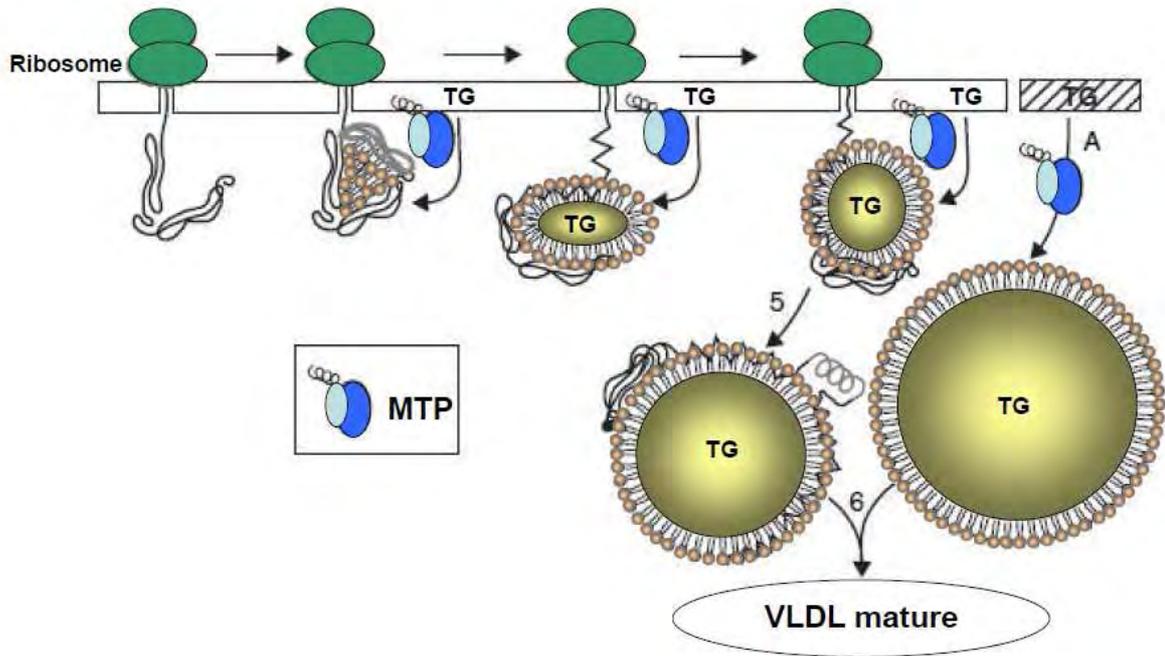
### 3) Apport du cholestérol aux tissus périphériques

#### 3-1) Assemblage hépatique des VLDL

Les VLDL hépatiques sont des lipoprotéines synthétisées au niveau du foie qui contiennent une grande quantité de triglycérides et une moindre quantité de cholestérol et de phospholipides. Le mécanisme moléculaire de synthèse et de sécrétion des VLDL hépatiques est très proche de celui des chylomicrons intestinaux. Contrairement aux chylomicrons produits dans l'intestin, c'est l'apoB100 et non l'apoB48 qui est essentielle à l'assemblage des VLDL dans le foie.

L'assemblage des VLDL est initié dans le RE et comporte différentes étapes se déroulant pendant et après la traduction et la translocation de l'apoB100 au travers de la membrane du RE. L'étape initiatrice de l'assemblage des VLDL se déroule pendant la traduction et la translocation de l'apoB100 dans la membrane du RE et correspond à la lipidation de l'apoB100 pour former des VLDL naissantes qui sont des particules denses et relativement petites (environ 25nm de diamètre). L'étape de lipidation co-translationnelle est essentielle pour la stabilisation de l'apoB100 et implique l'activité de la MTP. En effet, l'expression d'apoB sans MTP dans des cellules d'origine autre que hépatique ou intestinale entraîne la dégradation intracellulaire par le protéasome des particules d'apoB naissantes tandis que la co-expression d'apoB avec MTP induit la sécrétion de lipoprotéines « like » contenant de l'apoB (Gordon et al., 1994; Leiper et al., 1994). Ainsi, des souris invalidées pour MTP au niveau hépatique présentent un phénotype similaire à l'abétalipoprotéïnémie humaine soit une absence totale des lipoprotéines contenant l'apoB100 (VLDL, IDL, LDL) et une résistance à l'hypercholestérolémie induite par un régime enrichi en cholestérol (Chang et al., 1999).

La maturation de ces VLDL naissantes en VLDL (30 à 80 nm de diamètre) nécessite une acquisition post-translationnelle de triglycérides. Pour cela, les particules précurseurs vont fusionner avec des gouttelettes riches en triglycérides présentes dans la lumière du RE. La formation de ces gouttelettes riches en triglycérides est dépendante de l'activité de la MTP bien que la fusion des particules naissantes avec ces gouttelettes soit MTP indépendante (Gordon et al., 1996) (Wang et al., 1999) (Pan et al., 2002) (**Figure 5**).



**Figure 5: Mécanisme d'assemblage des VLDL dans le RE** (d'après Shelness *et al.*, 2001)

L'assemblage des VLDL au niveau du RE comporte deux étapes. Dans un premier temps, au cours de sa traduction, l'apoB100 va être lipidée sous l'action de la MTP pour former des particules VLDL naissantes. Dans un deuxième temps, pour former des VLDL matures, ces particules vont fusionner avec des gouttelettes riches en triglycérides présentes dans la lumière du RE et dont la formation est dépendante de l'activité de la MTP.

La sécrétion des VLDL matures nécessite un transport vésiculaire du RE vers l'appareil de Golgi. La sortie des VLDL du RE nécessite la formation de vésicules initiée par la GTPase Sar1 qui appartient au complexe COPII. L'expression d'un mutant de Sar1 dans des hépatocytes de rat prévient la sortie hors du RE des particules d'apoB (Gusarova *et al.*, 2003). Après leur passage dans l'appareil de Golgi, les VLDL sont rassemblées dans des vésicules sécrétoires, transportées à la membrane plasmique et sécrétées dans l'espace de Disse, puis dans la circulation générale.

En plus de l'apoB100, les VLDL hépatiques contiennent d'autres apolipoprotéines telles que l'apoE et les apoC. L'apoCIII est une petite apolipoprotéine échangeable de 79 acides aminés qui est exprimée principalement dans le foie. Il a été récemment montré que la surexpression d'apoCIII humaine dans des cellules hépatiques de rat stimule l'assemblage et la sécrétion des VLDL dans des conditions riches en lipides. Après la formation des VLDL naissantes, la surexpression d'apoCIII augmente également la sécrétion de VLDL malgré une inhibition de la MTP. Il semblerait donc que l'apoCIII joue un rôle dans l'étape tardive de l'assemblage des VLDL qui est MTP-indépendante (Sundaram *et al.*).

### **3-2) Voie d'apport aux tissus périphériques**

Dans le compartiment vasculaire, les VLDL hépatiques comme les chylomicrons vont subir l'hydrolyse de leurs triglycérides par la LPL activée par l'apoCII présente à la surface des VLDL. Contrairement à la souris, l'homme possède la CETP (Cholesterol Ester Transfert Protein), notamment responsable du transfert dans les VLDL de molécules de cholestérol ester présentes dans les HDL (Barter, 2000). Comme dans la dégradation des chylomicrons, l'hydrolyse des triglycérides induit des replis de l'enveloppe périphérique qui sont libérés dans la circulation, constituant un départ des apoC, de phospholipides et de cholestérol libre. Ainsi des édifices plus petits, enrichis en apoB100 et E, se restructurent autour des esters de cholestérol et des molécules restantes de triglycérides formant des IDL (Intermediate Density Lipoprotein) ou remnants de VLDL. Dans les capillaires sinusoides du foie, ces IDL sont ensuite transformées en LDL sous l'action de la lipase hépatique qui va hydrolyser les triglycérides restants.

Au cours de la lipolyse, les lipoprotéines subissent un véritable remodelage de leur structure car la perte importante de triglycérides induit une diminution de la taille des particules qui est corrélée avec une perte des composés de surface tels que les apoC et E. Ainsi, à la différence des VLDL et IDL, les LDL qui sont très enrichies en cholestérol ester sont dépourvues d'apoC et contiennent uniquement une molécule d'apoB100 et quelques molécules d'apoE.

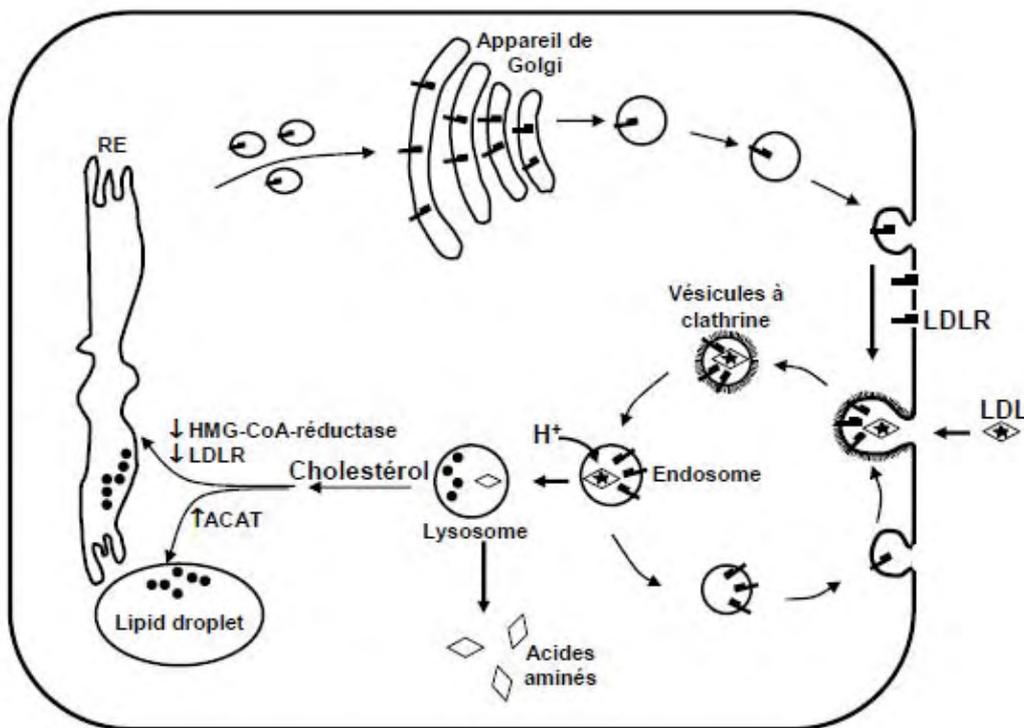
Tout au long de la cascade de transformation VLDL-IDL-LDL, les lipoprotéines vont pouvoir être captées par leurs récepteurs spécifiques, grâce à la reconnaissance des apolipoprotéines qui les composent. Ainsi, la reconnaissance des VLDL se fait principalement par l'apoE alors que les IDL et LDL sont reconnues grâce à l'apoB100. La captation des LDL, bien que majoritairement hépatique, a lieu dans toutes les cellules de l'organisme.

Le principal récepteur responsable de la clairance plasmatique des LDL est le LDLR. Les individus possédant une mutation dans le gène codant pour le LDLR souffrent d'une hypercholestérolémie familiale, la plus commune des formes d'hypercholestérolémie autosomale dominante, qui se manifeste par des taux très élevés de LDL-cholestérol. Le LDLR est une glycoprotéine transmembranaire composée de 5 domaines :

- un domaine de liaison à l'apoB100 et /ou apoE
- un domaine possédant une forte homologie avec le précurseur de l'EGF qui pourrait être impliqué dans la dissociation et le recyclage du LDLR
- un domaine de liaison aux sucres
- un domaine transmembranaire

- et une petite région cytoplasmique impliquée dans l'adressage du LDLR aux puits mantelés de clathrine.

La captation des LDL *via* le LDLR est un processus maintenant bien connu qui fait intervenir différentes étapes successives. Après la liaison de la particule LDL au domaine de liaison extracellulaire du LDLR, le complexe récepteur-ligand est internalisé par endocytose *via* des vésicules recouvertes de clathrine. Ce complexe est ensuite libéré dans un endosome où l'acidification induite par l'activité de l'ATPase type V facilitera la dissociation de la liaison ligand-récepteur. La particule LDL sera ensuite transportée vers le lysosome, où les particules de cholestérol ester seront hydrolysées en cholestérol et acides gras alors que l'apoB100 sera dégradée en acides aminés. La plupart des molécules LDLR seront recyclées vers la membrane plasmique où elles pourront se lier à nouveau aux particules LDL (Lopez, 2008) (**Figure 6**). Pour chaque cycle, seulement un très faible pourcentage de LDLR endocytés est dégradé. Il est estimé que chaque molécule de LDLR réalise environ 150 cycles (Lopez, 2008).



**Figure 6: Voie d'endocytose du LDLR**

Le LDLR est un élément clé dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme. Il joue le rôle d'une véritable interface entre les taux de cholestérol extra et intracellulaire et il est lui-même sujet à régulation.

Le cholestérol provenant de l'hydrolyse du cholestérol ester transporté par les LDL ainsi que ses dérivés oxydés exercent un véritable rétrocontrôle qui protège la cellule d'une surcharge en cholestérol. En effet, les (oxy)stérols répriment la transcription *via* SREBP-2 de l'HMG-CoA synthase et réductase (2 enzymes clés dans la synthèse du cholestérol). De plus, le cholestérol active l'ACAT qui va réestérifier le cholestérol pour pouvoir stocker l'excès de cholestérol et inhibe la synthèse de nouvelles molécules de LDLR empêchant ainsi une trop grande entrée de cholestérol dans la cellule.

Un nouveau gène a été identifié pour être impliqué dans l'hypercholestérolémie autosomale dominante. Ce gène code pour une sérine protéase sécrétée dans le milieu extracellulaire : PCSK9 (Proprotein Convertase subtilisin/kexin 9a) dont l'expression est négativement régulée par le cholestérol et positivement régulée par les SREBPs (Maxwell et al., 2003). Il a été montré qu'une surexpression de PCSK9 chez la souris est associée à une augmentation des taux plasmatiques de LDL-cholestérol et à une forte diminution des taux de LDLR au niveau hépatique sans effet sur les taux d'ARNm (Maxwell and Breslow, 2004). Inversement, les souris invalidées pour PCSK9 présentent une augmentation des taux de LDLR hépatique et une réduction significative des taux de LDL-cholestérol plasmatique due à une augmentation de la clairance plasmatique des LDL induite par le LDLR (Rashid et al., 2005). Il est proposé que PCSK9 influencerait l'expression du LDLR en modulant sa dégradation. Une fois que PCSK9 est lié au LDLR, le complexe est internalisé *via* des vésicules recouvertes de clathrine (Nassoury et al., 2007). À la différence de la liaison du LDLR avec une particule LDL, l'affinité du LDLR pour PCSK9 est augmentée dans l'endosome. Ainsi, le complexe PCSK9-LDLR est dirigé vers le lysosome où le LDLR sera dégradé. PCSK9 empêche donc le recyclage du LDLR au niveau de la membrane plasmique en favorisant sa dégradation (Costet et al., 2008). Une dégradation des précurseurs du LDLR a également été observée suite à la surexpression de PCSK9, ce qui suggère que PCSK9 peut également interagir avec le LDLR avant son adressage à la membrane plasmique (Maxwell et al., 2005).

L'identification de mutations perte de fonction de PCSK9 associées à une diminution de 28% des taux de LDL-cholestérol et à une diminution de 88% du risque de maladies cardiovasculaires suggère que l'inhibition de PCSK9 pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement d'hypercholestérolémie (Cohen et al., 2006). De plus, il a été montré que les statines, le traitement le plus prescrit en prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires, induisent une augmentation de l'expression de PCSK9 (Dubuc et al., 2004). Ainsi, en diminuant l'abondance du LDLR à la surface cellulaire, PCSK9 pourrait

être responsable d'une atténuation des effets des statines qui induisent une augmentation de l'expression du LDLR suite à l'inhibition de l'HMGCoA réductase. Ceci a été vérifié chez des souris invalidées pour PCSK9 qui présentent une meilleure réponse à un traitement avec des statines (Rashid et al., 2005). Ainsi, des inhibiteurs de PCSK9 pourraient être administrés en association avec des statines pour amplifier leurs effets.

Des travaux récents ont mis en évidence l'existence d'un nouveau régulateur post-transcriptionnel du LDLR : Idol (Inducible degrader of the LDLR) qui est une E3 ubiquitine ligase et une cible transcriptionnelle du LXR. Une activation du LXR induit l'expression de Idol qui catalyse l'ubiquitination du LDLR induisant ainsi sa dégradation. Ainsi, une surexpression adénovirale de Idol ou un traitement avec un agoniste du LXR induit une diminution des taux protéiques de LDLR *in vivo*. De plus une augmentation des taux plasmatiques de LDL-cholestérol est observée chez les souris surexprimant Idol (Zelcer et al., 2009).

#### **4) Transport retour du cholestérol (RCT)**

Alors que les tissus périphériques sont capables d'acquérir du cholestérol soit par synthèse *de novo* soit par le biais des lipoprotéines contenant l'apoB, ils sont en revanche incapables de cataboliser le cholestérol en excès dans leurs cellules. Le foie a la capacité d'éliminer le cholestérol excédentaire dans l'organisme *via* les voies biliaires. Cette élimination du cholestérol dans la bile constitue la dernière étape du processus appelé : le transport retour du cholestérol (le RCT). Récemment, une autre voie d'élimination du cholestérol plasmatique directement par l'intestin, appelée TICE (Transintestinal Cholesterol Excretion), a été mise en évidence par l'équipe du Pr. Groen (van der Velde et al., 2007). Cette voie sera détaillée dans la section 5 de ce chapitre. Chez l'homme, le TICE représenterait environ 1/3 du cholestérol éliminé de l'organisme alors que le RCT contribuerait au 2/3 restant.

Le RCT peut être décomposé en différentes étapes : l'efflux du cholestérol excédentaire des tissus vers l'apoA-I, libre ou faiblement lipidée (pré $\beta$ HDL), la maturation et le remodelage plasmatique de ces particules HDL néoformées et enfin la captation des HDL par le foie et l'élimination de leur cholestérol dans la bile sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires. La propriété athéroprotectrice des HDL est principalement attribuée à leur participation dans cette voie de transport retour du cholestérol.

#### **4-1) Structure des HDL**

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont les plus petites et les plus denses lipoprotéines de l'organisme. Les HDL forment une famille hétérogène dont les membres peuvent se distinguer par leur taille, leur densité, leur mobilité électrophorétique, leur composition et leur forme.

Par microscopie électronique, les HDL apparaissent sous forme de particules sphériques ou discoïdales. Dans un plasma normal, la majorité des HDL est sous forme sphérique et est composée d'un cœur hydrophobe (majoritairement formé de cholestérol ester et d'une faible quantité de triglycérides) recouvert d'une monocouche de lipides plus polaires (majoritairement phospholipides et cholestérol libre) ainsi que de diverses apolipoprotéines dont les principales sont l'apoA-I (70 à 80% des protéines totales) et l'apoA-II (20% des protéines totales). De par leur composition en apolipoprotéines, les particules HDL sphériques peuvent se diviser en 2 sous-populations : HDL-AI qui contiennent seulement de l'apoA-I et HDL-AI/AII qui sont formées d'apoA-I et d'apoA-II.

Quand on isole les HDL selon leur densité par ultracentrifugation, les HDL peuvent être séparées en 2 sous-fractions majeures : HDL<sub>2</sub> (1.063<d<1.125 g/ml) et HDL<sub>3</sub> (1.125<d<1.21 g/ml). Dans la fraction HDL<sub>3</sub>, on peut retrouver des HDL-AI/AII et HDL-AI tandis que la fraction HDL<sub>2</sub> comprend essentiellement des HDL-AI.

Les HDL peuvent être également séparées en fonction de leur migration électrophorétique. La majorité des HDL migre en alpha et correspond à la population de HDL sphériques qui inclut les sous-fractions HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> et donc les sous-populations HDL-AI et HDL-AI/AII. Les HDL migrant en préβ représentent essentiellement les particules discoïdales pauvres en lipides formées de 2 ou 3 molécules d'apoA-I complexées avec une faible quantité de phospholipides et cholestérol libre ou des particules d'apoA-I délipidées (Rye and Barter, 2004).

#### **4-2) Biogenèse des HDL**

##### **4-2-1) ApoA-I et formation des préβ-HDL**

Les préβ-HDL constituent les accepteurs initiaux du cholestérol cellulaire (Fielding et al., 1994).

Il existe 3 sources potentielles de pré $\beta$ -HDL dans le plasma :

- l'apoA-I peut être relarguée dans le plasma après sa synthèse par le foie et l'intestin et être ensuite lipidée par des mécanismes d'efflux.

- Les pré $\beta$ -HDL peuvent être issues du remodelage des lipoprotéines riches en triglycérides par l'action des lipoprotéines lipases qui hydrolysent leurs triglycérides et induisent le relargage de molécules d'apoA-I et de phospholipides.

- Les pré $\beta$ -HDL peuvent être également générées durant le remodelage des HDL matures sphériques dans le plasma par la CETP, la lipase hépatique et la PLTP (Phospholipid Transfert Protein) (Rye and Barter, 2004).

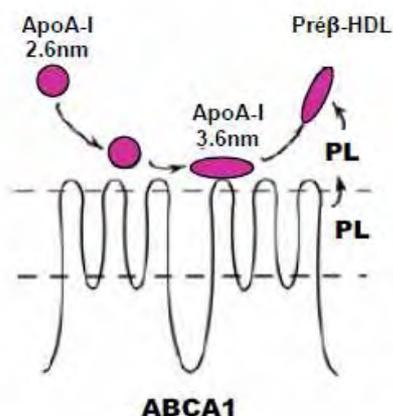
L'apoA-I humaine est synthétisée dans le foie et l'intestin sous la forme d'une préprotéine de 267 acides aminés qui subira un clivage intracellulaire du peptide signal de 18 acides aminés. La pro-apoA-I pourra ainsi être sécrétée dans le plasma et maturée grâce au clivage du propeptide par la Bone Morphogenic protein-1 (BMP-1) et la Procollagen C-Proteinase Enhancer-2 (PCPE2) (Sviridov, 2009). L'apoA-I mature est une protéine non glycosylée de 243 acides aminés et d'un poids moléculaire de 28 kDa. L'apoA-I est la principale apolipoprotéine des HDL et est essentielle à la biogenèse et les fonctions des HDL. En effet, les hommes ou les souris déficients en apoA-I ont des concentrations plasmatiques en HDL très faibles (Williamson et al., 1992). Une fois présente dans le plasma, l'apoA-I devra être rapidement lipidée pour éviter son élimination par les reins (Timmins et al., 2005).

Des mutations d'ABCA1 ont été identifiées comme étant la cause de la maladie de Tangier qui est caractérisée par un taux faible de HDL plasmatiques et une accumulation de cholestérol ester dans les macrophages de nombreux tissus (Francis et al., 1995). ABCA1 appartient à la grande famille des ABC transporteurs. C'est une protéine ubiquitaire de 2261 acides aminés exprimée abondamment dans le foie, les macrophages, le cerveau et différents autres tissus. ABCA1 est formée de 2 domaines transmembranaires composés chacun de 6 hélices alpha et de 2 domaines intracellulaires liant les nucléotides.

Alors que chez la souris, une invalidation d'ABCA1 spécifiquement au niveau du foie induit une forte diminution des taux d'apoA-I et de HDL plasmatiques; une invalidation d'ABCA1 au niveau des macrophages n'a pas d'effet sur la concentration de HDL plasmatiques (Timmins et al., 2005) (Haghpasand et al., 2001). Ainsi, l'expression d'ABCA1 au niveau du foie est un facteur limitant pour la biogenèse des HDL plasmatiques alors que, dans les macrophages, ABCA1 n'est pas un facteur limitant pour la formation des

HDL. Mais le foie n'est pas le seul organe impliqué dans leur formation, l'intestin, certes dans des proportions moins importantes, contribue également à ce processus. En effet, une invalidation d'ABCA1 spécifiquement au niveau de l'intestin induit une diminution de 30% du taux de HDL plasmatiques (Brunham et al., 2006).

Le mécanisme par lequel ABCA1 génère des pré $\beta$ -HDL à partir d'apoA-I libre a été longuement étudié. D'après Chau P *et al*, l'apoA-I sécrétée par des cellules HepG<sub>2</sub> (cellules d'hépatocarcinome humain) ou Caco-2 (cellules d'adénocarcinome colique humain) possède un rayon de Stokes de 2.6 nm. Cette forme d'apoA-I qui migre en pré- $\alpha$  est incapable de lier des phospholipides ou du cholestérol libre. Dans le milieu extracellulaire, par une réaction dépendante du transporteur ABCA1, cette molécule d'apoA-I de 2.6 nm migrant en pré- $\alpha$  est convertie en une particule de rayon de Stokes de 3.6 nm migrant en pré- $\beta$ . Ce changement de propriétés physiques de l'apoA-I sécrétée est dépendant d'ABCA1 mais pas de la lipodation de la particule. Cette particule de 3.6 nm de rayon va acquérir ensuite des phospholipides sous l'action d'ABCA1 et former ainsi une pré $\beta$ -HDL biologiquement active pour promouvoir l'efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques (Chau et al., 2006) (**Figure 7**).



**Figure 7: Biogenèse des pré $\beta$ -HDL par ABCA1**  
(d'après Chau *et al*, 2006)

L'apoA-I sécrétée de 2.6nm est convertie par ABCA1 en un produit de 3.6nm. Cette particule de 3.6nm va acquérir ensuite des PL sous l'action d'ABCA1 et former une pré $\beta$ -HDL.

#### **4-2-2) Efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques**

Les pré $\beta$ -HDL sont les premiers accepteurs du cholestérol excédentaire des tissus périphériques. Différents mécanismes passifs ou actifs ont été décrits pour l'efflux de cholestérol vers des accepteurs extracellulaires.

Un des processus passifs est la diffusion passive du cholestérol de la surface cellulaire vers différents accepteurs extracellulaires tels que les HDL. Cet efflux de cholestérol nécessite un gradient de concentration entre la membrane de la cellule donneuse et la particule accepteuse. Physiologiquement, la LCAT (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase) permet d'établir ce gradient de concentration en estérifiant le cholestérol présent dans la lipoprotéine.

Les échanges de cholestérol entre la membrane cellulaire et les lipoprotéines peuvent être augmentés par des récepteurs membranaires tels que SR-B1 qui fixe les lipoprotéines à la surface cellulaire et induit une redistribution du cholestérol dans des domaines membranaires (de La Llera-Moya et al., 2001).

Les processus actifs d'efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques impliquent différents transporteurs appartenant à la famille des ABC transporteurs : ABCA1 précédemment évoqué pour la formation de pré $\beta$ -HDL au niveau du foie et de l'intestin et ABCG1 (ATP Binding Cassette G1).

#### **4-2-2-1) ABCA1**

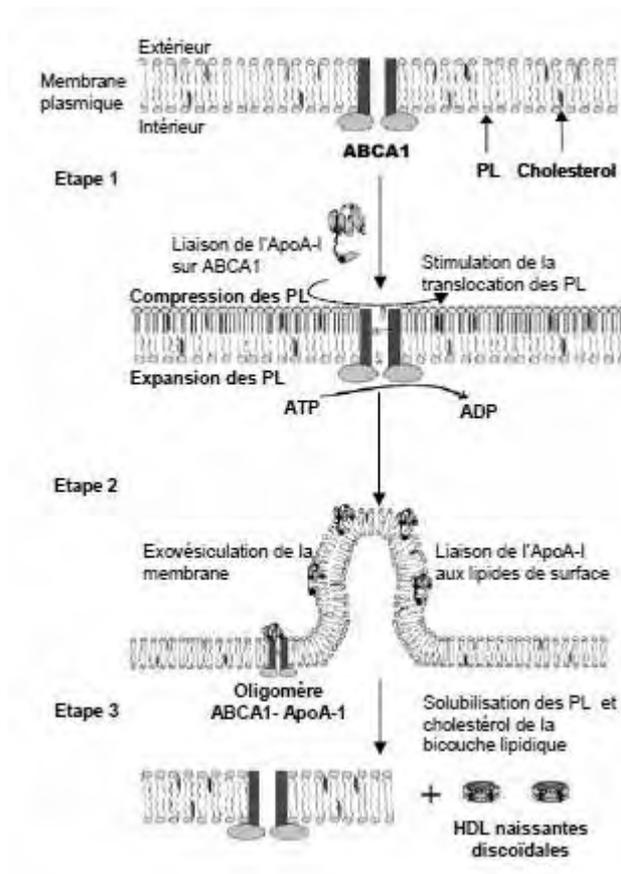
Il a été montré que l'inactivation d'ABCA1 au niveau des macrophages a une faible influence sur les taux plasmatiques de HDL, suggérant qu'ABCA1 au niveau des macrophages ne contribue pas significativement à la formation des HDL (Haghighi et al., 2001). Cependant, l'inactivation spécifique d'ABCA1 au niveau des macrophages chez des souris déficientes pour l'apoE induit une augmentation significative du développement de l'athérosclérose (Aiello et al., 2002). Ainsi, ABCA1 en participant à l'efflux de cholestérol est un élément essentiel dans la prévention d'une accumulation excessive de cholestérol dans les macrophages. En effet, il a été montré que l'efflux de cholestérol et de phospholipides vers l'apoA-I à partir de fibroblastes et de macrophages de patients atteints de la maladie de Tangier (mutation d'ABCA1) est fortement diminué, induisant de ce fait une accumulation de cholestérol et de cholestérol ester dans ces cellules. Comme les patients de la maladie de Tangier, les souris invalidées pour ABCA1 présentent une déficience en HDL et une activité d'efflux du cholestérol cellulaire diminuée (McNeish et al., 2000).

Le mécanisme par lequel ABCA1 induit l'efflux de cholestérol vers les particules est encore très ambigu et différentes questions sont encore à l'ordre du jour. Une interaction entre apoA-I et ABCA1 est-elle nécessaire pour l'efflux du cholestérol ? L'efflux de cholestérol nécessite-t-il un processus de rétroendocytose ?

L'étude de différents mutants d'ABCA1 suggère l'existence d'une interaction directe entre les particules d'apoA-I et ABCA1. À l'exception d'un (W590S), tous les mutants d'ABCA1 dont l'activité d'efflux de cholestérol est inhibée n'ont pas la capacité de lier l'apoA-I (Fitzgerald et al., 2002). Ceci suggère donc qu'une interaction entre l'apoA-I et ABCA1 est nécessaire pour l'efflux de cholestérol.

Vedhachalam C *et al* ont proposé un modèle d'efflux de cholestérol vers l'apoA-I en utilisant des macrophages J774 (Vedhachalam et al., 2007). Ce modèle comporte 3 étapes (**Figure 8**):

- la liaison de l'apoA-I sur ABCA1 qui est localisé au niveau de la membrane plasmique. L'apoA-I stimule l'activité d'ABCA1 induisant ainsi la translocation de phospholipides de la membrane interne vers la membrane externe.
- cette concentration de phospholipides au niveau de la membrane externe va entraîner un repliement de la membrane et la formation d'une exovésicule que l'apoA-I pourra lier avec une forte affinité
- les particules d'apoA-I liées à la membrane vont provoquer la solubilisation des phospholipides et du cholestérol présents dans l'exovésicule et former ainsi des particules HDL naissantes.



**Figure 8:**

**Mécanisme d'efflux du cholestérol induit par l'interaction entre ABCA1 et l'apoA-1**

(d'après Vedhachalam *et al*, 2007)

À l'inverse, d'autres études sont en faveur d'une internalisation de l'apoA-I pour la lipidation et la resécrétion (processus de rétroendocytose). Ainsi, une fois l'apoA-I liée à

ABCA1, le complexe ABCA1/apoA-I serait internalisé et dirigé vers les endosomes tardifs où l'apoA-I pourra se charger en lipides. L'apoA-I ainsi lipidée pourra être resécritée dans le milieu extracellulaire par exocytose (Chen et al., 2005) (Lorenzi et al., 2008a). Ce processus de rétroendocytose du complexe ABCA1/apoA-I est essentiel lorsque les cellules sont chargées en cholestérol excédentaire (Azuma et al., 2009). Cependant, ce processus n'est pas indispensable en absence de surcharge en cholestérol suggérant que ABCA1 peut également induire l'efflux de lipides vers l'apoA-I à la surface cellulaire (Azuma et al., 2009). L'efflux de lipides catalysé par ABCA1 génère des particules HDL naissantes ou discoïdales qui seront de très bons accepteurs pour l'efflux de cholestérol *via* ABCG1 (Gelissen et al., 2006).

#### 4-2-2-2) ABCG1

ABCG1 appartient également à la famille des ABC transporteurs et est fortement exprimé à la surface cellulaire des macrophages. Il s'agit d'un héli-transporteur contenant un seul site de liaison des nucléotides, qui pour être fonctionnel a besoin d'être dimérisé.

Le rôle d'ABCG1 dans l'efflux de cholestérol a été confirmé dans des modèles de souris transgéniques. L'inactivation d'ABCG1 chez la souris sous régime riche en graisses et cholestérol entraîne une accumulation massive de lipides neutres et de phospholipides dans le foie, les poumons et en particulier dans les macrophages infiltrés dans ces tissus. En parallèle, une surexpression d'ABCG1 protège de l'accumulation de lipides induite par le régime (Kennedy et al., 2005).

Contrairement à ABCA1, ABCG1 ne contribuerait pas à l'efflux de phospholipides et de cholestérol cellulaire vers les pré $\beta$ -HDL mais vers des particules HDL déjà lipidées de type  $\alpha$ HDL. En effet, des études *in vitro* ont montré que des macrophages invalidés pour ABCG1 avaient une diminution de l'efflux de cholestérol vers des particules HDL mais pas de modification de l'efflux vers l'apoA-I (Kennedy et al., 2005). Il semblerait donc que ABCA1 et ABCG1 puissent agir de façon synergique, ABCG1 lipidant les particules HDL formées sous l'action d'ABCA1 (Lorenzi et al., 2008b).

Actuellement, nous possédons très peu de connaissances sur le mécanisme par lequel ABCG1 induit l'efflux de cholestérol vers des particules HDL naissantes. D'après Vaughan et Oram, il semblerait que ABCG1 induise une redistribution du cholestérol au niveau de la membrane cellulaire dans des domaines où celui-ci devient disponible pour les particules HDL mais pas pour des particules d'apoA-I délipidées (Vaughan and Oram, 2005). Contrairement à ABCA1, le rôle de ABCG1 chez l'homme reste à confirmer.

#### **4-2-2-3) SR-B1**

SR-B1 est un autre transporteur également présent dans les macrophages qui pourrait jouer un rôle dans le processus d'efflux de cholestérol. En effet, des macrophages J774 surexprimant de façon stable SR-B1 exportent plus de cholestérol vers les HDL que les cellules contrôles (Huang et al., 2003). Lorenzi *et al* ont démontré que comme ABCG1, SR-B1 était responsable de l'efflux de cholestérol vers des particules HDL naissantes et non vers l'apoA-I. Il semblerait également que le degré de lipidation des particules HDL influence fortement l'interaction des HDL naissantes avec ABCG1 ou SR-B1. En effet, l'invalidation d'ABCG1 dans des macrophages RAW264.7 induit une diminution de l'efflux de cholestérol vers des particules HDL faiblement lipidées tandis qu'une invalidation de SR-B1 entraîne une diminution de l'efflux vers des particules HDL plus riches en lipides (Lorenzi et al., 2008b). Ainsi, il est possible que les particules générées par ABCG1 constituent des substrats pour SR-B1 mais ceci reste à démontrer.

Malgré l'implication de SR-B1 dans le processus d'efflux de cholestérol vers les HDL dans les études *in vitro*, le rôle de SR-B1 *in vivo* est moins clair. En effet, d'après les études de Wang *et al* il semblerait que SR-B1 ne joue pas de rôle *in vivo* dans l'efflux de cholestérol à partir des macrophages. Seuls ABCA1 et ABCG1 participeraient *in vivo* à l'efflux de cholestérol excédentaire des macrophages (Wang et al., 2007).

### **4-3) Remodelage plasmatique des HDL**

#### **4-3-1) LCAT (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase)**

Après avoir capté le cholestérol libre des tissus périphériques, les pré $\beta$ -HDL discoïdales sont dans un premier temps remodelées sous l'action de la LCAT en HDL<sub>3</sub> sphériques. La LCAT est une glycoprotéine de 416 acides aminés sécrétée par le foie, qui joue un rôle majeur dans le métabolisme des HDL. Elle catalyse le transfert d'un acide gras de la phosphatidylcholine vers le résidu hydroxyle du cholestérol dans des particules HDL discoïdales. Le cholestérol ester ainsi formé migre vers le cœur de la HDL ce qui lui confèrera une forme sphérique.

Chez l'homme, les mutations de la LCAT sont associées au syndrome de déficience en LCAT et à la « fish-eye disease » caractérisées par une forte diminution du taux de HDL matures et une accumulation de particules HDL discoïdales dans le plasma (Zannis et al., 2006). Toutefois, les patients déficients pour la LCAT ne développent pas d'athérosclérose prématurément.

La réaction de transestérification par la LCAT nécessite la présence de l'apoA-I. En effet, un anticorps monoclonal reconnaissant l'apoA-I ainsi que la liaison de l'heptaglobine sur l'apoA-I inhibe l'activité de la LCAT en masquant son site d'activation (Meng et al., 1993) (Spagnuolo et al., 2005). De plus, des mutations ponctuelles de l'hélice  $\alpha 6$  de l'apoA-I inhibent l'activation de la LCAT et miment le phénotype de déficience en cette enzyme chez l'homme (Chroni et al., 2005).

En déplaçant le cholestérol libre de la surface des lipoprotéines, la LCAT permet de maintenir un gradient de cholestérol entre les cellules et les HDL. Ainsi, la LCAT pourrait jouer un rôle essentiel dans le RCT en favorisant l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers les HDL. Cependant, Tanigawa *et al* ont récemment démontré que, malgré l'augmentation des taux de HDL-cholestérol plasmatiques, la surexpression de la LCAT chez la souris entraîne de façon inattendu une diminution du RCT des macrophages vers les fèces *in vivo*. La coexpression de la CETP empêche cette diminution du RCT mais n'induit pas toutefois une augmentation du RCT. De plus, chez les souris invalidées pour la LCAT présentant une forte diminution des taux plasmatiques en HDL-cholestérol (-93%), on observe seulement une diminution de 50% du RCT des macrophages vers les fèces. Ces résultats mettent en évidence la complexité des modulations du RCT par le biais de l'activité de la LCAT du fait de l'existence probable de mécanismes de compensation (Tanigawa et al., 2009).

#### **4-3-2) PLTP (Phospholipid Transfer Protein)**

La PLTP est un facteur majeur régulant la taille et la composition des HDL ainsi que leur taux plasmatique. Cette protéine de 81 kDa fait partie de la famille des protéines de transfert de lipides. Elle permet les échanges de phospholipides des lipoprotéines riches en triglycérides telles que les VLDL vers les HDL (Masson et al., 2009). L'importance de l'activité de transfert de phospholipides par la PLTP a été démontrée *in vivo* dans des souris invalidées pour cette protéine. En effet, le plasma de souris invalidées pour la PLTP présente une incapacité à induire le transfert de différents phospholipides dans un test *in vitro* (Jiang et al., 1999). De plus, la capacité de transférer de la phosphatidylcholine marquée des VLDL vers les HDL est totalement abolie *in vivo* chez ces souris. Ainsi, les souris déficientes pour la PLTP présentent une forte diminution des taux de phospholipides, cholestérol et apoA-I associés aux HDL, pouvant s'expliquer par un hypercatabolisme des particules HDL déplétées en phospholipides (Jiang et al., 1999) (Qin et al., 2000).

L'expression de la CETP chez les souris déficientes en PLTP ne modifie pas l'activité de transfert de phospholipides; ainsi, la PLTP est la principale enzyme responsable du transfert des phospholipides *in vivo* (Kawano et al., 2000). Sous régime enrichi en graisses, les souris déficientes en PLTP présentent également une diminution des taux plasmatiques de HDL mais une augmentation des taux plasmatiques en phospholipides, cholestérol et cholestérol ester associés aux VLDL et LDL sans changement des taux d'apoB-100, suggérant une accumulation des composés de surface dans les lipoprotéines enrichies en triglycérides (Jiang et al., 1999). De façon similaire à la souris, chez l'homme, la PLTP semble être la principale enzyme responsable du transfert de phospholipides dans le plasma. En effet, une déplétion de la PLTP plasmatique par immunoprécipitation dans du plasma humain induit une diminution d'environ 50 à 72% du transfert de phospholipides entre VLDL/LDL et HDL (Cheung et al., 1996).

De plus, la PLTP plasmatique est responsable de la conversion des HDL<sub>3</sub> en HDL<sub>2</sub> et pré $\beta$ -HDL (Tu et al., 1993). En utilisant des particules HDL reconstituées contenant des phospholipides ou du cholestérol ester marqués au pyrène, Lusa *et al* ont proposé un modèle dans lequel la réaction initiale pour la conversion des HDL par la PLTP est un transfert de phospholipides suivi par la libération d'une particule d'apoA-I délipidée et la fusion des particules instables générées (Lusa et al., 1996). Huuskonen *et al* ont démontré, en utilisant des mutants de la PLTP avec une activité de transfert de phospholipides diminuée, que le transfert de phospholipides est essentiel pour induire la conversion des HDL par la PLTP (Huuskonen et al., 2000).

En outre, par son activité de transfert de PL, la PLTP est capable de transférer d'autres composés tels que l' $\alpha$ -tocophérol (la forme la plus antioxydante de la vitamine E), le cholestérol et des lipopolysaccharides (Gautier et al., 2008; Huuskonen et al., 2001). Ainsi, l'invalidation de la PLTP chez la souris est associée à une diminution de la susceptibilité à l'athérosclérose malgré une diminution du taux plasmatique de HDL. Cette diminution de la susceptibilité à l'athérosclérose chez les souris invalidées pour la PLTP est due à une réduction des taux plasmatiques des lipoprotéines athérogènes contenant de l'apoB et à une accumulation de vitamine E, aux propriétés anti-oxydantes, dans ces lipoprotéines (Jiang et al., 2002) (Jiang et al., 2001). Inversement, la surexpression de la PLTP humaine chez la souris par infection adénovirale induit une augmentation des taux plasmatiques de pré $\beta$ -HDL et une forte diminution des taux de HDL plasmatiques résultant d'une accélération du catabolisme des HDL (Foger et al., 1997). Dans des souris hyperlipidémiques invalidées pour

l'apoE, une surexpression de la PLTP par infection adénovirale induit une augmentation de la taille des lésions athéromateuses qui est accompagnée d'une diminution des taux plasmatiques en apoA-I, HDL-cholestérol et phospholipides et d'une diminution des taux de vitamine E associée aux lipoprotéines contenant de l'apoB (Yang et al., 2003). Ces travaux suggèrent donc un rôle pro-athérogène de la PLTP.

Cependant, par une technique de transfert de moelle osseuse, Valenta *et al* ont démontré que des macrophages déficients pour la PLTP augmentent la taille des lésions athéromateuses chez des souris LDLR<sup>-/-</sup>, suggérant donc un rôle athéroprotecteur de la PLTP au niveau des macrophages (Valenta et al., 2006). Ainsi, ces différents travaux proposent donc que les effets anti-athérogènes et pro-athérogènes de la PLTP dépendent de son site d'action.

#### **4-3-3) CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein)**

La CETP est une glycoprotéine hydrophobe de 74 kDa appartenant à la famille des protéines de transfert de lipides comme la PLTP. Les principaux tissus responsables de la synthèse de la CETP sont le foie et le tissu adipeux et cette enzyme est principalement liée aux HDL plasmatiques (Barter and Kastelein, 2006).

La CETP joue un rôle central dans le métabolisme du cholestérol en transférant des lipides hydrophobes (cholestérol ester et triglycérides) entre les HDL et les lipoprotéines contenant l'apoB selon un gradient de concentration, conduisant ainsi à une déplétion en cholestérol ester et un enrichissement en triglycérides du cœur des HDL. Une fois transféré dans les LDL et VLDL, le cholestérol ester devient disponible pour la captation hépatique *via* le LDLR, ainsi la CETP pourrait avoir un rôle anti-athérogène. Cependant, en transférant le cholestérol ester des HDL vers les lipoprotéines à apoB, la CETP diminue la concentration des particules anti-athérogènes HDL et augmente la concentration des particules pro-athérogènes LDL (Barter and Kastelein, 2006). Ces dernières années, de nombreuses études *in vivo* ont été réalisées pour déterminer les propriétés anti- ou pro-athérogènes de la CETP.

L'introduction du gène humain de la CETP chez la souris, qui n'exprime pas naturellement la CETP, a conduit à des observations variables sur le développement de l'athérosclérose. L'expression de la CETP augmente le développement de l'athérosclérose dans des modèles de souris hypercholestérolémiques telles que les souris invalidées pour l'apoE ou pour le LDLR (Plump et al., 1999). Par contre, chez un modèle de souris hypertriglycéridémiques (souris exprimant l'apoC-III humaine), l'expression de la CETP a un effet anti-athérogène (Hayek et al., 1995).

Contrairement à la souris, le lapin, comme l'homme, possède une forte activité CETP et constitue un modèle idéal pour l'étude des effets d'une inhibition de cette enzyme. Une inhibition de la CETP par l'utilisation d'oligodéoxynucléotides antisens ou d'un vaccin induit une augmentation des taux de HDL-cholestérol et une diminution de la formation de la plaque d'athérome chez des lapins placés sous régime enrichi en cholestérol (Sugano et al., 1998) (Rittershaus et al., 2000). De plus, il existe au Japon, une population déficiente en CETP présentant un taux élevé de HDL et une augmentation du catabolisme des LDL, lipoprotéines pro-athérogènes (Ikewaki et al., 1995). Une récente méta-analyse de trois différents SNPs (polymorphismes nucléotidiques simples) dans le gène de la CETP a montré une diminution faible mais significative du risque de maladies cardiovasculaires chez les porteurs d'allèles de la CETP associés à une diminution de l'activité de la CETP et une augmentation de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol (Thompson et al., 2008). Par ces études et les résultats obtenus chez le lapin, des inhibiteurs de la CETP tels que le Torcetrapib ont été développés. Les effets de ces inhibiteurs chez l'homme seront développés dans le chapitre II.

#### **4-3-4) Lipase hépatique et lipase endothéliale**

Les lipases sont des enzymes hydrophiles capables d'hydrolyser des substrats hydrophobes comme les triglycérides, le cholestérol ester et les phospholipides. Deux d'entre elles sont impliquées dans le remodelage des HDL : la lipase hépatique (LH) et la lipase endothéliale (LE). Bien que la LH et la LE ont toutes deux des activités phospholipase et triglycéride lipase, la LE possède une faible activité triglycéride lipase contrairement à la LH (McCoy et al., 2002).

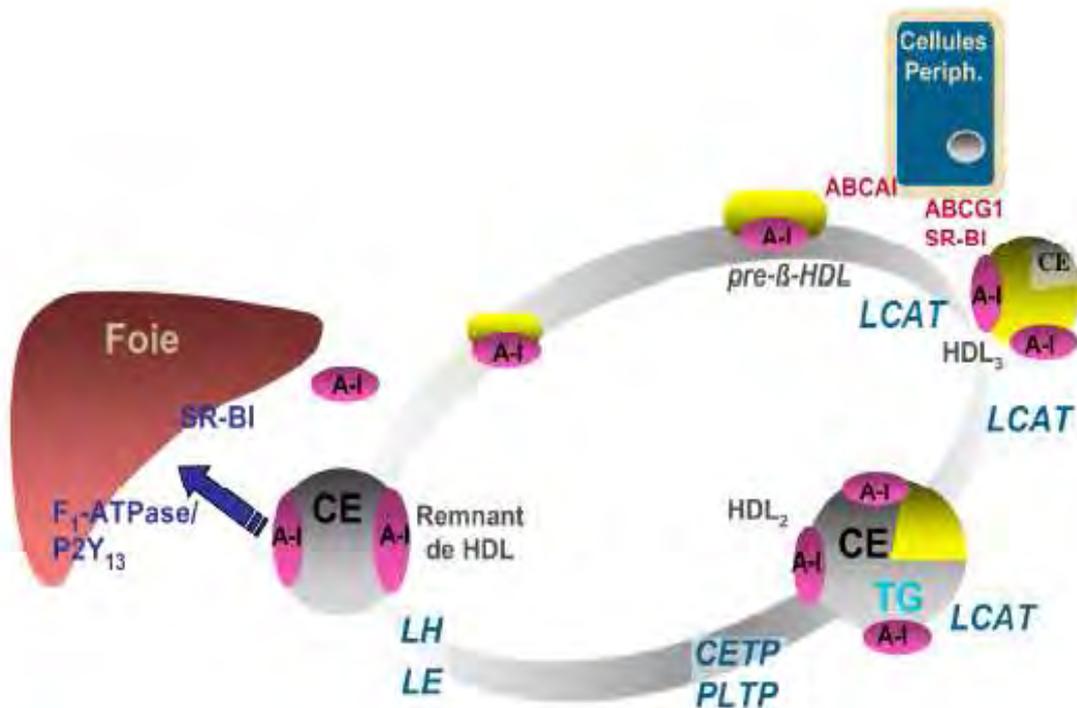
La LH est une protéine majoritairement exprimée par le foie. Une fois sécrétée, elle se fixe aux groupements de type héparane-sulfate à la surface des cellules endothéliales des capillaires et des hépatocytes dans l'espace de Disse. Elle est responsable de l'hydrolyse des triglycérides et phospholipides de la plupart des lipoprotéines (remnants de chylomicrons, VLDL, LDL et HDL). Dans le métabolisme des HDL, la LH permet la lipolyse des HDL<sub>2</sub> enrichies en triglycérides par la CETP et en phospholipides par la PLTP. Sous l'action de la LH, les HDL<sub>2</sub> sont remodelées en particules appauvries en triglycérides (-60%) appelées remnants de HDL<sub>2</sub> qui sont préférentiellement captés par le foie. Ce remodelage est associé à la libération de pré $\beta$ -HDL, accepteurs préférentiels pour l'efflux de cholestérol (Barrans et al., 1994) (Guendouzi et al., 1999). De plus, Collet *et al* ont démontré *in vitro* que l'activité de la LH augmentait la captation du cholestérol ester des HDL *via* SR-B1 (Collet et al., 1999).

En plus de son activité lipolytique, la LH a une fonction ligand qui facilite la captation des lipoprotéines et de leurs lipides par des récepteurs cellulaires. En effet, la surexpression d'une forme catalytiquement inactive de la LH dans des souris déficientes pour cette enzyme induit une diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol, phospholipides et HDL-cholestérol. Cependant, la clairance de l'apoA-I des HDL est seulement augmentée chez les souris traitées avec la forme sauvage de la LH, suggérant donc un important rôle de l'activité catalytique dans le catabolisme des HDL (Dugi et al., 2000). Ainsi, la LH est une protéine complexe avec de multiples fonctions et pourrait donc jouer à la fois des rôles pro- et anti-athérogènes. L'expression de la LH humaine chez la souris placée sous régime enrichi en cholestérol entraîne une diminution de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol et une diminution de l'accumulation du cholestérol dans l'aorte (Busch et al., 1994). Cependant, l'inactivation de la LH chez des souris apoE<sup>-/-</sup> induit également une diminution de l'athérosclérose malgré une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol (Mezdour et al., 1997). Cette contradiction sur le rôle pro et anti-athérogène de la LH est aussi vraie pour les études chez l'homme. En effet, bien que les patients déficients pour la LH développent prématurément des lésions d'athérosclérose, une augmentation de l'activité de la LH a été mesurée chez des patients coronariens (Santamarina-Fojo et al., 2004).

La LE est exprimée par les cellules endothéliales mais également par les hépatocytes et les macrophages (Hasham and Pillarsetti, 2006). Cette enzyme est un déterminant majeur de la concentration, de la structure et du métabolisme des HDL puisque son inactivation conduit à un ralentissement de la clairance des HDL et donc à une augmentation des concentrations plasmatiques en HDL-cholestérol et apoA-I (Ma et al., 2003). Chez les souris invalidées pour la LE, la taille des particules HDL est augmentée. À l'inverse, la surexpression hépatique de la LE induit une diminution des taux plasmatiques en PL, HDL-cholestérol et apoA-I accompagnée d'une formation de HDL de petites tailles pauvres en lipides et d'un catabolisme accéléré de l'apoA-I radiomarquée issue des HDL par le foie et les reins. Maugeais *et al* suggèrent donc que la LE déplete les particules HDL en PL ce qui déstabilise l'apoA-I et induit sa dissociation et son catabolisme par les reins (Maugeais et al., 2003). Comme la LH, la LE possède une fonction ligand; Fuki *et al* ont montré que l'expression de la LE dans des cellules CHO augmente la liaison des HDL radiomarquées et cette capacité de liaison est présente même en absence de l'activité catalytique de l'enzyme (Fuki et al., 2003). Cependant, l'expression d'une forme catalytiquement inactive de la LE chez la souris n'induit pas de modification des taux de HDL-cholestérol. Ainsi l'effet de la

surexpression de la LE sur le métabolisme des HDL est essentiellement dû à l'activité lipolytique de la LE (Broedl et al., 2003).

Plusieurs SNPs du gène humain de la LE tels que le SNP 584C/T ont été décrits chez des patients avec des taux plasmatiques élevés de HDL-cholestérol (Ma et al., 2003).



**Figure 9: Remodelage plasmatique des HDL**

Les préβ-HDL acquièrent du cholestérol libre à partir des tissus périphériques pour devenir des HDL<sub>3</sub> puis des HDL<sub>2</sub> après estérification de leur cholestérol par la LCAT. Sous l'action combinée de le CETP et de la PLTP, les HDL<sub>2</sub> vont s'enrichir en triglycérides et phospholipides qui vont être ensuite hydrolysés par la LH et la LE pour donner une HDL<sub>2</sub> résiduelle (remnant de HDL) qui sera captée par le foie et une apoA-1 faiblement lipidée.

#### **4-4) Captation hépatique des HDL**

Après avoir subi les différents processus de maturation plasmatique, les HDL vont être captées par le foie et leur cholestérol sera ensuite éliminé dans les voies biliaires soit sous forme libre soit après conversion en acides biliaires. Le processus de captation hépatique des HDL est au cœur des préoccupations de notre laboratoire depuis de nombreuses années.

Deux voies principales permettent cette captation hépatique: la première correspond à la captation sélective du cholestérol ester transporté par les HDL, captation dépendante de SR-B1 et la seconde, mise en évidence par notre équipe, implique le couple ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> qui permet la captation hépatique de l'holoparticule HDL (lipides et protéines).

#### **4-4-1) SR-B1 et la captation sélective du cholestérol ester**

SR-B1 est une glycoprotéine de 509 acides aminés (57 kDa sous sa forme déglycosylée et 82 kDa sous sa forme native) formée d'une large boucle extracellulaire ancrée par deux domaines transmembranaires adjacents aux extrémités cytoplasmiques N- et C-terminales. Le nom de récepteur « scavenger » ou « éboueur » en français vient de la capacité de SR-B1 à lier de nombreux ligands comme les LDL natives ou modifiées par oxydation ou acétylation, des phospholipides anioniques ou encore des apolipoprotéines libres. SR-B1 lie également avec une grande affinité les HDL (Acton et al., 1996).

SR-B1 est exprimé dans de nombreux types cellulaires chez les mammifères, incluant les entérocytes, les macrophages, les cellules musculaires lisses, les kératinocytes, les adipocytes et les plaquettes. Mais ces principaux sites d'expression sont les tissus connus pour être activement impliqués dans le catabolisme du cholestérol, comme le foie (synthèse des acides biliaires), les glandes surrénales, les ovaires et les testicules (stéroïdogénèse) (Acton et al., 1996).

Au niveau du foie et des tissus stéroïdiens, SR-B1 est responsable de la captation sélective du cholestérol ester contenu dans le cœur des HDL. Il semblerait que SR-B1 lie les HDL puis que leur contenu en cholestérol ester soit délivré au niveau de la membrane plasmique sans internalisation de la particule entière (Acton et al., 1996). Dans ce processus, la liaison des HDL à SR-B1 est nécessaire mais pas suffisante pour induire la captation sélective du cholestérol ester. En effet, un mutant de SR-B1, N173Q, caractérisé par une absence de glycosylation du résidu 173 présente une augmentation de l'affinité de liaison pour les HDL associée à une perte de l'activité de captation sélective (Vinals et al., 2003).

Le mécanisme par lequel SR-B1 transfère le cholestérol ester des HDL à la membrane plasmique n'est pas encore très clair. Des études utilisant des liposomes artificiels reconstitués avec SR-B1 purifié ont démontré que SR-B1 pouvait lier les HDL et induire la captation sélective du cholestérol ester sans la participation d'autres protéines (Liu and Krieger, 2002). Cependant, il a été montré qu'une association de SR-B1 avec la lipase hépatique favorise la captation du cholestérol ester probablement par une modification de la conformation de la lipoprotéine (Collet et al., 1999).

Différents modèles sont proposés pour la captation sélective du cholestérol ester *via* SR-B1. Rodriguez *et al* proposent un modèle dans lequel SR-B1 formerait un canal hydrophobe entre la lipoprotéine et la membrane plasmique au travers duquel le cholestérol ester pourrait diffuser. Pour former un tel canal, SR-B1 pourrait se dimériser ou se multimériser (Rodriguez et al., 1999). Un autre modèle a été proposé dans lequel la captation

sélective du cholestérol ester des HDL par les hépatocytes impliquerait un phénomène de rétroendocytose des HDL. Dans ce processus de rétroendocytose, la particule HDL serait internalisée avec SR-B1, libérée de son contenu en cholestérol ester et resécritée sous une forme appauvrie en lipides au niveau du pôle basolatéral (Silver et al., 2001). En effet, sur des hépatocytes de souris, il a été montré, à l'aide de HDL marquées à la fois sur la partie protéique et lipidique, une colocalisation des HDL avec SR-B1 dans différents compartiments intracellulaires (la membrane basolatérale, les endosomes de recyclage et le compartiment subapical de la cellule). Cependant, des expériences de « pulse-chase » à l'aide de HDL marquées à l'iode 125 et biotinylées ont permis de montrer que la contribution de ce mécanisme de rétroendocytose dans la captation sélective était faible par rapport au transfert direct du cholestérol ester sans captation de la particule HDL entière (Sun et al., 2006). De plus, Nieland *et al* ont démontré que la captation sélective du cholestérol ester n'est pas dépendante d'un processus d'endocytose: en effet en conditions hyperosmotiques ou après déplétion intracellulaire en  $K^+$ , la captation sélective du cholestérol ester n'est pas modifiée (Nieland et al., 2005). Pagler *et al* ont mis en évidence que le processus de rétroendocytose des HDL *via* SR-B1 n'est pas associé à la captation sélective du cholestérol ester mais à l'efflux de cholestérol. La rétroendocytose des HDL permettrait donc à la cellule d'exporter son cholestérol intracellulaire en excès (Pagler et al., 2006).

L'importance physiologique de SR-B1 dans la captation hépatique du cholestérol a été clairement démontrée chez la souris en utilisant différents modèles génétiquement modifiés. La surexpression de SR-B1 au niveau hépatique par infection adénovirale ou par transgénèse se traduit par une diminution importante du taux de HDL plasmatiques, corrélée à une accélération de la captation hépatique du cholestérol de ces particules et une augmentation de la concentration en cholestérol dans la bile. Ces animaux présentent également une chute des taux plasmatiques de cholestérol associé aux VLDL et LDL suggérant qu'une surexpression de SR-B1 favorise également le catabolisme des LDL (Kozarsky et al., 1997) (Wang et al., 1998). À l'inverse, une invalidation partielle de SR-B1 chez la souris induit une augmentation dose dépendante du cholestérol plasmatique (+31% pour les hétérozygotes et +125% pour les homozygotes). La composition plasmatique en lipoprotéines chez ces souris montre une accumulation de particules HDL de taille plus importante correspondant à des HDL enrichies en cholestérol (Rigotti et al., 1997) (Brundert et al., 2005). De plus, l'invalidation de SR-B1 induit une diminution de 30% de la concentration en cholestérol dans la bile (Trigatti et al., 1999). Ces résultats suggèrent donc, que chez la souris, SR-B1 joue un rôle important dans les dernières étapes du transport retour du cholestérol (captation hépatique du cholestérol et

élimination biliaire). En utilisant des HDL doublement marquées à l'iode 125 et au cholestérol ester tritié, Brundert *et al* ont montré que l'inactivation de SR-B1 chez la souris diminue d'environ 90% la captation sélective du cholestérol ester transporté par les HDL (Brundert et al., 2005). SR-B1 est donc le principal récepteur impliqué dans la captation sélective du cholestérol ester des HDL au niveau hépatique chez la souris. Ainsi SR-B1 devrait avoir un rôle athéroprotecteur.

Il est cependant difficile d'extrapoler ces résultats à la physiopathologie humaine et il convient de prendre en compte les limites du modèle murin. En effet, les souris ont un métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines qui n'est pas comparable à l'homme. Les souris sont naturellement déficientes pour la CETP; ainsi les HDL sont les principaux transporteurs plasmatiques de cholestérol chez ces animaux alors que chez l'homme qui possède la CETP ce sont les LDL qui assurent cette fonction.

Un modèle de souris transgéniques plus proche de l'homme en ce qui concerne le métabolisme des lipoprotéines peut être utilisé. Il s'agit des souris invalidées pour le LDLR qui présentent une augmentation importante des taux plasmatiques en LDL-cholestérol qui sont proportionnellement proches de l'homme et développent des lésions athéromateuses dans des conditions de régimes riche en cholestérol. La surexpression hépatique de SR-B1 par infection adénovirale chez des souris LDLR<sup>-/-</sup> diminue la progression du développement des lésions athéromateuses ainsi que la concentration plasmatique en cholestérol associé aux HDL (Kozarsky et al., 2000). Ainsi cette étude met en avant l'effet athéroprotecteur de SR-B1 à différents stades de développement de la pathologie et il est intéressant de noter que ces résultats vont à l'encontre du dogme qui veut que les taux de HDL sont inversement corrélés avec l'apparition des maladies cardiovasculaires. Ainsi, une baisse du taux de HDL plasmatiques peut avoir des effets athéroprotecteurs si elle est due à une augmentation de l'élimination hépatique des particules HDL. Le rôle physiologique de SR-B1 a également été démontré dans les travaux de Huby *et al*. En conditions de régime athéromateux, les souris invalidées pour SR-B1 spécifiquement au niveau hépatique présentent des lésions de taille plus importante par rapport à des souris contrôles. Cette augmentation de la taille des lésions est corrélée avec une augmentation des concentrations plasmatiques en cholestérol. Cependant ces souris présentent des lésions athéromateuses de plus petite taille par rapport à des souris ayant une inactivation totale de SR-B1 et ceci malgré des taux plasmatiques en cholestérol similaires. Ces résultats confirment donc le rôle athéroprotecteur de SR-B1 au niveau hépatique mais proposent également un rôle anti-athérogénique de SR-B1 au niveau des tissus périphériques indépendamment des modifications des paramètres lipidiques plasmatiques

(Huby et al., 2006). De plus, chez ces souris placées sous régime athéromateux (enrichi en cholestérol, graisses et acide cholique), il a pu être observé une accumulation des lipoprotéines de type VLDL suggérant ainsi un rôle de SR-B1 dans le catabolisme des lipoprotéines contenant de l'apoB. Dans des hépatocytes primaires murins, il a été montré que SR-B1 favorise la captation sélective du cholestérol ester des HDL mais également des LDL (Rhainds et al., 2003). De plus, les travaux de Hildebrand *et al* ont montré que l'expression de la CETP chez des souris invalidées pour SR-B1 rétablie des taux de HDL-cholestérol normaux en restaurant le transport du cholestérol ester transporté par les HDL au foie. Cependant aucune modification de la susceptibilité à l'athérosclérose n'est observé chez ces souris invalidées pour SR-B1 et exprimant la CETP (souris SR-B1<sup>-/-</sup> CETP<sup>Tg</sup>). L'absence de modification de la susceptibilité à l'athérosclérose chez les souris SR-B1<sup>-/-</sup> CETP<sup>Tg</sup> est probablement dû à la persistance de taux élevés de VLDL-cholestérol et à une augmentation du statut oxydatif chez ces animaux. Ainsi, l'augmentation de l'athérosclérose observé chez les souris invalidées pour SR-B1 ne semble pas être directement corrélée avec la diminution du catabolisme du cholestérol ester transporté par les HDL mais pourrait être attribuée à d'autres conséquences de la déficience de SR-B1 telles que l'augmentation du stress oxydant et l'accumulation de VLDL-cholestérol (Hildebrand et al.).

Il est cependant difficile de faire une corrélation directe entre le rôle de SR-B1 chez la souris avec la fonction de son homologue CLA-1 chez l'homme. Actuellement 5 variants alléliques de CLA-1 ont été identifiés et trois d'entre eux ont été étudiés du point de vue du métabolisme lipidique. De façon surprenante, parmi ces trois variants, un seul est associé à une légère augmentation du taux plasmatique des HDL alors que deux d'entre eux sont associés à une baisse significative du taux de LDL circulant comparé à la population homozygote pour l'allèle sauvage (Acton et al., 1999). Ainsi, il semblerait donc que chez l'homme SR-B1 soit d'avantage impliqué dans le catabolisme hépatique des LDL que dans celui des HDL. Toutefois, dans les cellules d'hépatocarcinome humain HepG<sub>2</sub>, il a été montré que CLA-1 favorise la captation sélective du cholestérol ester des HDL et des LDL (Rhainds et al., 2003). De plus, dans des modèles de souris chimériques co-exprimant CLA-1 et l'apoA-1 humaine, il a été démontré que CLA-1 peut moduler le métabolisme des HDL (Komori et al., 2008).

#### **4-4-2) La voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/ P2Y<sub>13</sub>**

La vision d'une captation uniquement sélective du cholestérol transporté par les HDL présente certaines limites. L'existence d'autres voies impliquées dans l'endocytose de la particule HDL entière est suggérée notamment par la présence de protéines provenant des HDL dans différents compartiments intracellulaires des hépatocytes, tels que les endosomes de tri (Wustner, 2006).

Notre laboratoire a mis en évidence sur des hépatocytes humains l'existence d'une voie d'endocytose de l'holoparticule HDL (lipides + protéines) dépendant de la formation de vésicules à clathrine (Garcia et al., 1996). Cette voie implique la participation de deux sites de liaison aux HDL d'affinité différente.

##### **4-4-2-1) Collaboration de deux sites de liaison hépatiques aux HDL pour l'endocytose de l'holoparticule HDL**

Le laboratoire a tout d'abord mis en évidence l'existence de deux sites de liaison pour les HDL<sub>3</sub> d'affinité différente : un site de haute affinité ( $K_d \approx 10^{-9}M$ ) et un site de basse affinité ( $K_d \approx 10^{-7}M$ ) sur les cellule HepG<sub>2</sub> (Barbaras et al., 1994). La reconnaissance de ces deux familles de sites par les complexes apoA-I/DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine), montre que la liaison des deux familles de sites se fait *via* l'apoA-I (Barbaras et al., 1994). Cependant l'apoA-1 libre c'est-à-dire délipidée peut seulement se lier aux sites de haute affinité (Barbaras et al., 1994).

Tandis que les HDL<sub>2</sub> enrichies en triglycérides (HDL<sub>2</sub>-TG) sont capables de se lier seulement aux sites de basse affinité (Guendouzi et al., 1998) et l'apoA-1 libre ne liant que les sites de haute affinité, notre équipe a montré sur des cellules HepG<sub>2</sub> que l'internalisation des HDL<sub>2</sub>-TG est augmentée de 30% en présence d'apoA-I (Martinez et al., 2003). De plus, dans des expériences *in situ* de perfusions de foie de souris, l'apoA-1 stimule la captation hépatique de HDL<sub>2</sub>-TG radiomarquées sur la partie protéique (Jacquet et al., 2005). Ainsi, la liaison de l'apoA-I sur les sites de haute affinité est capable de stimuler l'endocytose des HDL *via* les sites de basse affinité.

##### **4-4-2-2) Le site de haute affinité : l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase**

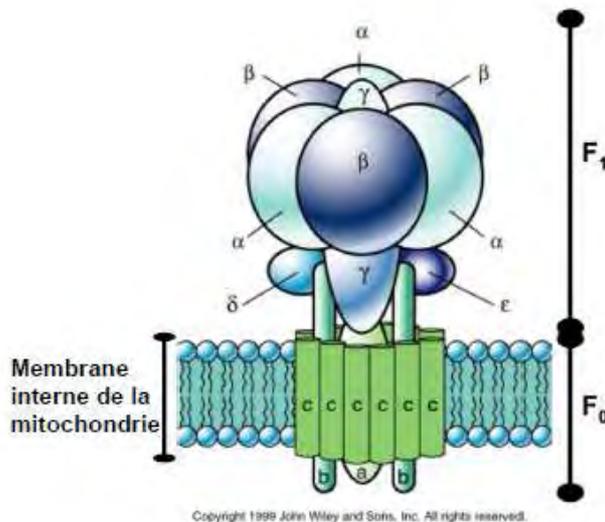
La liaison spécifique de l'apoA-I sur les sites de haute affinité a permis d'identifier à partir de membranes plasmiques de foie de porc par résonance plasmonique de surface

(Biacore) et chromatographie d'affinité la chaîne  $\beta$  de l'ATP synthase comme étant le récepteur de haute affinité pour l'apoA-I libre (Martinez et al., 2003).

L'ATP synthase ou  $F_1F_0$ -ATPase est connue comme étant le complexe enzymatique terminal (Complexe V) de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de  $P_i$  en utilisant l'énergie générée par un gradient de protons (Boyer, 2000). Elle est localisée au niveau des crêtes de la membrane interne de la mitochondrie et est constituée de deux domaines (**Figure 10**):

- la partie  $F_0$  considérée comme un canal à protons de la membrane interne mitochondriale qui contient un nombre variable de sous-unités c (10 à 15) et les sous-unités a, b, d, e, f, g, A6L, F6 et OSCP

- la partie  $F_1$  qui est ancrée sur  $F_0$  et orientée vers la matrice mitochondriale. Celle-ci constitue le domaine catalytique de l'enzyme et est formée de 9 sous-unités assemblées de la façon  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ .



**Figure 10:**  
**Représentation schématique de l'ATP synthase mitochondriale**

L'ATP synthase est constituée de deux parties:  $F_0$  et  $F_1$ . La partie  $F_0$  insérée dans la membrane interne de la mitochondrie constitue un canal à protons. La partie  $F_1$  ancrée sur  $F_0$  et orientée vers la matrice mitochondriale constitue le domaine catalytique.

Dans des conditions normales, en présence du flux de protons, cette enzyme phosphoryle l'ADP en ATP. Quand le flux de protons est absent (en conditions d'hypoxie par exemple), inversé ou lorsque la partie  $F_1$  est découplée de  $F_0$ , l'ATP synthase exerce la fonction inverse, à savoir, l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Cette réaction inverse est régulée par une petite protéine de 10 kDa :  $IF_1$ , un inhibiteur naturel de l'activité hydrolase de l'ATP synthase, qui limite ainsi la perte d'énergie consécutive à l'hydrolyse de l'ATP produit.

La présence du domaine catalytique  $\alpha\beta$  de l'ATP synthase à la surface cellulaire des hépatocytes humains a été confirmée par microscopie confocale et cytométrie de flux (Martinez et al., 2003).

Plusieurs équipes de recherche ont également montré la présence des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATP synthase à la surface de divers types cellulaires avec différentes fonctions associées. Dans l'équipe, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ont été également identifiées à la surface de cellules tumorales d'origine hématopoïétique et rénale, où l'ATP synthase pourrait avoir un rôle dans l'immunité anti-tumorale en étant la cible des lymphocytes T V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2. En effet, la liaison de l'apoA-I sur l'ATP synthase présente à la surface des cellules tumorales stabilise l'interaction de l'ATP synthase avec le TCR (T Cell Receptor) augmentant ainsi la réponse cytotoxique des lymphocytes T V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 (Scotet et al., 2005). De façon surprenante, l'ATP synthase interagit fortement avec le CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) à la surface des cellules tumorales (Vantourout et al., 2008) (cf. Annexe 1 Article 3). Les cellules tumorales ainsi que certains pathogènes sont capables d'inhiber l'expression du CMH-I évitant ainsi la présentation de peptides étrangers qui puissent activer la réponse immune cytolytique. De par les résultats expérimentaux, l'ATP synthase à la surface tumorale pourrait constituer un signal de lyse par l'activation des lymphocytes T V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 lors d'une chute d'expression du CMH-I.

L'ATP synthase est également présente à la surface des cellules endothéliales, HUVECs, où elle joue un rôle dans la survie et la prolifération cellulaires. La liaison de l'apoA-I sur l'ATP synthase de surface stimule la prolifération et inhibe l'apoptose des HUVECs au travers de l'activité hydrolase de l'ATP synthase (Radojkovic et al., 2009). D'autres études ont observé la présence de l'ATP synthase à la surface d'adipocytes, de kératinocytes et de bien autres types cellulaires (Kim et al., 2004) (Burrell et al., 2005) (Champagne et al., 2006).

Contrairement au complexe mitochondrial, à la surface des hépatocytes humains cette ATP synthase possède seulement l'activité hydrolase, d'où le nom d'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase qu'on lui attribue. Cette activité ATP hydrolase est stimulée par l'apoA-I et inhibée par l'IF<sub>1</sub>. L'ADP, le produit d'hydrolyse de l'enzyme, est capable à lui seul de stimuler l'internalisation des HDL par les hépatocytes au même titre que l'apoA-I. De plus, l'IF<sub>1</sub> qui est capable d'inhiber la production d'ADP par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, inhibe à la fois l'internalisation des HDL basale et induite par l'apoA-I dans des hépatocytes humains mais également *in situ* sur des foies de rat perfusés, ce qui supporte la relevance physiologique de cette nouvelle voie d'endocytose hépatique des HDL et démontre sa dépendance aux taux extracellulaires d'ADP (Martinez et al., 2003).

Le métabolisme des adénosines-5'-di et tri phosphate dans le milieu extracellulaire des hépatocytes est donc essentiel dans la régulation de la voie d'endocytose des HDL activée par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. En effet, il a été montré que l'addition dans le milieu extracellulaire de l'apyrase, enzyme qui mime l'activité d'ecto-nucléotidases en dégradant l'ADP et l'ATP, entraîne une inhibition de l'internalisation des HDL par les hépatocytes (Martinez et al., 2003).

Ainsi, dans la première partie de mes travaux expérimentaux, je me suis intéressée à la régulation du métabolisme nucléotidique à la surface des hépatocytes humains, et plus précisément à deux activités enzymatiques responsables de la conversion de nucléotides comme la Nucléoside DiPhosphoKinase (NDPK) et l'Adénylate Kinase (AK). L'objectif de ce projet a donc été d'étudier l'expression et/ou l'activité à la surface cellulaire d'hépatocytes humains (HepG<sub>2</sub>: lignée cellulaire dérivée d'hépatome humain et hépatocytes en culture primaire) de ces deux enzymes, NDPK et AK et d'étudier leur action sur l'endocytose des HDL par ces modèles cellulaires (cf. Chapitre III, Article 1).

#### **4-4-2-3) P2Y<sub>13</sub> : le récepteur à l'ADP**

Les nucléotides extracellulaires sont des molécules de signalisation qui induisent différents effets biologiques au travers de l'activation de récepteurs nucléotidiques à la surface cellulaire. Il existe 2 groupes de récepteurs aux purines, les récepteurs à l'adénosine P1 et les récepteurs P2 qui reconnaissent les nucléotides de type ATP, ADP, UDP et UTP. La famille des récepteurs P2 comportent 2 catégories : les P2X qui sont des canaux ioniques et les P2Y qui sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Chez les mammifères, 8 récepteurs P2Y ont été décrits et clonés : P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub> (von Kugelgen, 2006). Les différents membres de la famille des P2Y présentent une structure à 7 domaines transmembranaires connectés par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. L'extrémité N-terminale est extracellulaire et l'extrémité C-terminale est cytoplasmique.

L'ADP est le ligand naturel des récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>13</sub>. Il se lie sur ces récepteurs avec une plus forte affinité que l'ATP qui se comporte plutôt comme un agoniste partiel (Abbracchio et al., 2006). Alors que les récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> sont impliqués dans l'agrégation plaquettaire (Gachet, 2001), le rôle physiologique de P2Y<sub>13</sub> est encore inconnu. Des travaux récents chez la souris ont montré que le récepteur P2Y<sub>13</sub> est impliqué dans la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques (Amisten et al.). Cependant, chez l'homme l'expression de P2Y<sub>13</sub> au niveau du pancréas est très faible.

Par RT-PCR, notre équipe a montré la présence des messagers de P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>1</sub> dans des hépatocytes humains et murins tandis que P2Y<sub>12</sub> est absent (Jacquet et al., 2005). Par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et par interférence d'ARN, l'équipe a démontré que l'effet induit par l'ADP sur l'internalisation des HDL par les hépatocytes est dû à l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> et non du récepteur P2Y<sub>1</sub> (Jacquet et al., 2005). Ainsi, le récepteur P2Y<sub>13</sub> établit un lien entre le récepteur de haute affinité, l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, et le site de liaison de basse affinité responsable de l'endocytose des HDL *via* la formation de vésicules à clathrine.

De façon intéressante, l'équipe a observé que le composé AR-C69931MX (appelé également Cangrelor), préalablement décrit comme inhibiteur de P2Y<sub>12</sub>, est également un agoniste partiel de P2Y<sub>13</sub> et est capable de stimuler l'internalisation des HDL par des hépatocytes en culture et *in situ* dans des expériences de perfusion de foie de souris au même titre que l'apoA-I (Jacquet et al., 2005). Cette caractéristique a fait de l'AR-C69931MX un composé de choix pour l'étude de l'implication physiologique de P2Y<sub>13</sub> dans le métabolisme des HDL et dans le transport retour du cholestérol qui correspond à la deuxième partie de mes travaux expérimentaux (cf. Chapitre III, Article 2).

#### **4-4-2-4) Cascade de signalisation en aval de P2Y<sub>13</sub>**

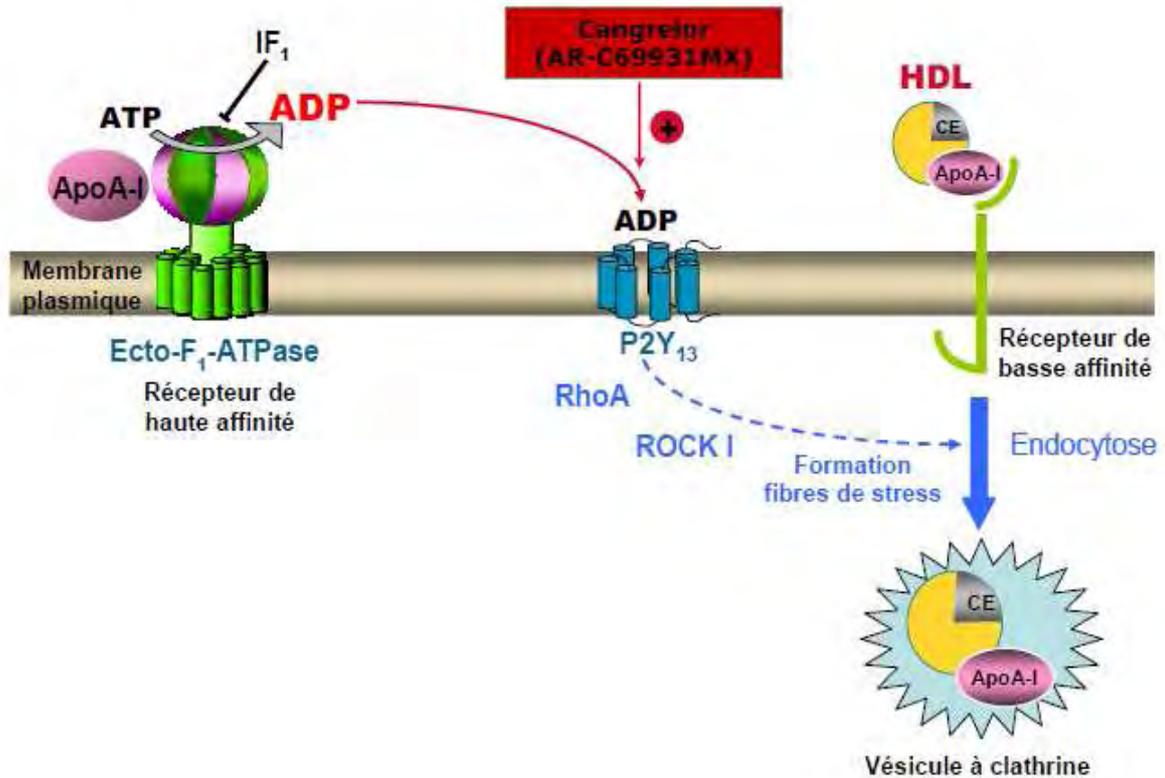
L'équipe du Pr. Boeynaems a été la première à identifier le récepteur P2Y<sub>13</sub> comme étant un RCPG. P2Y<sub>13</sub> est très proche phylogénétiquement de P2Y<sub>12</sub> et possède des propriétés fonctionnelles similaires telles que le couplage à Gi et la réactivité à l'ADP (Communi et al., 2001). P2Y<sub>13</sub> est principalement exprimé au niveau du cerveau, de la rate, de la moelle osseuse et du foie mais ces fonctions ainsi que les mécanismes de signalisation en aval ne sont pas encore bien déterminés.

Plusieurs récepteurs P2Y sont capables d'activer les petites GTPases Rho par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques. Le membre majeur de cette famille est RhoA. Par l'activation de ses effecteurs, les kinases dépendantes des Rho (ROCK), RhoA régule la formation de fibres de stress. Une telle signalisation a été décrite en aval des récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> et P2Y<sub>6</sub> (Sauzeau et al., 2000).

Récemment dans le laboratoire, Malaval *et al* ont démontré l'implication de la petite GTPase RhoA et de son effecteur ROCKI dans la signalisation en aval du récepteur P2Y<sub>13</sub> sur des hépatocytes humains. En effet, ces deux protéines sont activées lors de la stimulation de P2Y<sub>13</sub> par l'ADP ou l'AR-C69931MX mais également par l'apoA-I qui induit une activation indirecte de P2Y<sub>13</sub> en stimulant la production d'ADP par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. De plus, un

mutant constitutivement actif de RhoA (RhoAV14) stimule l'endocytose des HDL par les hépatocytes humains (HepG<sub>2</sub>), et cet effet stimulateur n'est pas cumulatif avec les effets de l'ADP. Les ROCK qui sont les principaux effecteurs des petites GTPases Rho, sont représentés par deux isoformes (ROCKI et ROCKII). Par la technique d'interférence d'ARN, il a été montré que seul ROCKI est impliqué dans la cascade de signalisation en aval de P2Y<sub>13</sub> et donc dans la voie d'endocytose des HDL. L'extinction de l'expression de ROCKI inhibe l'effet de l'ADP sur l'endocytose des HDL par les cellules HepG<sub>2</sub>. Cette voie de signalisation RhoA/ROCKI induit la réorganisation du cytosquelette d'acto-myosine en fibres de stress qui permettent l'endocytose des HDL. Une inhibition de la formation de ces fibres inhibe l'effet stimulateur de l'ADP ou l'AR-C69931MX sur l'endocytose des HDL par les cellules HepG<sub>2</sub> (Malaval et al., 2009).

Ainsi les différents travaux de l'équipe ont mis en évidence au niveau d'hépatocytes humains l'existence d'une nouvelle voie d'endocytose hépatique des HDL impliquant la participation de deux sites de liaison aux HDL d'affinité différente. La liaison de l'apoA-I sur le site de haute affinité, l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, active l'activité hydrolase de cette enzyme. L'ADP généré active le récepteur purinergique P2Y<sub>13</sub> ce qui va induire une cascade de signalisation impliquant la petite GTPase RhoA et son effecteur ROCKI permettant la réorganisation du cytosquelette d'acto-myosine nécessaire à l'endocytose des HDL par les sites de basse affinité *via* la formation de vésicules à clathrine (**Figure 11**).



**Figure 11: Voie Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> d'endocytose des HDL**

Au niveau d'hépatocytes humains, la liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase active son activité ATP hydrolase. L'ADP généré va activer le récepteur P2Y<sub>13</sub> qui va induire une cascade de signalisation permettant *in fine* l'endocytose de la particule HDL entière par le récepteur de basse affinité *via* la formation de vésicules à clathrine.

Cette voie d'endocytose hépatique des HDL est donc bien caractérisée au niveau cellulaire. L'implication physiologique de cette voie dans le métabolisme du cholestérol HDL et plus précisément dans le transport retour du cholestérol a fait l'objet de mes travaux de thèse.

#### **4-5) Elimination biliaire du cholestérol**

L'élimination biliaire du cholestérol soit sous forme libre soit après conversion en acides biliaires constitue la dernière étape du transport retour du cholestérol.

Au cours des années 90, plusieurs études ont démontré, à l'aide de marquages radioactifs, que le cholestérol provenant des HDL est le meilleur substrat pour la formation des acides biliaires, contrairement à celui provenant des autres lipoprotéines telles que les LDL (Botham and Bravo, 1995). Des études plus approfondies ont mis en évidence l'utilisation préférentielle du cholestérol transporté par les HDL<sub>2</sub> pour la synthèse des acides biliaires tandis que le cholestérol transporté par des HDL<sub>3</sub> participerait plus particulièrement au pool sécrété sous forme libre dans la bile (Botham and Bravo, 1995).

#### **4-5-1) Biosynthèse des acides biliaires**

La biosynthèse des acides biliaires constitue un processus catabolique par lequel le cholestérol (composé hydrophobe insoluble) est converti en molécules solubles d'acides biliaires qui seront facilement sécrétées. La conversion du cholestérol en acides biliaires confère des propriétés détergentes aux acides biliaires qui seront cruciales pour leur fonction physiologique dans l'absorption des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles dans l'intestin grêle. Chez l'homme, cette biosynthèse des acides biliaires qui a lieu exclusivement au niveau du foie représente environ 50% de l'élimination du cholestérol dans l'organisme (Alrefai and Gill, 2007).

Dans le foie, les produits formés à partir de la biosynthèse des acides biliaires sont appelés acides biliaires primaires. L'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique sont les acides biliaires primaires formés chez l'homme. Chez les rongeurs, des réactions d'hydroxylation alternative forment des acides biliaires de structure différente à partir de l'acide chénodésoxycholique, en particulier, les acides  $\alpha$ -et  $\beta$ -muricholique.

Pour la conversion du cholestérol en acides biliaires primaires (acide cholique et chénodésoxycholique) 3 étapes sont requises :

- l'initiation qui correspond à l'hydroxylation du noyau stérol pour former des dérivés 7alpha hydroxylés du cholestérol
- des modifications supplémentaires de la structure du noyau stérol
- l'oxydation de la chaîne latérale

Deux voies peuvent catalyser ces différentes réactions : la voie classique (ou neutre) et la voie alternative (ou acide). Ces deux voies se distinguent par l'ordre des réactions qui transforment le cholestérol en acides biliaires primaires et le site cellulaire où la première réaction a lieu (**Figure 12**).

La voie neutre débute par la réaction de 7alpha hydroxylation du noyau stérol par la cholestérol 7alpha hydroxylase : CYP7A1 au niveau du réticulum endoplasmique. Cette étape est considérée comme l'étape limitante de la synthèse des acides biliaires par cette voie dite neutre. En effet, les souris déficientes pour CYP7A1 présentent une forte incidence de létalité postnatale due à une défaillance du foie et une malabsorption des graisses et des vitamines (Ishibashi et al., 1996).

En comparaison, la voie alternative (ou acide) débute par la réaction d'hydroxylation de la chaîne latérale du cholestérol à la position C27 par la stérol 27-hydroxylase : CYP27A1 au niveau de la mitochondrie (Cali and Russell, 1991). Le produit de la réaction catalysé par CYP27A1 ne peut pas constituer un substrat pour CYP7A1 mais il pourra être hydroxylé par

CYP7B1 au niveau du réticulum endoplasmique pour former un intermédiaire 7 alpha-hydroxycholestérol. A partir de cette étape, les deux voies se regroupent.

Les intermédiaires 7alpha-hydroxy formés par CYP7A1 ou CYP7B1 vont subir l'action de la 3beta-hydroxy C27 steroid deshydrogenase : isomérase HSD3B7. Le produit de l'activité de HSD3B7 pourra ensuite emprunter 2 voies différentes. Dans le cas où il interagit avec la sterol 12 alpha hydroxylase (CYP8B1) il formera l'acide cholique. Par contre, l'acide chénodésoxycholique sera formé si le produit de HSD3B7 n'interagit pas avec la CYP8B1. Ainsi, l'activité de CYP8B1 détermine la proportion dans laquelle les acides biliaires primaires sont formés. La perte de cette enzyme chez la souris induit une absence totale d'acide cholique dans la composition biliaire et est associée à une augmentation de la synthèse d'acide muricholique (Li-Hawkins et al., 2002).

La voie acide produira préférentiellement l'acide chénodésoxycholique tandis que la voie neutre pourra conduire à la formation des deux acides biliaires primaires (Axelson and Sjoval, 1990).

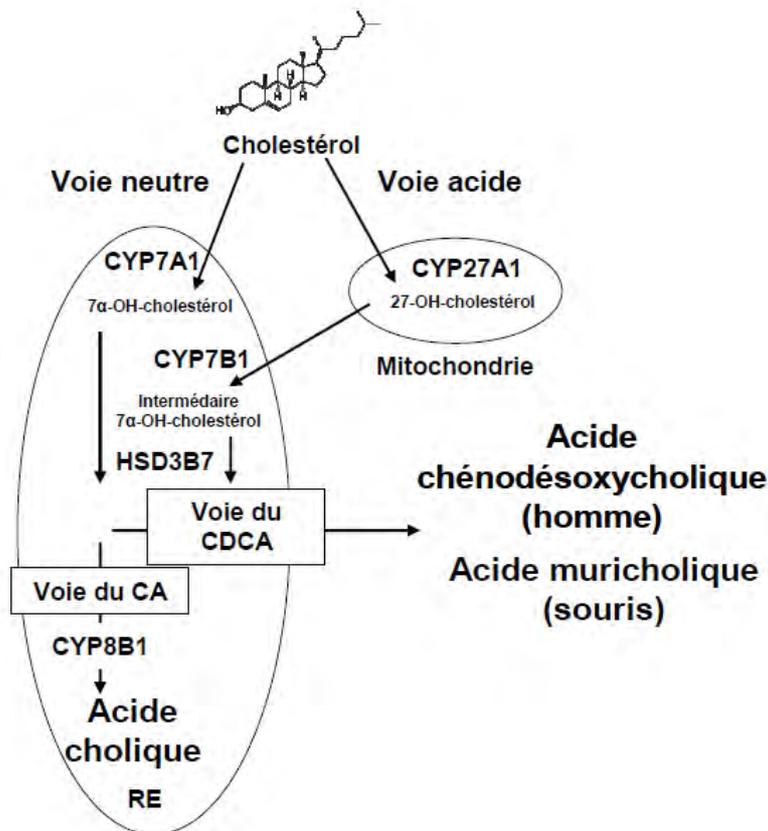


Figure 12: Voie de synthèse des acides biliaires

Avant leur sécrétion dans la lumière du canalicule biliaire, les acides biliaires primaires sont conjugués au niveau de leur chaîne latérale avec une molécule de taurine ou de

glycine. Cette réaction d'amidification de la fonction carboxylique terminale par ajout d'une taurine ou glycine est catalysée par la Bile Acid Coenzyme A : amino acid N-acyltransferase (BAT) au niveau du péroxysome (Falany et al., 1994). La conjugaison des acides biliaires augmente leur solubilité et les rend donc imperméables aux membranes cellulaires ce qui implique l'intervention de transporteurs transmembranaires pour leur sécrétion.

#### **4-5-2) Transport hépatobiliaire des acides biliaires**

Le transport des acides biliaires au travers de la membrane canaliculaire des hépatocytes se fait contre un gradient de concentration de facteur 100 à 1000; ainsi leur sécrétion dans le canalicule biliaire nécessite un transport actif. L'excrétion canaliculaire des acides biliaires se fait *via* des transporteurs dont la fonction est dépendante de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

BSEP (Bile Salt Export Pump) ou ABCB11 appartient à la famille des ABC transporteurs et constitue le principal transporteur des acides biliaires au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Comme les autres ABC transporteurs, BSEP est formé de 12 domaines transmembranaires et de 2 boucles intracellulaires de liaison de nucléotides nécessaires à la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. BSEP est responsable du transport d'acides biliaires conjugués avec une haute affinité dans l'ordre : acide taurochénodéoxycholique > acide taurocholique > acide tauroursodéoxycholique > acide glycocholique.

Chez l'homme, des mutations de BSEP sont associées à une faible sécrétion d'acides biliaires (< à 1% de la normale) et de sévères cholestases. Chez ces patients, l'accumulation d'acides biliaires dans le foie cause une toxicité sévère qui peut conduire très rapidement à une cirrhose et une déficience hépatique (Suchy and Ananthanarayanan, 2006). Les souris invalidées pour BSEP ont un phénotype moins grave. Elles ont une sécrétion d'acides biliaires diminuée de 30% par rapport aux souris sauvages et ces animaux ne développent seulement une cholestase modérée (Wang et al., 2001). Cette différence de phénotype entre l'homme et la souris est due au fait que les souris invalidées pour BSEP utilisent une voie alternative pour le transport des acides biliaires au travers de la membrane canaliculaire des hépatocytes. En effet, les souris invalidées pour BSEP présentent une augmentation d'expression de la protéine MDR1 (Multi Drug Resistance 1 ou ACB1) au niveau canaliculaire. Cette protéine pourrait donc être responsable du transport des acides biliaires en absence de BSEP. Il a été montré que des vésicules de membranes canaliculaires issues des souris invalidées pour BSEP présentent une augmentation d'expression de MDR1 et sont capables *in vitro* de transporter

des acides biliaires conjugués (Lam et al., 2005). Cependant, MDR1 est beaucoup moins efficace que BSEP pour assurer le transfert des acides biliaires au travers de la membrane canaliculaire.

#### **4-5-3) Transport hépatobiliaire du cholestérol**

La sitostérolémie est une maladie rare autosomale récessive caractérisée par une accumulation de stérols d'origine végétale et animale dans l'organisme. Cette accumulation des stérols dans le sang est la résultante d'une augmentation de leur absorption intestinale et d'une diminution de leur sécrétion dans la bile. Cette maladie est causée par des mutations au niveau des gènes codant pour les protéines ABCG5 et ABCG8 (Berge et al., 2000) (Lee et al., 2001).

Les deux unités ABCG5 et ABCG8 sont principalement localisées sur la membrane apicale des cellules intestinales et sur la membrane canaliculaire des hépatocytes. Ces protéines formées de 6 domaines transmembranaires, s'hétérodimérisent en un complexe fonctionnel pour permettre l'excrétion à la fois des stérols végétaux et du cholestérol vers la lumière intestinale et la bile.

Le rôle d'ABCG5/G8 dans le transport du cholestérol dans la bile a été confirmé par des modèles de souris transgéniques. En effet, l'inactivation d'ABCG5/G8 chez la souris entraîne une diminution significative d'environ 75% de la concentration en cholestérol dans la bile qui se traduit par une diminution de l'élimination des stérols neutres dans les fèces (Yu et al., 2002a) alors qu'une surexpression de ces deux transporteurs entraîne une augmentation de la concentration de cholestérol biliaire (Yu et al., 2002b).

Wittenburg et Carey proposent que l'hétérodimère ABCG5/G8 au niveau canaliculaire transloque le cholestérol de la membrane interne vers la membrane externe, facilitant ainsi la solubilisation du cholestérol par les acides biliaires (Wittenburg and Carey, 2002). Cette sécrétion de cholestérol *via* ABCG5/G8 dépend de la présence d'acides biliaires (Vrins et al., 2007) et de phospholipides dans la bile (Langheim et al., 2005).

Cependant il est important de noter que malgré la double inactivation d'ABCG5/G8 on peut observer une sécrétion résiduelle de cholestérol dans la bile de ces souris. Ceci suggère l'existence d'un processus indépendant d'ABCG5/G8 pour la sécrétion de cholestérol dans la bile, ce qui est confirmé par les travaux de Plösch *et al* (Plosch et al., 2006).

Ce transport du cholestérol dans la bile indépendant d'ABCG5/G8 pourrait être médié par SR-B1. Il a été montré que SR-B1 est également exprimé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes et que sa surexpression entraîne une augmentation des

sécrétions biliaires de cholestérol qui est maintenue chez les souris invalidées pour ABCG5/G8 (Wiersma et al., 2009).

NPC1L1 semble jouer également un rôle dans la sécrétion du cholestérol dans la bile. En effet, l'expression hépatique de NPC1L1 chez la souris, qui est physiologiquement absent au niveau hépatique chez cette espèce, entraîne une diminution de 10 à 20 fois de la concentration de cholestérol biliaire qui est associée à une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol. Le traitement de ces souris avec l'Ezetimibe restaure un phénotype de souris sauvages. Il est proposé par les auteurs que NPC1L1 pourrait être responsable du transport du cholestérol de la bile vers l'hépatocyte au niveau de la membrane canaliculaire (Temel et al., 2007). De nombreux paramètres confortent cette hypothèse ; toutefois des études complémentaires sont nécessaires pour la confirmer

#### **4-5-4) Cycle entérohépatique des acides biliaires**

La cosécrétion des acides biliaires primaires, du cholestérol et des phospholipides au travers de la membrane canaliculaire conduit à la formation de micelles mixtes dans la bile. La bile stockée dans la vésicule biliaire sera ensuite déversée dans la lumière du duodénum au moment d'un repas par contraction de la vésicule biliaire induite par la cholécystokinine.

Dans la lumière de l'intestin grêle, les acides biliaires jouent le rôle de détergents pour solubiliser et faciliter l'absorption des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles. Due à leur faible pKa, l'absorption passive des acides biliaires conjugués est faible et leur concentration intraluminaire reste donc élevée tout au long de l'intestin grêle. 90 à 95% des acides biliaires sont activement réabsorbés par l'action de transporteurs au niveau de l'iléum terminal.

Le transport des acides biliaires au travers des entérocytes est divisé en 3 étapes (**Figure 13**):

- la captation des acides biliaires au niveau de la membrane apicale par un mécanisme dépendant du Na<sup>+</sup> par le transporteur ASBT (Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter). ASBT transporte avec une plus grande affinité les acides biliaires conjugués. Les souris invalidées pour ASBT présentent une malabsorption intestinale des acides biliaires et une élimination de la circulation entérohépatique des acides biliaires (Dawson et al., 2003).

- Le transport intracellulaire des acides biliaires dans l'entérocyte réalisé par la protéine cytosolique IBABP (Intestinal Bile Acid-Binding Protein)

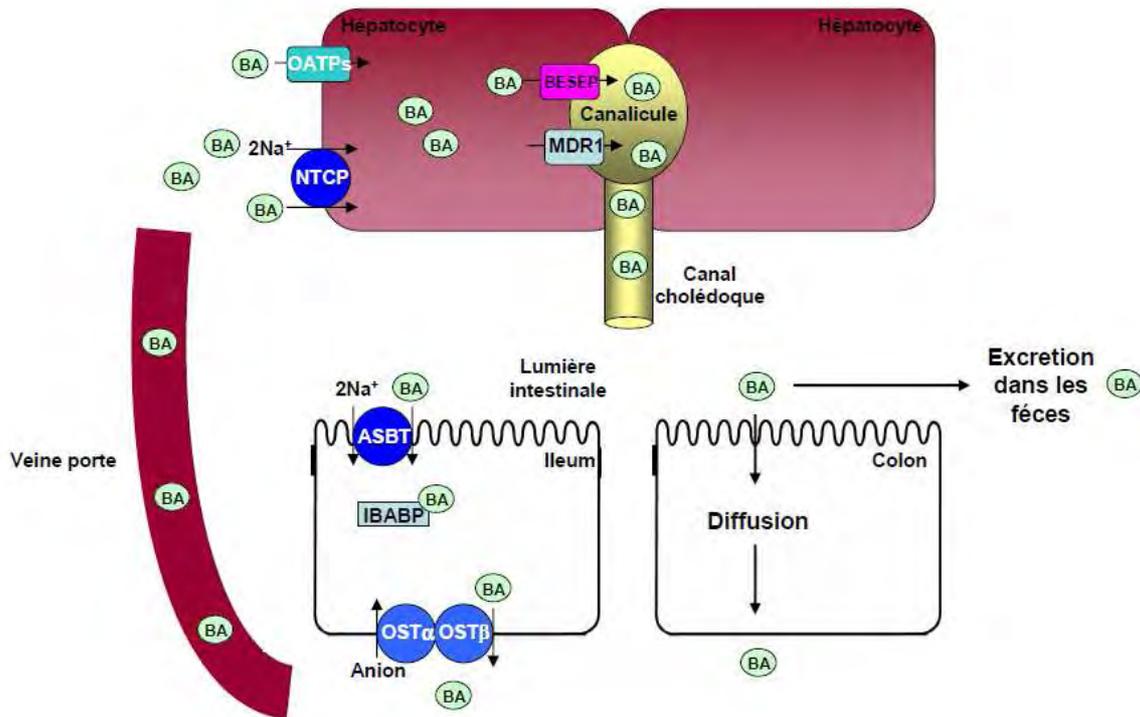
- L'efflux des acides biliaires au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes est réalisé par le transporteur hétérodimérique Ost $\alpha$ -Ost $\beta$  (Dawson et al., 2005). Le transport

effectué par Ost $\alpha$ -Ost $\beta$  est Na<sup>+</sup>-indépendant et inhibé par des anions organiques (Ballatori et al., 2005).

Les acides biliaires qui ne sont pas réabsorbés au niveau de l'iléum, vont entrer dans le colon où ils pourront être convertis en acides biliaires secondaires par des réactions de déconjugaison et d'oxydation. Ces acides biliaires secondaires seront soit absorbés passivement pour rejoindre le pool d'acides biliaires, soit éliminés dans les fèces (Ridlon et al., 2006). Les acides biliaires primaires et secondaires qui sont absorbés seront transportés vers le foie par la veine porte.

La captation hépatique des acides biliaires s'effectue au niveau de la membrane sinusoidale contre un gradient électrochimique par des mécanismes dépendant et indépendant du Na<sup>+</sup>. La captation dépendante du Na<sup>+</sup> est réalisée par le transporteur NCTP (Na<sup>+</sup>/Taurocholate cotransporting polypeptide) alors que ce sont des membres de la famille des OATP (Organic Anion Transporting Polypeptides) tels que Oatp1a2 et Oatp1b1 qui sont responsables du transport indépendant du Na<sup>+</sup> (**Figure 13**). NCTP transporte préférentiellement les acides biliaires conjugués, et est responsable de moins de la moitié du transport des acides biliaires non conjugués qui seront transportés par les OATP (Alrefai and Gill, 2007).

Après leur captation hépatique, les acides biliaires sont reconjugués si nécessaire et sont transportés au niveau de la membrane caniculaire pour être de nouveau sécrétés dans la bile.



**Figure 13: Circulation entérohépatique des acides biliaires** (d'après Alrefai *et al*, 2007)

La circulation entérohépatique des acides biliaires fait intervenir différents transporteurs. Au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de l'ileum, ASBT est responsable de la captation des acides biliaires (BA) qui seront transportés dans l'entérocyte par IBABP jusqu'à la membrane basolatérale où le transporteur hétérodimérique Ost $\alpha$ -Ost $\beta$  permettra l'efflux des acides biliaires. Les acides biliaires non absorbés au niveau de l'ileum pourront diffuser passivement au niveau du colon ou être éliminés dans les fèces après conversion en acides biliaires secondaires. Par la veine porte, les acides biliaires absorbés rejoindront le foie où ils seront captés par NTCP et les OATPs. Ces acides biliaires pourront être à nouveau sécrétés dans la bile *via* BSEP et MDR1 au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes.

#### **4-6) Régulation du transport retour du cholestérol par les récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires forment une grande famille de facteurs de transcription activés par la liaison d'un ligand et permettent la régulation de l'expression de différents gènes. La régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans le transport retour du cholestérol fait intervenir de nombreux récepteurs nucléaires dont les principaux sont LXR (Liver X Receptor) et FXR (Farnesoid X Receptor).

##### **4-6-1) Les LXRs**

Les LXRs sont des récepteurs nucléaires qui sont activés par les oxystérols endogènes qui sont des dérivés oxydés du cholestérol. Il existe 2 isoformes de LXR : LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  qui possèdent une forte homologie dans la séquence d'acides aminés formant le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de fixation du ligand. Les 2 isoformes, LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ ,

régulent l'expression de gènes cibles en liant des séquences d'ADN spécifiques appelées LXREs (LXR responsive elements) sous forme d'hétérodimère avec une isoforme du RXR (Retinoïd X Receptor). LXR $\alpha$  est fortement exprimé dans le foie et en plus faible quantité dans l'intestin grêle, les macrophages, le tissu adipeux, les poumons, les glandes adrénorégénératives et les reins tandis que l'expression de LXR $\beta$  est ubiquitaire (Repa and Mangelsdorf, 2000). Les LXRs jouent le rôle de senseur de cholestérol. En effet, lorsque les oxystérols s'accumulent dans la cellule (résultat d'une augmentation de la concentration intracellulaire en cholestérol) les LXRs induisent la transcription de différents gènes afin de protéger la cellule d'une surcharge en cholestérol.

Ainsi, les LXRs régulent le transport retour du cholestérol principalement en favorisant l'efflux du cholestérol des tissus périphériques et l'élimination du cholestérol *via* les voies biliaires. En effet, les LXRs régulent notamment l'expression de différents gènes qui favorisent l'efflux du cholestérol vers les HDL tels que ABCA1 (Repa et al., 2000b) et ABCG1 (Sabol et al., 2005). De plus, les LXRs régulent la synthèse des acides biliaires ainsi que leur transport. Chez les rongeurs, en présence d'un excès de cholestérol, LXR $\alpha$  stimule la transcription de CYP7A1 favorisant ainsi la synthèse des acides biliaires et l'élimination du cholestérol en excès (Peet et al., 1998). Seules les souris invalidées pour LXR $\alpha$  et non LXR $\beta$  sous régime enrichi en cholestérol accumulent une grande quantité de cholestérol ester dans le foie (Alberti et al., 2001). Ceci résulte de l'incapacité des souris LXR $\alpha^{-/-}$  à induire l'expression de CYP7A1. Cependant, chez l'homme l'élément de réponse spécifique au LXR n'existe pas dans le gène de CYP7A1 et les souris transgéniques exprimant le gène humain ne présentent pas une augmentation des acides biliaires suite à un excès de cholestérol alimentaire contrairement à des souris sauvages (Agellon et al., 2002). Cela peut donc expliquer en partie la différence de sensibilité à l'hypercholestérolémie induite par des régimes riches en cholestérol entre les rongeurs et l'homme. LXR $\alpha$  régule également l'expression hépatique de protéines de transport de cholestérol au niveau de la membrane canaliculaire: ABCG5 et G8. En effet, l'expression hépatique d'ABCG5 et G8 est augmentée en réponse à une activation du LXR par un agoniste. Cette augmentation de ces 2 hémis-transporteurs entraîne une augmentation de l'élimination du cholestérol dans la bile et une augmentation de l'excrétion de cholestérol dans les fèces (Yu et al., 2003). De plus, des études récentes ont démontré qu'une activation pharmacologique du LXR augmente *in vivo* le RCT à partir de macrophages chargés en cholestérol par une augmentation de l'expression d'ABCA1, ABCG1, ABCG5/8 dans le foie et l'intestin (Naik et al., 2006).

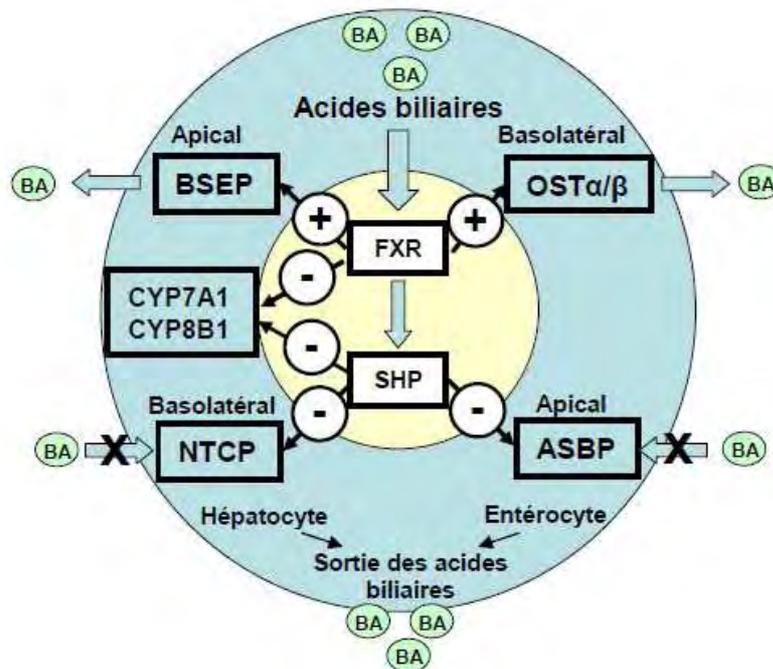
**4-6-2) FXR**

Farnésioïd X récepteur (FXR) est un senseur des acides biliaires qui joue un rôle central dans le maintien de leur homéostasie. Au cours de leur cycle entérohépatique, les acides biliaires exercent un rétrocontrôle négatif sur leur biosynthèse et leur transport en interagissant avec FXR. FXR est exprimé dans le foie, les reins et l'intestin et se fixe après activation sur des séquences d'ADN spécifiques appelées FXREs (FXR responsive element) soit sous forme de monomère ou d'hétérodimère avec le RXR. La forme hétérodimérisée est la plus commune et est généralement associée à une activation de la transcription tandis que la forme monomérique est plutôt associée à une répression de gènes. L'activation de FXR est consécutive à la fixation des acides biliaires sur le domaine de liaison du ligand. Différents acides biliaires sont capables d'activer FXR ; toutefois chez la souris FXR est plus affiné pour l'acide cholique. Chez l'homme, c'est l'acide chénodésoxycholique qui constitue un meilleur activateur (Kuipers et al., 2007). L'activation de FXR est corrélée à une répression indirecte de l'expression hépatique de CYP7A1, l'enzyme limitante de la voie neutre de synthèse des acides biliaires et de CYP8B1 qui module la composition biliaire en assurant la production d'acide cholique.

La répression de l'expression de CYP7A1 et CYP8B1 par FXR s'effectue *via* une régulation directe de la transcription de SHP (Small Heterodimer Partner). SHP appartient également à la famille des récepteurs nucléaires mais celui-ci ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et n'a pas encore de ligand identifié. Il est capable d'interagir avec d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires et d'inhiber ainsi leur activité transcriptionnelle. Ainsi, il va inhiber les facteurs de transcriptions LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1) (Goodwin et al., 2000) et FTF (Fetoprotein Transcription Factor) (del Castillo-Olivares and Gil, 2001) nécessaires à la transcription de CYP7A1 et CYP8B1. Cependant, chez la souris une invalidation de SHP induit seulement une augmentation des taux hépatiques de CYP7A1 et CYP8B1 d'un facteur 2. Ceci s'explique par l'existence d'une voie de régulation de la transcription de CYP7A1 et CYP8B1 indépendante de SHP (Kerr et al., 2002). En effet, FXR induit l'expression intestinale de FGF15 (Fibroblast Growth Factor 15) qui va activer le récepteur FGFR4 ((Fibroblast Growth Factor Receptor 4) par un mécanisme autocrine (Inagaki et al., 2005). L'activation de FGFR4 au niveau du foie va induire la répression de CYP7A1; ainsi les souris déficientes pour FGF15 et FGFR4 présentent une augmentation de l'expression de CYP7A1 et de la synthèse des acides biliaires (Inagaki et al., 2005).

FXR joue également un rôle important dans la régulation du transport hépatique ou intestinal des acides biliaries. En effet, FXR régule positivement l'expression du transporteur BSEP, qui est responsable du transport des acides biliaries de l'hépatocyte vers la lumière canaliculaire, en se liant directement sur la séquence d'ADN FXRE (Ananthanarayanan et al., 2001). De la même façon, FXR active la transcription des gènes codant pour les sous-unités  $Ost\alpha$  et  $\beta$  du transporteur des acides biliaries au niveau intestinal (Landrier et al., 2006). Par contre, l'expression de NTCP responsable de la capture hépatocytaire des acides biliaries et ASBT responsable de la captation iléale des acides biliaries au niveau des entérocytes, est réprimée par la voie dépendante de SHP. Pour réprimer l'expression de ces deux gènes, SHP interagit avec RXR et RAR qui régulent respectivement l'expression de ces deux gènes (Denson et al., 2001) (Neimark et al., 2004).

Ainsi, FXR protège le foie d'une cytotoxicité induite par un excès d'acides biliaries en réprimant la synthèse hépatique des acides biliaries et en stimulant leur excrétion biliaire et intestinale (**Figure14**).



**Figure 14:** Les acides biliaries régulent leur synthèse et l'expression de leurs transporteurs hépatiques et intestinaux *via* l'activation du FXR (d'après Alrefai et al, 2007)

L'activité du FXR n'est pas restreinte à l'homéostasie des acides biliaries, FXR est aussi impliqué dans le métabolisme des HDL. Des études ont démontré qu'un régime enrichi en acide cholique diminue l'expression de SR-B1 au niveau hépatique (Malerod et al., 2005).

De plus, FXR active l'expression de la PLTP (Urizar et al., 2000) et réprime l'expression de la lipase hépatique (Sirvent et al., 2004) et de l'apoA-I (Claudel et al., 2002).

## **5) L'excrétion transintestinale du cholestérol : le TICE**

### **5-1) Mise en évidence d'un nouveau rôle de l'intestin dans le RCT**

Le transport retour du cholestérol est décrit comme étant la principale voie d'élimination du cholestérol dans l'organisme qui permet l'efflux de cholestérol des tissus périphériques *via* les voies biliaires vers la lumière intestinale conduisant à l'élimination dans les fèces.

Toutefois différentes observations laissent penser que le concept d'une voie unique d'élimination du cholestérol par les voies biliaires doit être reconsidéré. En effet, chez les souris invalidées à la fois pour les transporteurs ABCG5 et ABCG8, qui présentent une forte diminution des sécrétions biliaires en cholestérol, on n'observe seulement une diminution de 36% des pertes fécales en cholestérol en comparaison avec des souris sauvages (Yu et al., 2002a). Un phénomène similaire est observable chez des souris invalidées pour le transporteur de phospholipides dans la bile : ABCB4 (ATP Binding Cassette B4). En effet, ces souris présentent une forte diminution des sécrétions biliaires en phospholipides et cholestérol et de façon surprenante la quantité de cholestérol éliminée dans les fèces est similaire à des souris sauvages (Kruit et al., 2005). Chez ces souris, il a été montré que du cholestérol libre radiomarqué injecté par voie intraveineuse pouvait être retrouvé dans les fèces sous forme de stérol neutre et ceci en l'absence de sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides (Kruit et al., 2005). De plus, le groupe du Pr. Groen a montré par des expériences de perfusions intestinales que du cholestérol radiomarqué injecté en intraveineux pouvait être retrouvé au niveau de la lumière intestinale (van der Velde et al., 2007). Ces résultats confirment donc que la voie biliaire n'est pas la seule voie d'élimination du cholestérol dans les fèces et mettent en évidence l'existence d'une sécrétion de cholestérol du sang vers la lumière intestinale appelé TICE (Transintestinal Cholesterol Excretion). Cette sécrétion est observée le long de l'intestin grêle, avec une plus grande efficacité au niveau de la partie proximale, et est dépendante de la présence d'accepteur de cholestérol (acides biliaires ou phospholipides) au niveau de la lumière intestinale (van der Velde et al., 2007). Il semblerait que cette voie élimine 2 fois plus de cholestérol dans les fèces que la voie des sécrétions biliaires chez la souris (van der Velde et al., 2007).

Chez l'homme, ce processus d'excrétion du cholestérol transintestinal est également présent. En effet, Simmonds *et al* ont observé par des perfusions intestinales chez l'homme une sécrétion de cholestérol au niveau de l'intestin grêle (Simmonds et al., 1967). De plus, chez des patients ayant une obstruction des voies biliaires, il a été observé la présence de stérols d'origine non alimentaire dans les fèces (Cheng and Stanley, 1959).

Ainsi, ces différentes études chez l'animal et l'homme démontrent l'existence d'une voie d'élimination du cholestérol dans les fèces indépendante de la voie classique d'élimination *via* les sécrétions biliaires. Des travaux récents ont même démontré que des souris dont les sécrétions biliaires en cholestérol dans l'intestin sont absentes (diversion du canalicule biliaire) présentent un taux de RCT similaire à des souris non opérées (Temel et al.). Ainsi, chez la souris, cette voie du TICE semble pouvoir compenser l'absence d'élimination du cholestérol *via* les voies biliaires pour maintenir une perte fécale de cholestérol normale.

### **5-2) Quels sont les transporteurs impliqués dans le TICE ?**

Le TICE est un processus spécifique et doit donc faire intervenir la participation de protéines de transport à la fois au niveau de la membrane basolatérale et apicale de l'entérocyte. L'implication de différents transporteurs a été étudiée.

SR-B1 exprimé au niveau des membranes apicale et basolatérale des entérocytes (Cai et al., 2004) et connu pour être un transporteur de cholestérol issu de différentes lipoprotéines paraît être un bon candidat. Des souris sous régime enrichi en cholestérol (0.25%) et en acides gras (16%) ou sous régime enrichi en acides gras présentent une augmentation du TICE qui est corrélée avec une augmentation de l'expression de SR-B1 au niveau de l'intestin. Toutefois, de façon surprenante, chez les souris invalidées pour SR-B1 il a été observé une augmentation du TICE d'un facteur 2 par des expériences de perfusions intestinales (van der Velde et al., 2008). Ces deux résultats contradictoires sur la contribution de SR-B1 dans le TICE ne permettent pas de conclure sur le rôle de SR-B1 dans le transport transintestinal du cholestérol. Ils mettent toutefois en évidence qu'une partie de la sécrétion du cholestérol par le TICE est affectée par la composition en graisse dans l'alimentation.

Les transporteurs ABCG5/G8 semblent être de bons candidats pour participer au TICE puisqu'ils induisent la sécrétion de cholestérol de l'entérocyte vers la lumière intestinal. Toutefois leur implication n'est pas encore bien déterminée. En effet, Van der Veen *et al* ont montré que le flux du TICE est diminué chez les souris invalidées pour ABCG5 ce qui induit une diminution de la quantité totale de cholestérol excrété dans les fèces (van der Veen et al.,

2009). De plus, les souris surexprimant les formes humaines d'ABCG5 et ABCG8 présentent une forte augmentation de la quantité de stérols neutres dans les fèces (Yu et al., 2002b). Cependant, l'inactivation de ABCB4, le transporteur hépatique responsable de la sécrétion de phospholipides dans la bile, inhibe l'augmentation de l'excrétion des stérols neutres dans les fèces des souris surexprimant ABCG5/G8 humains. Ceci suggère donc que l'augmentation des excréctions de cholestérol dans les fèces suite à la surexpression d'ABCG5/G8 est due principalement à une augmentation des sécrétions biliaires de cholestérol et non à une augmentation du flux du TICE (Langheim et al., 2005).

Le transporteur NPC1L1 impliqué dans l'absorption intestinale de cholestérol ne joue également pas de rôle dans le TICE. En effet, un traitement avec l'Ezetimibe, un inhibiteur de NPC1L1, augmente fortement l'excrétion de stérols neutres dans les fèces sans avoir d'effet sur le flux du TICE (Vrins et al., 2009).

Ainsi, à ce jour, de nombreuses autres investigations sont nécessaires pour déterminer les transporteurs impliqués dans cette nouvelle voie transintestinale d'excrétion du cholestérol. D'autres investigations sont également en cours afin de déterminer quel type de lipoprotéine est impliqué dans le TICE.

### **5-3) Mécanismes régulant le TICE**

Le TICE peut être régulé par différents récepteurs nucléaires tels que LXR et le récepteur PPAR $\delta$ , mais également par le contenu en graisse dans l'alimentation et la présence d'accepteur du cholestérol dans la lumière intestinale.

En effet, des régimes enrichis en graisses (16% ou 24%) stimulent le TICE chez des souris FVB alors qu'un régime enrichi en cholestérol n'a aucun effet (van der Velde et al., 2008). De plus, il a été montré que la présence dans la lumière intestinale d'accepteurs de cholestérol tels que les acides biliaires et les phospholipides est essentielle pour la sécrétion du cholestérol par les entérocytes (van der Velde et al., 2007). La quantité de cholestérol excrété *via* le TICE est insensible aux types d'acides biliaires ou leur concentration en présence de phospholipides. Les phospholipides semblent être de meilleurs modulateurs du TICE ; en effet, une diminution de la concentration en phospholipides d'un facteur 2 dans la lumière intestinale, induit une diminution de 50% du TICE (van der Velde et al., 2008). Cet effet stimulateur des phospholipides sur le TICE pourrait expliquer l'augmentation de l'excrétion des stérols dans les fèces observée chez des sujets dont l'alimentation est supplémentée en phospholipides (Greten et al., 1980).

L'implication du récepteur nucléaire LXR dans la régulation du TICE a été démontrée par Kruit *et al* en comparant les effets d'un agoniste synthétique du LXR, le GW3965, chez des souris sauvages et chez les souris invalidées pour ABCB4 qui sont caractérisées par de très faibles sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides. L'activation du LXR augmente la quantité de cholestérol éliminé dans les fèces de façon similaire entre les souris ABCB4<sup>-/-</sup> et les souris sauvages bien que les sécrétions biliaires en cholestérol soit très faibles chez les souris ABCB4<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages. Bien que sous activation du LXR, l'absorption du cholestérol est réduite de façon plus importante chez les souris ABCB4<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages, il a pu être calculé qu'au moins 57% du cholestérol excrété dans les fèces proviennent de la sécrétion intestinale du cholestérol chez les souris ABCB4<sup>-/-</sup>. De plus, l'activation du LXR stimule l'excrétion dans les fèces de cholestérol radiomarqué d'origine plasmatique chez les souris ABCB4<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de l'excrétion du cholestérol dans les fèces induite par l'activation du LXR est en grande partie due à une stimulation du TICE et est indépendante des sécrétions biliaires en cholestérol (Kruit et al., 2005).

Vrins *et al* ont récemment démontré que le récepteur PPAR $\delta$  était également impliqué dans la régulation du TICE. En effet, l'augmentation de l'excrétion des stérols neutres dans les fèces observée chez les souris FVB suite à l'activation de PPAR $\delta$  par le GW610742 est due en partie à une stimulation du TICE (Vrins et al., 2009). Cet effet est en corrélation avec l'effet stimulateur d'un régime enrichi en graisses sur le TICE, les acides gras étant des agonistes de PPAR $\delta$  (van der Velde et al., 2008). L'augmentation de l'excrétion des stérols neutres dans les fèces sous activation de PPAR $\delta$  est également due à une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol corrélée avec une diminution de l'expression intestinale de NPC1L1 (van der Veen et al., 2005). Il a été également montré que l'activation de PPAR $\delta$  induit une augmentation de l'expression intestinale de différents gènes impliqués dans le transport vésiculaire intracellulaire du cholestérol tels que Rab9 et Limp-II (Vrins et al., 2009). L'implication de ces protéines dans le TICE n'a pas été à ce jour encore démontrée.



# **CHAPITRE II**

## **ATHEROSCLEROSE: APPROCHES THERAPEUTIQUES CIBLANT LES HDL**



L'athérosclérose est une pathologie complexe de la paroi vasculaire qui affecte les artères de gros et moyen calibre. Elle a pour conséquences principales l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux. Approximativement, 76% des thromboses coronariennes fatales sont dues à la rupture d'une plaque d'athérome. Pendant de nombreuses années, l'athérosclérose était la première cause de mortalité dans les pays industrialisés; depuis plus récemment elle représente la deuxième cause de mortalité après le cancer. De multiples facteurs contribuent au développement de l'athérosclérose et les dyslipidémies sont considérées comme la principale cause des maladies cardiovasculaires. En particulier, la disproportion entre les lipoprotéines athéroprotectives et athérogènes dans le plasma est l'une des plus importantes causes pour le développement de l'athérosclérose. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation négative entre le taux de HDL plasmatiques et l'incidence de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires associées (Gordon et al., 1977).

Au cours de ce chapitre, le développement de l'athérosclérose ainsi que les différents rôles athéroprotecteurs des HDL seront développés dans la première partie. La deuxième partie sera consacrée à la description des différentes approches thérapeutiques de l'athérosclérose ciblant les HDL existantes et des thérapies envisagées dans l'avenir.

## **1) Athérosclérose et HDL**

### **1-1) Développement de l'athérosclérose**

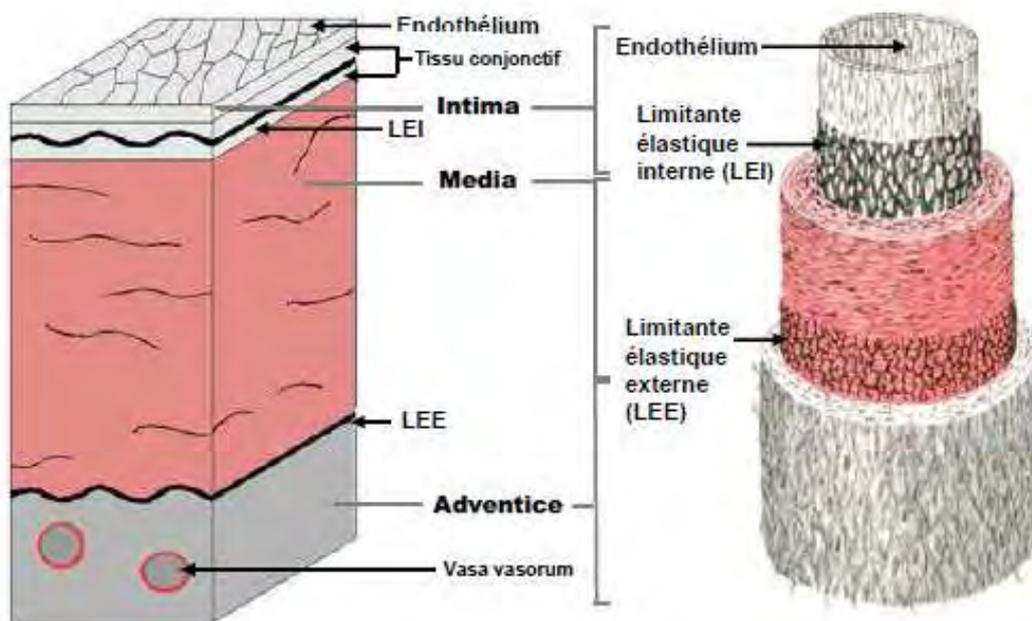
Le système vasculaire est complexe, compartimenté et hiérarchisé depuis la sortie du cœur à l'orifice aortique jusqu'au retour veineux. Les différents compartiments : macrocirculation artérielle, microcirculation et macrocirculation veineuse ont de nombreuses caractéristiques structurales et fonctionnelles communes. Comme tous les vaisseaux de la macrocirculation, les artères sont organisées en trois tuniques concentriques avec de l'intérieur vers l'extérieur (**Figure 15**):

- l'intima ou tunique interne composée d'une monocouche continue de cellules endothéliales aplaties qui forment un revêtement pavimenteux directement en contact avec le flux sanguin. Les cellules endothéliales reposent sur leur membrane basale mince et plus en profondeur sur la couche sous-endothéliale constituée de macromolécules de la matrice extracellulaire. Au cours du développement de l'athérosclérose, la couche sous-endothéliale s'épaissit suite à l'accumulation de lipoprotéines, de cellules musculaires lisses (CMLs), de monocytes et de macrophages circulants.

- la média ou tunique moyenne, séparée de l'intima par la lame élastique interne, est composée de CMLs organisées de façon concentrique à la lumière du vaisseau

- et l'adventice ou tunique externe, séparée de la média par la lame élastique externe, est formée d'un tissu conjonctif lâche riche en collagène, en fibres élastiques et en fibroblastes.

L'irrigation des cellules formant les différentes tuniques est assurée par la *vasa vasorum* qui constitue un réseau vasculaire de petite taille qui pénètre dans les parois des vaisseaux et se ramifie abondamment. Ce réseau capillaire va apporter des nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau ainsi qu'un certain nombre de médiateurs et d'hormones.



**Figure 15: Structure de la paroi artérielle normale**

Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation. Leur paroi est constituée de trois tuniques, qui de l'intérieur vers l'extérieur sont: l'intima, la media et l'adventice.

L'athérosclérose est une pathologie immunoinflammatoire chronique et fibroproliférative des moyennes et grosses artères d'origine multifactorielle. De nombreux éléments sont considérés comme des facteurs de risque qui peuvent être divisés en 2 groupes:

- les éléments modifiables: hémodynamique, hypertension, diabète, hyperlipidémie, la sédentarité, le tabagisme, les infections et les facteurs émotionnels (stress, dépression..).

- les éléments non modifiables: facteurs de susceptibilité génétique (sexe masculin, susceptibilité génétique aux éléments acquis) et vieillissement.

Parmi les différents facteurs de risque, l'hyperlipidémie est probablement le seul à être suffisant pour induire le développement de l'athérosclérose en absence des autres facteurs. Les autres facteurs accélèrent le développement de la pathologie induite par les lipoprotéines athérogènes: les LDL (Falk, 2006).

L'instauration et l'évolution de la lésion athéromateuse comprennent différentes étapes **(Figure 16)**:

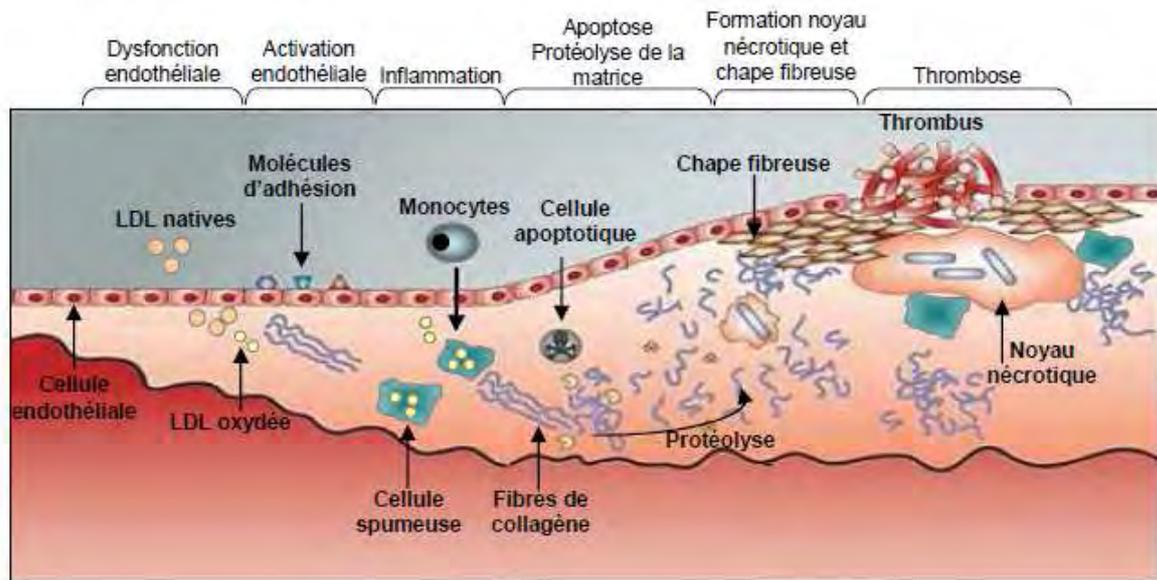
- l'initiation caractérisée par la dysfonction de l'endothélium qui induit une augmentation de la perméabilité de l'endothélium permettant l'infiltration des LDL qui seront oxydées dans l'espace sous-endothélial. Les LDL oxydées conduiront à l'activation de l'endothélium et des cellules du système immunitaire.

- le développement de la strie lipidique caractérisée par une accumulation de macrophages chargés en cholestérol (cellules spumeuses) et de lymphocytes T (LT) dans l'espace sous-endothélial.

- le développement de la chape fibreuse qui est caractérisée par la prolifération et la migration des CMLs de la média vers l'intima qui permet de protéger le noyau nécrotique de la lésion.

- l'instabilité de la plaque qui est déterminée par le risque de rupture de la chape fibreuse pouvant conduire à la formation d'une thrombose intra vasculaire.

Ces différentes étapes font intervenir différents acteurs cellulaires tels que les cellules endothéliales, les macrophages, les LT, les CMLs, les plaquettes...



**Figure 16: Développement de l'athérosclérose**

La dysfonction endothéliale induit l'infiltration des LDL qui seront oxydées dans l'espace sous-endothélial. Les LDL oxydées vont induire l'activation de l'endothélium qui va exprimer des molécules d'adhésion qui vont permettre l'infiltration des cellules du système immunitaire dans l'espace sous-endothélial. Les macrophages phagocytent les LDL oxydées, deviennent des cellules spumeuses et s'accumulent dans la paroi. Les CMLs vont proliférer et former la chape fibreuse. L'infiltration des cellules immunitaires, l'apoptose des cellules et la dégradation de la matrice extracellulaire peuvent générer une chape fibreuse instable formée d'un noyau nécrotique riche en lipide et d'une chape fibreuse mince. L'instabilité de la plaque peut induire la formation d'un thrombus.

### **1-1-1) Initiation: Dysfonction et activation de l'endothélium**

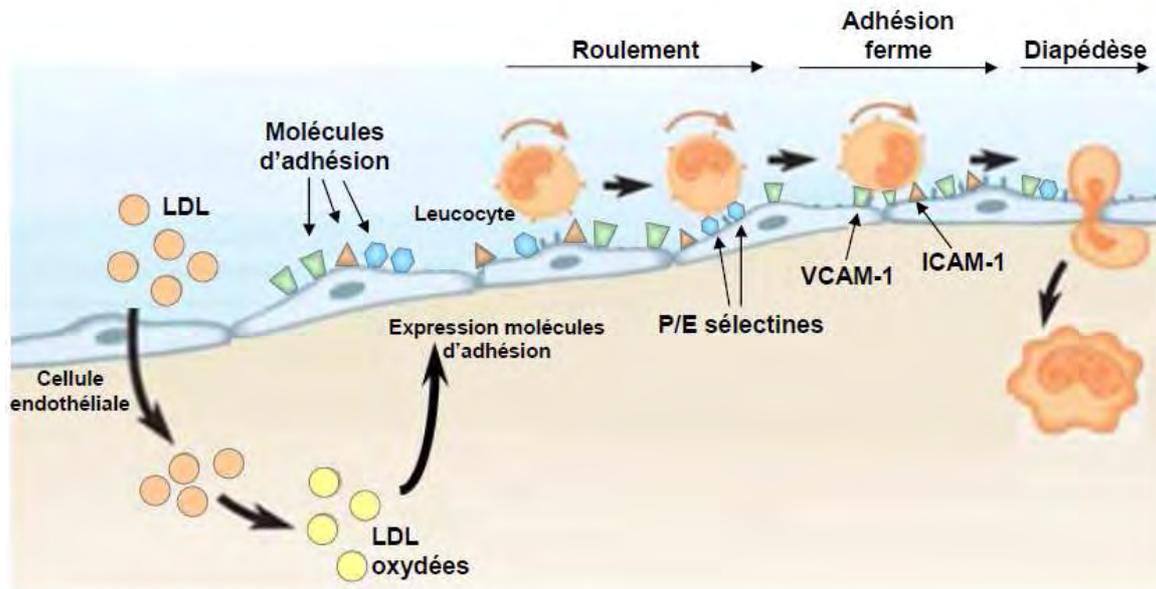
La dysfonction endothéliale est caractérisée par un changement des actions bénéfiques de l'endothélium vers un profil vasoconstricteur, inflammatoire et thrombotique. Les facteurs de risque pour le développement de la dysfonction endothéliale sont divers et incluent entre autre l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète, le tabac, la modification des forces de cisaillement dues au flux sanguin...

À la surface de l'endothélium, les forces de cisaillement du flux sanguin maintiennent les cellules endothéliales dans un état anti-inflammatoire, anti-oxydatif et anti-thrombotique. Au niveau des bifurcations artérielles, sites d'initiation du processus athéromateux, les forces de cisaillements sont diminuées ce qui entraîne une altération des fonctions des cellules endothéliales (Gimbrone, 1999). Les cellules endothéliales agressées présentent une augmentation de la perméabilité permettant ainsi la pénétration des lipoprotéines athérogènes (LDL) et une induction du stress oxydatif. Les LDL peuvent diffuser dans la matrice sous-endothéliale au travers des jonctions cellulaires. Dans l'espace sous-endothélial, les LDL vont

être retenues par la matrice extracellulaire où elles vont subir différentes modifications dont l'oxydation qui constitue la principale modification impliquée dans l'initiation de la formation de la plaque d'athérome (Tamminen et al., 1999). En effet, des travaux ont montré que les LDL oxydées (LDLox) sont présentes en très faible quantité dans la circulation contrairement à la plaque d'athérome (Chisolm and Steinberg, 2000).

L'accumulation de LDLox induit une activation des cellules endothéliales qui vont exprimer à leur surface des molécules d'adhésion qui sont indispensables au recrutement des cellules présentes dans la circulation (**Figure 17**). Dans un premier temps, les cellules sanguines vont adhérer à la surface de la monocouche de cellules endothéliales par l'interaction entre les protéines d'adhésion: P et E sélectines qui sont exprimées à la surface de l'endothélium activé et les carbohydrates présents à la surface des leucocytes (Varki, 1994). Des souris susceptibles à l'athérosclérose qui ne possèdent pas ces sélectines présentent une diminution du développement de l'athérosclérose indiquant donc un rôle de ces protéines dans la pathologie (Chi and Melendez, 2007). L'attachement ferme des monocytes et des LT à la surface de l'endothélium nécessite l'engagement d'intégrines telles que VLA-4 (Very Late Antigen-4) (Shih et al., 1999). Les intégrines présentes à la surface des cellules immunitaires vont interagir avec des molécules de la famille des immunoglobulines, VCAM-1 (Vascular Cell-Activation Molecule-1) et ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) exprimées à la surface des cellules endothéliales activées (Bobryshev, 2006). Dans la circulation, les intégrines exprimées par les monocytes sont caractérisées par une faible affinité pour leur ligands et leur activation par des molécules pro-inflammatoires permet d'augmenter cette affinité (Sheikine and Hansson, 2004). Ainsi, en plus des molécules d'adhésion, diverses chimiokines et cytokines produites par les cellules endothéliales activées et les CMLs régulent l'adhésion des cellules immunitaires sur l'endothélium et guident également leur migration vers l'espace sous-endothélial ((Chi and Melendez, 2007)). Parmi les différentes molécules chimioattractantes produites, on retrouve MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor). Il a été montré que l'invalidation de MCP-1 (ou CCL2) et/ou de CCR2, le récepteur de MCP-1, chez la souris, induit une diminution du développement de l'athérosclérose. Ces études montrent donc le rôle important des chimiokines dans l'initiation de l'athérosclérose (Boring et al., 1998) (Gu et al., 1998).

Après leur adhésion à l'endothélium vasculaire, les monocytes et LT vont migrer au travers de l'endothélium dans l'espace sous-endothélial par diapédèse et vont initier la formation de la strie lipidique et induire la réaction inflammatoire (**Figure 17**)



**Figure 17: Dysfonction et activation endothéliale** (d'après Hansson *et al*, 2006)

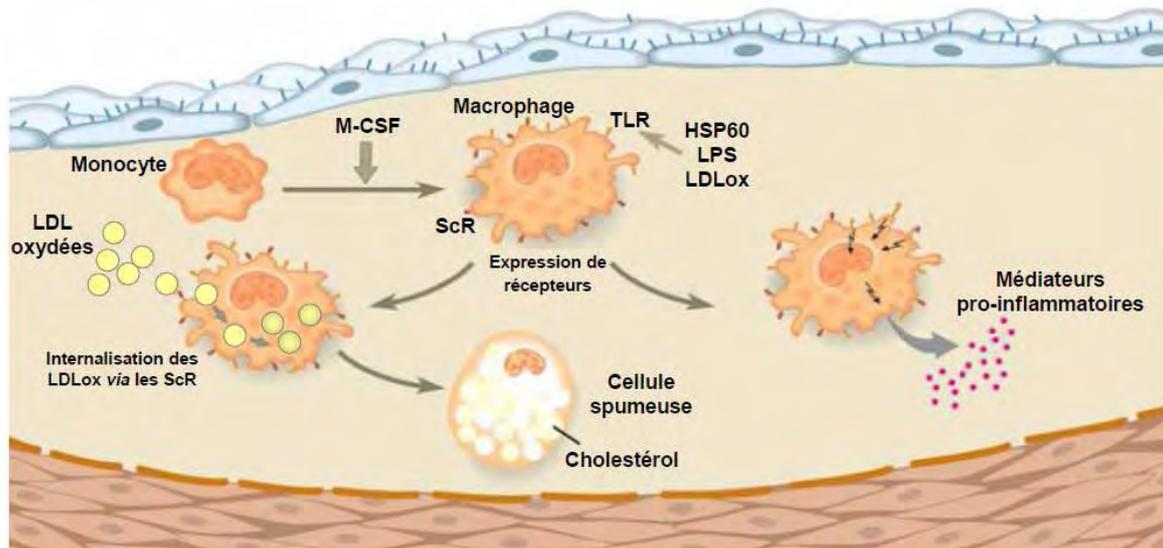
Suite à la dysfonction endothéliale, les LDL diffusent du sang vers l'espace sous-endothélial où elles vont être oxydées. L'accumulation de LDL oxydées induit une activation des cellules endothéliales qui vont exprimer à leur surface des molécules d'adhésions (P/E sélectines, VCAM-1 et ICAM-1) qui vont permettre le recrutement et l'infiltration des leucocytes dans l'espace sous-endothélial.

### **1-1-2) Développement de la strie lipidique et inflammation**

La cytokine M-CSF produite par l'endothélium activé induit la différenciation des monocytes présents dans l'espace sous-endothélial en macrophages. Ainsi, l'inactivation chez les souris apoE<sup>-/-</sup> de M-CSF induit un retard du développement de la lésion et une diminution de l'accumulation des macrophages (Smith *et al.*, 1995). La différenciation des macrophages est associée à une augmentation de l'expression de récepteurs à reconnaissance large ou PRR « Pattern Recognition Receptor » incluant des récepteurs « Scavenger » tels que CD36, CD68, SR-AI (Scavenger Receptor A type 1), SR-AII, SR-B1, LOX-1 (Lecithin-type Oxidised low density lipoprotein-1) ou CXCL-16 (CXC-Chemokine ligand 16) et des TLRs (Toll-like receptors) (Hansson *et al.*, 2006). Les récepteurs « Scavengers » présents sur les macrophages de l'intima permettent la liaison et l'internalisation des LDLox. Une fois endocytées, les LDLox rentrent dans le lysosome dans lequel elles seront exposées à différentes lipases et

protéases. Contrairement aux LDL, les LDLox sont moins bien dégradées ; il a été montré que l'apoB de ces lipoprotéines s'accumule dans les lysosomes (Mander et al., 1994), mais également une grande proportion de cholestérol est retenue dans le lysosome (Yancey and Jerome, 1998). Contrairement au LDLR, l'expression des récepteurs « Scavenger » n'est pas régulée négativement par les niveaux intracellulaires de cholestérol ; en conséquence en cas d'hypercholestérolémie, les macrophages captent les LDLox en excédant leur capacité d'efflux (Goldstein et al., 1979). Cette situation entraîne donc une accumulation de stérols dans les macrophages, les transformant ainsi en cellules spumeuses (**Figure 18**).

Parallèlement, les TLRs exprimés sur les macrophages vont permettre d'initier la cascade de signalisation qui conduit à l'activation de l'inflammation. Les TLRs peuvent être activés par différents ligands tels que HSP60 (Heat-Shock Protein 60), le LPS (lipopolysaccharide) et les LDLox. L'activation des macrophages par les TLRs conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires, de protéases comme les MMPs (Matrix Metalloproteases), des molécules vasoactives telles que l'oxyde nitrique (NO) et des facteurs pro-coagulants (Hansson et al., 2006) (**Figure 18**).



**Figure 18: Différenciation des monocytes et formation de cellules spumeuses** (d'après Hansson *et al.*, 2006)

Une fois dans l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages en réponse à la cytokine M-CSF produite par l'endothélium activé. L'expression de différents récepteurs à reconnaissance large tels que des récepteurs "Scavenger" (ScR) et des TLRs est augmentée à la surface des macrophages. Les ScR vont permettre d'épurer l'espace sous-endothélial des LDLox, entraînant ainsi la formation de cellules spumeuses. Parallèlement, les TLRs en liant différents molécules (HSP60, LPS, LDLox) vont induire la sécrétion de différents médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages qui conduit à l'activation du processus inflammatoire.

Des études récentes suggèrent l'existence de 2 sous-populations de macrophages : M1 et M2. Les macrophages de sous-type M1 sont majoritaires et pro-athérogéniques ; ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 (Interleukin 1), le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont permettre de perpétuer le recrutement des cellules immunitaires et l'accumulation de LDLox dans l'espace sous-endothélial. À l'inverse, la sous-population de macrophages M2 sécrète des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 (Interleukin 10) et le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) qui peuvent donc moduler la progression de l'inflammation (Bui et al., 2009).

De façon similaire aux monocytes, des LT sont recrutés dans l'espace sous-endothélial suite à l'activation de l'endothélium. Les LT sont minoritaires par rapport aux macrophages. Au niveau des plaques humaines, la population de lymphocytes T est majoritairement représentée par des LT CD4<sup>+</sup> (Hansson, 2009). L'implication des LT CD4<sup>+</sup> dans le développement de l'athérosclérose a été démontrée en effectuant un croisement entre des souris scid/scid qui ne possèdent pas de lymphocytes B et T matures avec des souris invalidées pour l'apoE. Ces souris présentent des lésions athéromateuses de plus petites tailles par rapport à des souris apoE<sup>-/-</sup> et un transfert de cellules T CD4<sup>+</sup> dans ces souris restaure un développement de la plaque d'athérome similaire à des souris apoE<sup>-/-</sup> (Zhou et al., 2000). Dans l'espace sous-endothélial, les LT CD4<sup>+</sup> sont activés par des antigènes présentés au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) par des macrophages ou cellules dendritiques. Les LT peuvent se différencier en Th1 (T helper 1) ou en Th2 (T helper 2). Au niveau de la plaque, les cellules Th1 sont majoritaires et elles vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) et le TNF $\alpha$  qui vont promouvoir le développement de la plaque en recrutant des cellules immunitaires additionnelles perpétuant ainsi la réponse inflammatoire (Bui et al., 2009).

### **1-1-3) Développement de la chape fibreuse**

Les CMLs, les constituants majoritaires de la média, sont responsables de la vasoconstriction et de la vasodilatation des vaisseaux en réponse à un stimulus physiologique ou pharmacologique. Au cours de la formation des vaisseaux, les CMLs dans la média subissent une modification de leur phénotype accompagnée d'une diminution de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire et d'une augmentation de la formation de myofilaments intracellulaires. Cette transition d'un état synthétique à un état contractile est requise pour que les CMLs puissent assurer leur fonction primaire de contraction et de

dilatation des vaisseaux pour réguler la pression artérielle et le flux. Dans des conditions pathologiques telles que le processus inflammatoire de l'athérosclérose, les CMLs des vaisseaux matures peuvent subir une modulation de leur phénotype et « shifter » de leur état normal contractile vers l'état synthétique qui leur donne la capacité de proliférer et de migrer de la média vers l'intima pour participer à la formation de la chape fibreuse (Stegemann et al., 2005).

Les différents types cellulaires qui constituent la paroi athéromateuse libèrent de nombreux facteurs tels que le facteur de croissance PDGF (Platelet Derived Growth Factor), la thrombine, l'IFN $\gamma$ , MCP-1 qui vont réguler la transition du phénotype contractile au phénotype synthétique (prolifératif) des CMLs (Rudijanto, 2007; Selzman et al., 2002; Spinetti et al., 2004).

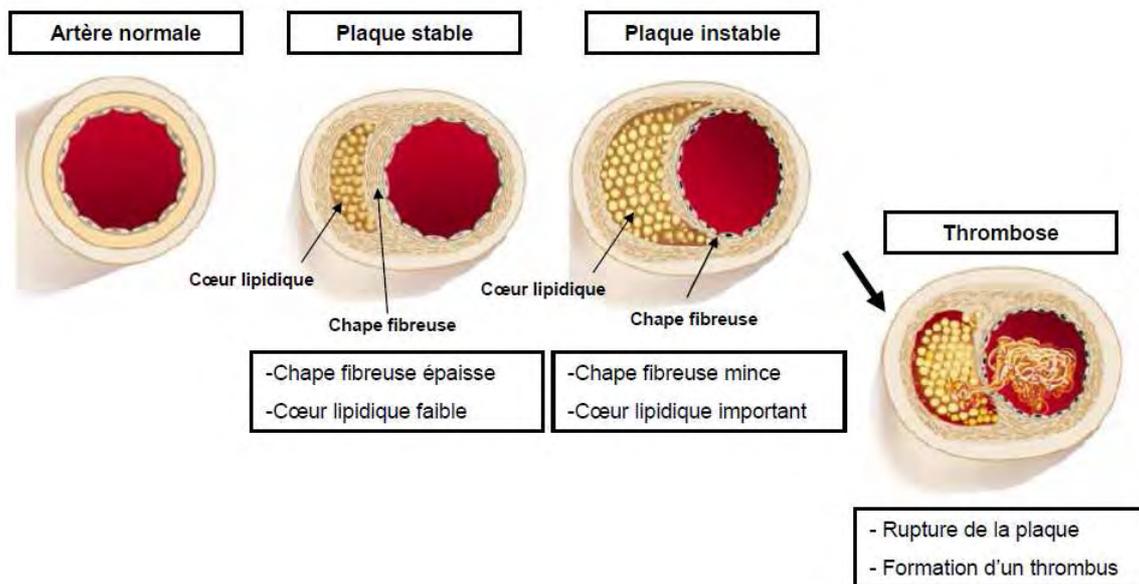
Dans le vaisseau natif, les CMLs sont entourées par une matrice extracellulaire complexe et hautement structurée. Les constituants matriciels sont importants pour maintenir la structure d'un tissu mais aussi pour guider les fonctions cellulaires. Les différentes MMPs sécrétées par les différents types cellulaires de la strie lipidique vont participer au processus de migration des CMLs. Les MMPs vont dégrader les composants de la membrane basale qui retiennent physiquement les CMLs et vont faciliter leur contact avec la matrice interstitielle, libérant ainsi des sites d'adhésion qui favorisent le phénomène de traction cellulaire. Les MMPs sont regroupées en une famille de 25 protéases sécrétées ou liées à la membrane cellulaire dont 14 ont été identifiées dans les cellules vasculaires. Deux MMPs sont particulièrement associées avec la migration des CMLs : MMP-2 et MMP-9 (Cheng et al., 1998) (Busti et al.). La dégradation de la matrice extracellulaire va libérer des facteurs de croissance (IGF-1, TGF $\beta$ ...) qui vont auto-entretenir la sécrétion des MMPs, le changement phénotypique des CMLs, leur prolifération et leur migration de la média vers l'intima (Newby, 2006).

Ainsi le changement phénotypique, la prolifération et la migration des CMLs sont des éléments clés de la formation de la chape fibreuse qui entoure le centre lipidique de la lésion athéromateuse.

La modulation phénotypique des CMLs s'accompagne d'une modification des protéines de la matrice extracellulaire. En effet, la matrice extracellulaire des CMLs quiescentes est composée essentiellement de collagène et de protéoglycanes. Lors du changement de phénotype, la matrice extracellulaire est enrichie en glycoprotéines telles que la fibronectine, la vitronectine et l'ostéopontine qui vont fournir des sites d'attachement pour les cellules vasculaires (Newby, 2006).

#### 1-1-4) Instabilité de la plaque d'athérome et thrombose

La stabilité de la plaque d'athérome est une notion majeure qui peut se traduire par des manifestations cliniques fatales. En effet, une plaque instable caractérisée par une chape fibreuse mince et un cœur lipidique (nécrotique) important est susceptible de se rompre et de conduire à la formation d'un thrombus qui va obstruer la lumière artérielle en exposant le matériel lipidique thrombogène au contact du sang circulant. À l'inverse, une plaque stable caractérisée par une chape fibreuse épaisse et un cœur lipidique peu important est peu sensible à la rupture grâce notamment aux CMLs qui synthétisent de la matrice extracellulaire et forment une chape fibreuse solide (**Figure 19**).



**Figure 19: Stabilité de la plaque d'athérome** (d'après Libby *et al*, 2002)

Au cours de la progression de l'athérosclérose, des cellules endothéliales, des macrophages, des LT et des CMLs meurent par apoptose ou nécrose. Les mécanismes impliqués dans l'initiation de l'apoptose sont divers: l'accumulation de fortes concentrations intracellulaires de cholestérol et extracellulaires de LDLox, la production de cytokines pro-apoptotiques telles que le TNF- $\alpha$ , la sécrétion excessive de ROS par les macrophages et les interactions cellulaires par la formation du complexe Fas/Fas ligand (Seimon and Tabas, 2009). En général, les macrophages éliminent les cellules apoptotiques par phagocytose pour prévenir les réactions inflammatoires causées par la nécrose des cellules apoptotiques. Cependant, de nombreuses études suggèrent une détérioration du processus de phagocytose

des cellules apoptotiques (efférocytose) par les macrophages au cours de l'athérosclérose, détérioration qui serait due à divers mécanismes: la compétition entre les LDLox et les cellules apoptotiques pour la liaison aux macrophages, la présence de médiateurs du stress oxydatif tels que le peroxy-nitrite (Schrijvers et al., 2007). Ainsi, les cellules apoptotiques de diverses origines ainsi que leur contenu lipidique vont s'accumuler dans le cœur nécrotique qui va augmenter de volume et donc favoriser l'instabilité de la plaque. De plus, l'apoptose des CMLs conduit à une limitation de l'extension de la prolifération intimale affaiblissant la couche fibromusculaire entourant le cœur nécrotique et augmentant donc le risque de rupture de la plaque. L'amincissement de la chape fibreuse est également le produit d'une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire des CMLs par des MMPs à activité collagénase (MMP-1) et gélatinase (MMP-2, MMP-9) exprimées au cours du processus inflammatoire et d'une diminution de la synthèse du constituant majeur de la matrice extracellulaire: le collagène. Cette diminution de la production de collagène est la résultante d'une diminution de la quantité de CMLs et d'une inhibition de la synthèse de ce composé par les CMLs induite par l'IFN- $\gamma$  sécrété par les LT (Libby, 2008; Thim et al., 2008). Ainsi, l'inflammation semble jouer un rôle important pour induire l'instabilité de la plaque d'athérome.

La rupture de la chape fibreuse permet au sang circulant d'être en contact avec le cœur nécrotique thrombogène de la lésion athéromateuse qui va favoriser la formation d'un thrombus. Le thrombus formé peut entraîner une occlusion partielle ou complète de la lumière artérielle, migrer ou être incorporé à la plaque par un processus de cicatrisation. Le cœur nécrotique est la partie la plus thrombogène de la plaque. En effet, dans le cœur nécrotique, les lipides oxydés vont activer directement les plaquettes et le facteur tissulaire (FT), l'initiateur du processus de coagulation, qui va activer la cascade conduisant à la formation de thrombine (Shah, 2007). Cette dernière induit la formation de fibrine à partir du fibrinogène et stabilise alors le thrombus. Au niveau de la plaque d'athérome, le FT est exprimé par différents types cellulaires (macrophages, cellules endothéliales, CMLs et cellules spumeuses) et il est également présent dans le cœur nécrotique lié à des microparticules membranaires émises par les cellules apoptotiques (Breitenstein et al.).

L'érosion superficielle de la monocouche endothéliale peut être un autre mécanisme induisant la formation d'un thrombus. Cette érosion superficielle peut être due à la présence de ROS au niveau de la plaque qui sensibilise les cellules endothéliales à l'apoptose mais également à des MMPs qui vont dégrader la membrane basale des cellules endothéliales qui leur sert d'attachement à la paroi artérielle (Libby, 2008).

Ainsi, l'inflammation, la dégradation de la matrice extracellulaire par diverses protéases ainsi que l'apoptose des cellules de la plaque jouent des rôles importants dans la stabilité de la plaque et dans son pouvoir thrombogène. Les complications thromboemboliques liées à la rupture de la plaque d'athérome ou à l'érosion superficielle de la plaque sont des critères de mortalité et de morbidité associés à l'athérosclérose. Ces complications vont pouvoir entraîner l'occlusion artérielle dont les principales manifestations sont l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux et les ischémies des membres inférieurs.

### **1-2) Différents rôles athéroprotecteurs des HDL**

De nombreuses études ont montré que les taux plasmatiques de HDL-cholestérol sont inversement corrélés à l'incidence de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires associées. L'athéroprotection induite par les HDL a été classiquement attribuée à leur rôle central dans le transport retour du cholestérol (RCT) qui est le processus physiologique par lequel le cholestérol excédentaire présent dans les tissus périphériques est capté et transporté au niveau du foie, organe principal de dégradation et d'excrétion du cholestérol (cf. Chapitre I paragraphe 4). Cependant, différentes autres fonctions des HDL participent également à cet effet athéroprotecteur telles que les propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et les effets protecteurs sur l'endothélium qui seront décrits brièvement ci-dessous. L'apoA-I et d'autres composants des HDL sont responsables de ces différents effets athéroprotecteurs.

#### **1-2-1) Propriétés anti-oxydantes des HDL**

Comme souligné dans la partie 1-1 de ce chapitre, l'oxydation des LDL joue un rôle central dans l'initiation et la propagation de l'athérosclérose, notamment *via* la contribution des LDLox dans la transformation des macrophages en cellules spumeuses. Ainsi, la prévention de l'oxydation des LDL et des modifications en général des LDL peut jouer un rôle important dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose.

Un des principaux mécanismes par lequel les HDL réduisent le risque d'accidents cardiovasculaires est la réduction de LDLox qui est effectuée de différentes façons et par différentes protéines présentes à la surface des HDL telles que l'apoA-I, la paraoxonase (PON), la PAF-AH (Platelet-Activating Factor AcetylHydrolase).

Les apolipoprotéines A-I et A-II sont en partie responsables des propriétés anti-oxydantes des HDL; apoA-I et A-II sont toutes deux capables de réduire les lipides

hydropéroxydés en lipides hydroxydés par un processus qui implique l'oxydation des apolipoprotéines sur les résidus méthionine (Garner et al., 1998). Ainsi, en réduisant les lipides hydropéroxydés les HDL convertissent des potentielles espèces réactives de l'oxygène en des espèces relativement inertes qui ne permettront pas l'oxydation des LDL.

Navab *et al* ont démontré que les HDL ainsi que différents composants des HDL (l'apoA-I et la PON) mais pas l'apoA-II ont la capacité de rendre les LDL résistantes à l'oxydation par les cellules de la paroi artérielle en leur retirant des composés actifs hydropéroxydés nécessaires pour l'oxydation. De plus, un traitement des cellules de la paroi artérielle avec des HDL, ou l'apoA-I ou la PON rendent ces cellules incapables d'oxyder les LDL (Navab et al., 2000).

L'effet anti-oxydant des HDL est également dû à l'activité d'une autre enzyme associée aux HDL: la PAF-AH qui est une sérine estérase, qui hydrolyse les courtes chaînes de groupement acyle estérifiées à la position sn-2 des phospholipides et certains phospholipides oxydés fragmentés. Watson *et al* ont montré *in vitro* que cette enzyme diminue la production et l'activité des LDLox en facilitant l'hydrolyse de phospholipides oxydés (Watson et al., 1995). L'importance physiologique de PON1, une isoforme de PON, a été démontrée chez les souris invalidées pour PON1 qui présentent une augmentation du développement de l'athérosclérose par rapport à des souris sauvages en conditions de régime enrichi en graisses et cholestérol. Les HDL isolées des souris invalidées pour PON1 n'ont pas la capacité de bloquer la formation des LDLox (Shih et al., 1998).

Une autre fonction anti-oxydante des HDL est leur capacité à capter dans la circulation les lipides hydropéroxydés potentiellement cytotoxiques. En effet, les HDL sont les principaux transporteurs de lipides hydropéroxydés dans le plasma humain (Bowry et al., 1992).

### **1-2-2) Propriétés anti-inflammatoires des HDL**

L'athérosclérose peut être considérée comme une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une accumulation de macrophages et de lymphocytes dans l'espace sous-endothélial de l'artère et par une augmentation des concentrations plasmatiques de différents marqueurs inflammatoires. Une étape précoce de ce processus inflammatoire est l'adhésion des leucocytes au niveau de l'endothélium activé qui exprime différentes molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et E- et P-selectines). Les LDLox ainsi que différentes cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) induisent l'expression endothéliale de ces molécules d'adhésion (O'Connell and Genest, 2001).

Cockerill *et al* ont été les premiers à montrer que les HDL étaient capables d'inhiber l'inflammation *in vitro*. Dans cette étude, des concentrations physiologiques de HDL plasmatiques ou reconstituées contenant de l'apoA-I complexée avec de la phosphatidylcholine inhibent l'expression des protéines VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine par des cellules endothéliales (HUVECs) activées par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 (Cockerill *et al.*, 1995). Cependant, des vésicules constituées seulement de phospholipides ou des apolipoprotéines délipidées sont incapables de prévenir l'expression de ces molécules d'adhésion induite par le TNF $\alpha$  (Calabresi *et al.*, 1997). Il a été montré que la composition en phospholipides de la particule HDL influence la capacité des HDL à inhiber l'expression de VCAM-1 par des cellules endothéliales activées (Baker *et al.*, 2000). Malgré les effets des HDL sur le recrutement des cellules inflammatoires au niveau des cellules endothéliales veineuses humaines (HUVECs), les effets des HDL sur l'expression des molécules d'adhésion sont différents en fonction du modèle de cellules aortiques étudié. Il a été montré que les HDL sont incapables d'inhiber l'expression des molécules d'adhésion induite par le TNF $\alpha$  dans un modèle proche de la physiopathologie humaine (cellules endothéliales aortiques humaines) (Zhang *et al.*, 2002b). Cependant sur un autre modèle cellulaire, les cellules endothéliales aortiques de porc (PAECs), des HDL reconstituées inhibent l'expression des E-sélectines induite par l'IL-1 $\alpha$  (Cockerill *et al.*, 2001). Dans cette étude, les auteurs ont également montré l'effet inhibiteur des HDL sur l'expression des E-selectines *in vivo* dans un modèle d'inflammation porcine. Une augmentation du taux de HDL circulant d'un facteur 2 induit une inhibition de l'expression des E-sélectines induite par l'IL-1 $\alpha$  au niveau des cellules endothéliales microvasculaires du porc (Cockerill *et al.*, 2001). De plus, une augmentation de la concentration plasmatique de HDL par surexpression de l'apoA-I dans des souris invalidées pour l'apoE inhibent l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 par l'endothélium vasculaire et ainsi le recrutement des monocytes dans la paroi artérielle (Theilmeier *et al.*, 2000). Chez l'homme, une faible concentration plasmatique de HDL est associée à une augmentation des taux plasmatiques de molécules d'adhésion solubles (ICAM-1 et E-selectine) (Calabresi *et al.*, 2002). Le mécanisme moléculaire par lequel les HDL inhibent l'expression des molécules d'adhésion induite par les cytokines n'est pas encore bien connu. Il semblerait que les HDL bloquent la translocation au noyau et la liaison à l'ADN du facteur NF- $\kappa$ B, ceci en inhibant l'activation de la sphingosine kinase induite par le TNF $\alpha$  (Xia *et al.*, 1999).

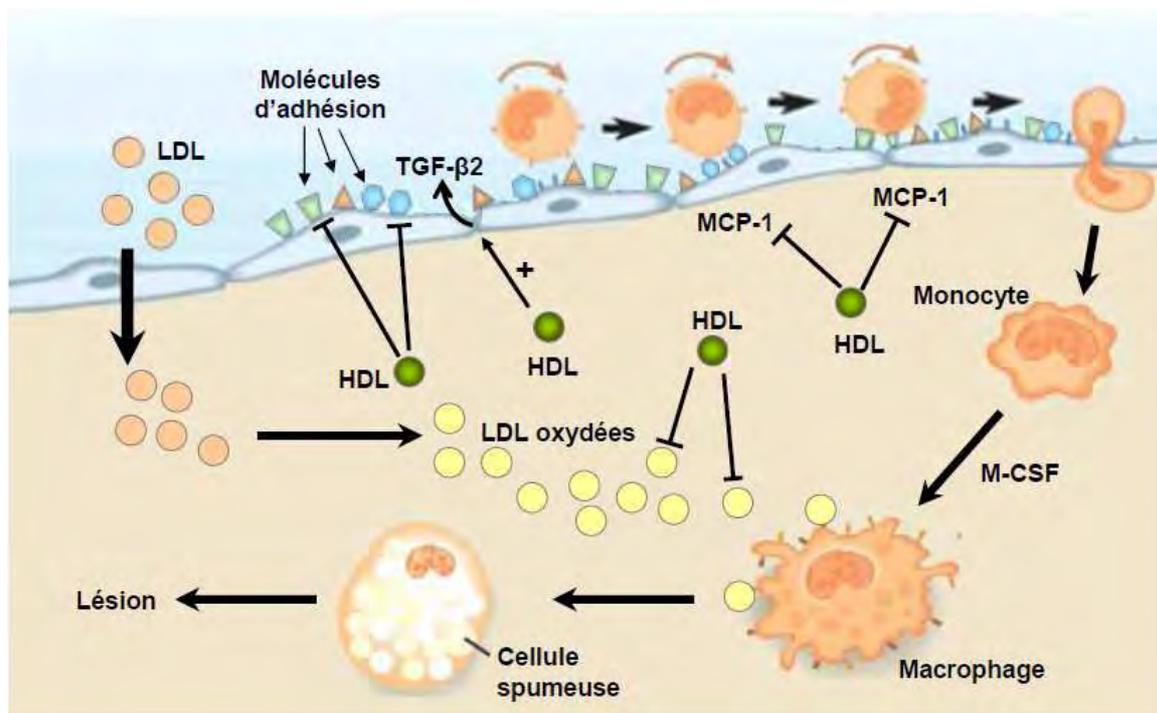
Par la présence de phospholipides oxydés dans leur composition, les HDL ont également la capacité de diminuer l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine) par les cellules HUVECs induite par la CRP (C-Reactive Protein) qui est un

marqueur connu de l'athérosclérose. En présence de HDL, l'adhérence de leucocytes sur des cellules endothéliales aortiques induite par la CRP est inhibée (Wadham et al., 2004).

De plus, Murphy *et al* ont également montré que les HDL diminuent à la surface des monocytes activés l'expression de CD11b, une molécule d'adhésion interagissant avec VCAM-1 et ICAM-1 présents à la surface de l'endothélium. Dans cette étude, l'effet inhibiteur des HDL sur l'adhésion des monocytes sur les cellules endothéliales a également été observé (Murphy et al., 2008).

Ainsi, une des propriétés anti-inflammatoires des HDL est donc de diminuer l'expression par les cellules endothéliales ou les monocytes de molécules d'adhésion qui sont responsables de l'adhésion sur l'endothélium des cellules inflammatoires et qui favorisent l'infiltration de ces cellules dans l'espace sous-endothélial (**Figure 20**).

Les cellules endothéliales produisent des cytokines et des chimiokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ ) et pro-inflammatoires telles que MCP-1 qui est une molécule chimioattractante pour les monocytes. Les HDL ont la propriété de moduler l'expression de ces différentes molécules. En effet, les HDL ont la capacité d'inhiber la sécrétion de MCP-1 par un modèle de cellules endothéliales humaines induite par les LDLox. Cette propriété des HDL est attribuée à la PON1 qui diminue l'oxydation des LDL *in vitro*; des HDL dépourvues de PON1 ne sont plus capables d'inhiber la production de MCP-1 induite par les LDLox (Mackness et al., 2004). De plus, il a été montré dans un système de co-culture que les HDL inhibent l'adhésion et la transmigration des monocytes au travers d'une monocouche de cellules endothéliales induites par les LDLox (Navab et al., 1991). Parallèlement, les HDL induisent la production d'une cytokine anti-inflammatoire, TGF- $\beta$ 2 (Transforming Growth Factor- $\beta$ 2) par des cellules endothéliales. Cet effet dépendant de l'activation de la voie PI3K/Akt peut être également induit par les lysosphingolipides présents dans les HDL (sphingosine-1-phosphate et sphingosyl-phosphorylcholine) et par l'apoA-I. Cette capacité des HDL d'induire la production de TGF- $\beta$ 2 a également été démontrée *in vivo*. Des souris surexprimant l'apoA-I humaine, qui possèdent donc des taux plasmatiques de HDL élevés, présentent une expression élevée de TGF- $\beta$ 2 au niveau de l'aorte en comparaison avec des souris invalidées pour l'apoA-I (Norata et al., 2005). De plus, il a été montré que l'inhibition de la signalisation TGF- $\beta$  accélère le développement de l'athérosclérose et induit une plaque instable chez la souris (Mallat et al., 2001). Ainsi, le rôle athéroprotecteur des HDL peut être également attribué à leur capacité à moduler l'expression de molécules pro- et anti-inflammatoires (**Figure 20**).



**Figure 20: Propriétés anti-inflammatoires des HDL** (d'après Tabet *et al.*, 2009)

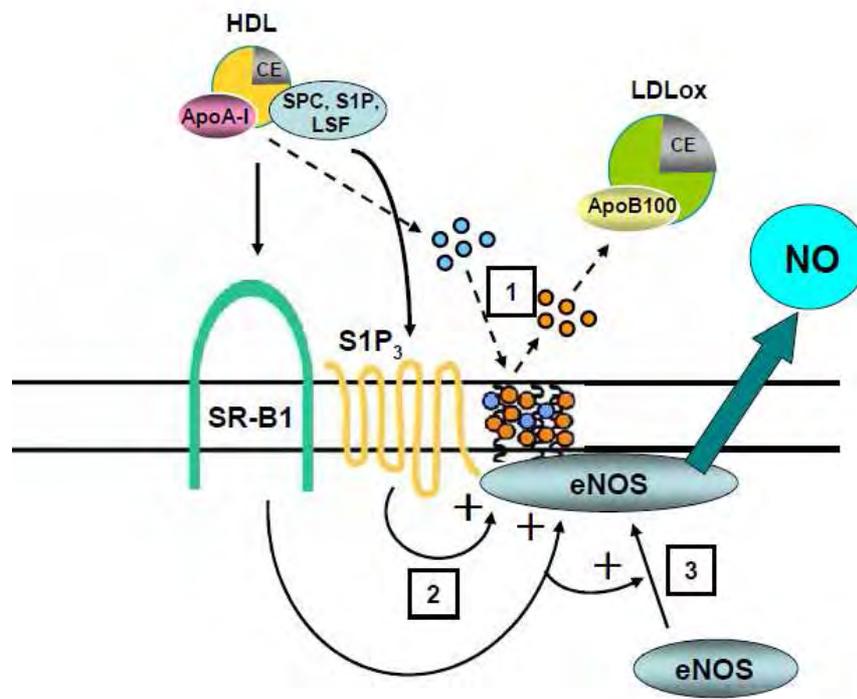
Les HDL inhibent l'inflammation en inhibant l'oxydation des LDL, l'expression de molécules d'adhésion (P/E sélectines, ICAM-1, VCAM-1) à la surface des cellules endothéliales ainsi que l'expression de chimiockines telles que MCP-1 qui sont nécessaires au recrutement des cellules immunitaires. De plus, les HDL induisent la production par les cellules endothéliales d'une cytokine anti-inflammatoire: le TGF- $\beta$ 2.

### **1-2-3) Propriétés protectives des HDL sur l'endothélium**

La dysfonction endothéliale caractérisée par une diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) et une augmentation de l'affinité des cellules endothéliales pour les leucocytes est l'une des caractéristiques précoces dans le développement de l'athérosclérose.

Le NO est un puissant vasodilatateur synthétisé par divers types cellulaires dont les cellules endothéliales. Sur les CMLs, le NO active la guanylate cyclase qui induit la relaxation. Sur les cellules endothéliales, le NO inhibe l'expression de molécules pro-inflammatoires (molécules d'adhésion, cytokines, facteurs de croissance) et protège l'intégrité de l'endothélium en inhibant l'apoptose et en induisant la prolifération et la migration cellulaire (Cooke, 2003). Il a été montré que les HDL ont la capacité d'induire l'activation de l'oxyde nitrique synthétase endothéliale (eNOS) ce qui induit une sécrétion de NO et donc un effet athéroprotecteur sur les vaisseaux. Cet effet des HDL est dépendant de la liaison des HDL sur le récepteur SR-B1 (Yuhanna *et al.*, 2001). Il a été également montré que les HDL augmentent la demi-vie de la eNOS (Ramet *et al.*, 2003). De façon complémentaire, les lipides contenus dans les HDL, principalement la sphingosyl-phosphorylcholine (SPC), la sphingosine-1-phosphate (S1P) et le lysosulfatide (LSF) augmentent l'activité de la eNOS et donc la sécrétion de NO. Ainsi les

HDL transportent des lysophospholipides qui augmentent la production de NO. Cet effet des lysophospholipides est dépendant du récepteur S1P<sub>3</sub> (Nofer et al., 2004). Les LDLox induisent au niveau des cellules endothéliales une déplétion en cholestérol dans les cavéoles qui est le site de localisation de la eNOS au niveau de la membrane plasmique. Cette déplétion en cholestérol par les LDLox *via* le récepteur scavenger CD36 induit la redistribution de la eNOS dans des compartiments membranaires intracellulaires et atténue donc la capacité d'activer l'enzyme (Blair et al., 1999) (Uittenbogaard et al., 2000). Les HDL en apportant du cholestérol au niveau des cavéoles préviennent la délocalisation de la eNOS et restituent la fonction endothéliale (Uittenbogaard et al., 2000). Ainsi, les HDL permettent de maintenir la fonction endothéliale en augmentant la biodisponibilité du NO par différents effets sur la eNOS (maintien de sa localisation dans les cavéoles, augmentation de sa demi-vie et stimulation de son activité) (**Figure21**).



**Figure 21: Les HDL activent la production de NO par différents mécanismes** (d'après Mineo *et al*, 2006)

- 1) Les LDLox induisent une déplétion en cholestérol au niveau des cavéoles, sites de localisation de la eNOS. Les HDL en apportant du cholestérol au niveau des cavéoles préviennent la délocalisation de la eNOS.
- 2) Les HDL en interagissant avec SR-B1 ou S1P<sub>3</sub> induisent l'activation de la eNOS.
- 3) Les HDL augmentent l'abondance de la eNOS au niveau de la membrane plasmique en augmentant sa demi-vie.

De plus, l'incubation de HDL avec des cellules endothéliales augmente également la synthèse de prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) qui est une prostaglandine produite par les cellules endothéliales qui induit l'activation de l'adénylate cyclase dans les CMLs qui se traduit par une inhibition de la contraction (Fleisher et al., 1982).

Une monocouche de cellules endothéliales continue et intacte est nécessaire pour maintenir les propriétés d'une paroi artérielle normale. L'intégrité de l'endothélium vasculaire peut être transitoirement ou chroniquement perturbée par le turnover des cellules endothéliales, une agression traumatique ou des dommages pathologiques. L'apoptose des cellules endothéliales contribue fortement au développement de l'athérosclérose en perturbant l'intégrité de la monocouche endothéliale. De multiples facteurs pro-athérogènes tels que les LDLox et le  $\text{TNF}\alpha$  induisent l'apoptose des cellules endothéliales (Mineo et al., 2006). Les LDLox induisent une augmentation soutenue de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules endothéliales qui conduit à l'apoptose de ces cellules. Cet effet des LDLox peut être réversé par les HDL ou l'apoA-I qui préviennent l'augmentation soutenue de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  et augmentent la synthèse protéique (Suc et al., 1997). Il a été montré que les HDL ainsi que des HDL synthétiques sont capables de protéger des cellules endothéliales humaines en culture de l'apoptose induite par le  $\text{TNF}\alpha$  par un mécanisme dépendant de l'inactivation de la caspase 3. La composition en apolipoprotéine des HDL synthétiques affecte leurs propriétés anti-apoptotiques. Les particules contenant l'apoA-I apparaissent être les plus efficaces (Sugano et al., 2000). Des travaux de notre équipe ont mis en évidence que l'apoA-I *via* son interaction avec l'ecto- $\text{F}_1$ -ATPase exprimée à la surface des HUVECs induit une inhibition de l'apoptose déclenchée par une privation en sérum et facteurs de croissance (Radojkovic et al., 2009). D'autres études ont mis en évidence la participation des composants lipidiques des HDL dans les effets anti-apoptotiques. Par exemple, la SPC et la LSF inhibent l'apoptose des cellules endothéliales induite par la privation en facteurs de croissance (Nofer et al., 2001). De plus, le lysophospholipide S1P *via* l'interaction avec son récepteur  $\text{S1P}_1$  augmente la survie des cellules endothéliales de façon comparable aux HDL (Kimura et al., 2003).

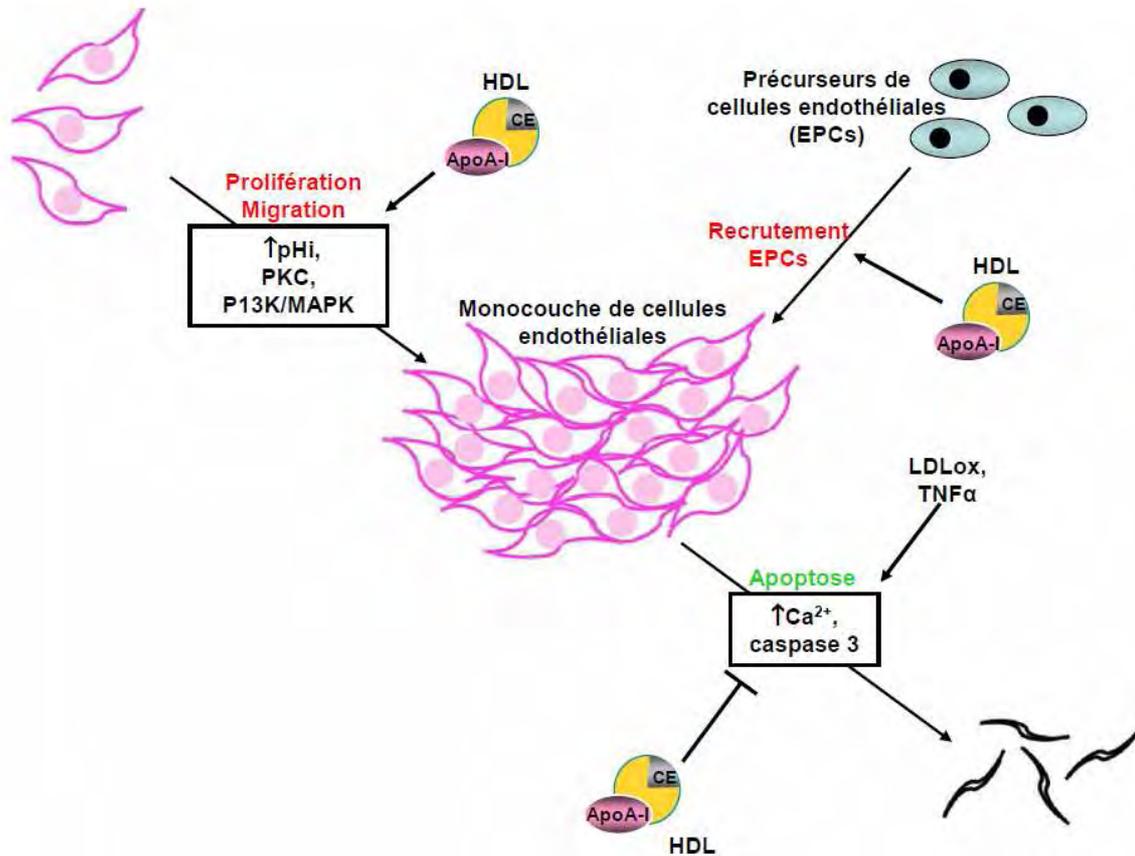
Après une agression, une rapide régénération de l'endothélium par migration et prolifération des cellules endothéliales est nécessaire pour restaurer l'homéostasie de la paroi artérielle. Des études avec des cellules endothéliales d'aorte bovine (BAECs) ont montré que les HDL ont la capacité d'induire la migration des cellules endothéliales de manière dose dépendante et de façon comparable au bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). Ce mécanisme indépendant des protéines Gi et de la phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) est complémentaire à la voie

du bFGF (Murugesan et al., 1994). Il a été montré que la S1P pouvait être un des composants actifs des HDL pour l'induction de la migration des cellules endothéliales en activant ses récepteurs S1P<sub>1</sub> et S1P<sub>3</sub> (Kimura et al., 2003). Cependant, la migration des BAECs est également observée suite à l'interaction des HDL avec SR-BI qui induit l'activation de kinases de la famille Src et de la voie PI3K/MAPK. La réponse induite par les HDL est similaire à celle du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) mais est indépendante de l'activation de la eNOS. L'effet des HDL peut être reproduit en utilisant des HDL reconstituées avec de l'apoA-I, du cholestérol et de la phosphatidylcholine, ceci indiquant donc que la migration induite par les HDL peut être indépendante du S1P (Seetharam et al., 2006). Parallèlement aux études *in vitro*, il a été montré que la réendothélialisation de l'artère carotidienne suite à une agression électrique est diminuée chez les souris invalidées pour l'apoA-I qui possèdent des taux plasmatiques de HDL très faibles. La restauration de l'expression hépatique de l'apoA-I chez ces souris induit une réendothélialisation normale. De plus, le processus de réendothélialisation est également diminué chez les souris invalidées pour SR-BI malgré les taux de HDL plasmatiques élevés (Seetharam et al., 2006). Ainsi, l'implication des HDL *via* l'activation de SR-BI dans la migration des cellules endothéliales et donc dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire a été démontrée *in vivo*.

De plus, les HDL stimulent également la prolifération des cellules endothéliales. Il a été proposé que la prolifération induite par les HDL intervient sous activation de la PKC (Protein Kinase C) et que les composants apolipoprotéiques des HDL sont requis pour cet effet (Darbon et al., 1986). Des travaux de notre équipe ont également montré que l'apoA-I, *via* son interaction avec l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase exprimée à la surface des HUVECs protège contre l'apoptose et induit la prolifération des cellules endothéliales (HUVECs). Cet effet de l'apoA-I est inhibé en présence d'IF<sub>1</sub>, un inhibiteur de l'activité ATP hydrolase, ce qui suggère l'implication de l'activité de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase dans ce processus mitogène (Radojkovic et al., 2009). D'autres études suggèrent que l'effet mitogène des HDL requiert le calcium extracellulaire et implique une augmentation du pH intracellulaire (Tamagaki et al., 1996).

Les HDL peuvent également réparer l'endothélium endommagé en recrutant des précurseurs de cellules endothéliales (EPCs) au niveau du site de l'agression. En effet, une simple injection de HDL synthétiques dans des souris invalidées pour l'apoE induit une augmentation du nombre d'EPCs incorporés dans la monocouche endothéliale (Tso et al., 2006).

Ainsi l'ensemble des effets induits par les HDL (inhibition de l'apoptose, induction de la prolifération et migration des cellules endothéliales, recrutement des EPCs) favorise la réendothélialisation et l'intégrité de l'endothélium (**Figure 22**).



**Figure 22: Les HDL maintiennent l'intégrité de l'endothélium** (d'après Mineo *et al*, 2006)  
 Les HDL préviennent l'apoptose induite par les LDLox et le TNF $\alpha$  en empêchant l'augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  et en inactivant la caspase 3. Les HDL induisent également la prolifération et la migration des cellules endothéliales par l'activation de différentes cascades de signalisation impliquant la PI3K, les MAPK et la PKC. De plus, les HDL recrutent des précurseurs de cellules endothéliales (EPCs) au niveau du site lésé.

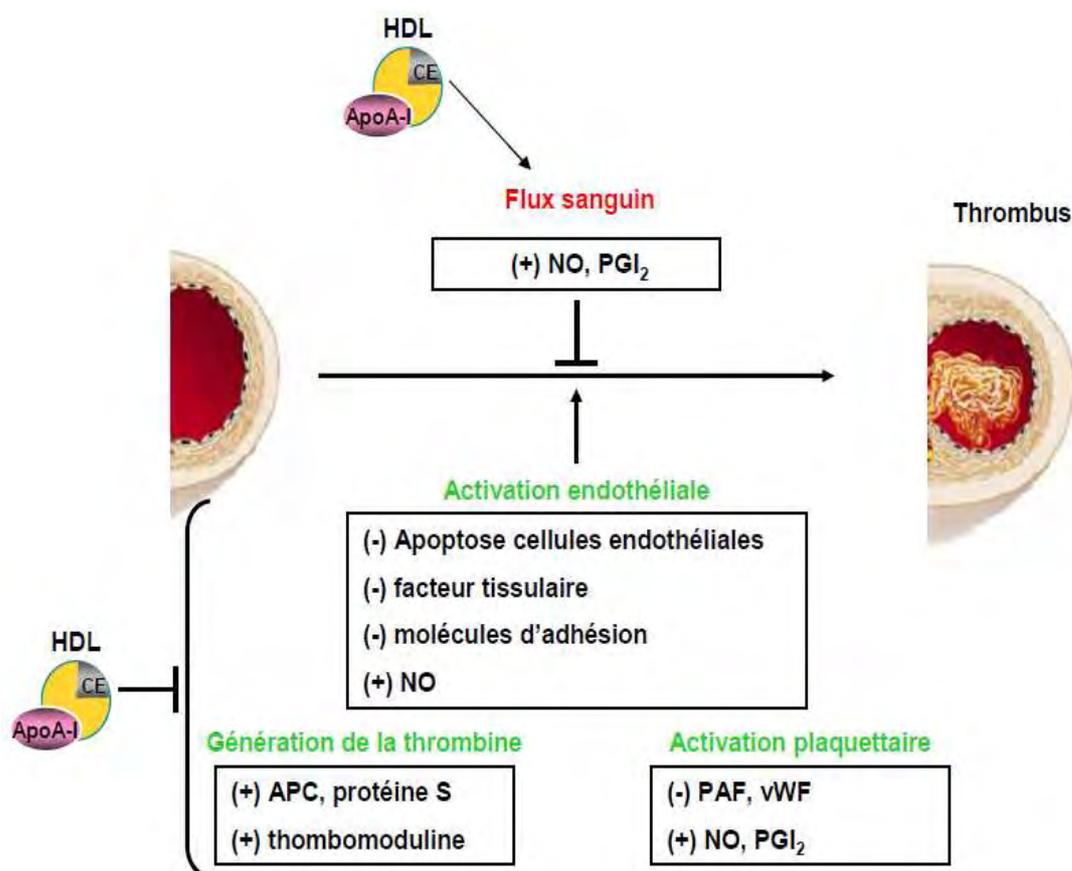
#### **1-2-4) Propriétés anti-thrombotiques des HDL**

L'endothélium intact exerce des effets anti-thrombotiques continus en produisant du NO et la prostacycline PGI $_2$ , qui sont tous deux des inhibiteurs de l'activation plaquettaire induite par différents agonistes. Inversement, l'endothélium dysfonctionnel possède des propriétés thrombogènes en induisant l'activation des plaquettes et en exprimant des facteurs pro-coagulants tels que le Facteur tissulaire (FT). Comme il a été décrit ci-dessus (paragraphe 1-2-3), les HDL augmentent la biodisponibilité du NO par différents mécanismes et induisent la sécrétion de PGI $_2$ , ceci leur conférant donc des propriétés anti-thrombotiques. De plus, les

HDL inhibent la production de PAF (Platelet-Activating Factor) qui est un phospholipide qui stimule l'adhésion cellulaire, l'agrégation plaquettaire et la perméabilité vasculaire dans les cellules endothéliales (Sugatani et al., 1996). Les HDL inhibent la synthèse endothéliale de PAF à travers l'inhibition de l'activité de l'acétyl-CoA: lyso-PAF acétyltransférase par une voie dépendante majoritairement des apolipoprotéines (Sugatani et al., 1996). Les cellules endothéliales expriment une autre protéine impliquée dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, le facteur de von Willebrand (vWF). Il a été observé que les taux circulants de vWF sont inversement corrélés avec la concentration plasmatique en HDL, ceci suggérant donc que les HDL pourraient inhiber la production de vWF (Conlan et al., 1993). Ainsi, en modulant la production par l'endothélium de différents facteurs tels que le NO, la PGI<sub>2</sub>, le PAF et le vWF, les HDL affectent la thrombogénicité de l'endothélium.

Suite à la stimulation par la thrombine, le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1, les cellules endothéliales vont exprimer le FT qui est le déclencheur central de la voie de coagulation extrinsèque en induisant l'activation des facteurs IX et X par le facteur VIIa. Viswambharan *et al* ont démontré que les HDL ou des HDL reconstituées avec de l'apoA-I et des molécules de phosphatidylcholine ont la capacité d'inhiber l'expression du FT induite par la thrombine dans des cellules endothéliales en culture, ceci en inhibant l'activation de RhoA et en activant la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) (Viswambharan et al., 2004). Les HDL affectent également le processus de coagulation en régulant la protéine C activée (APC) qui régule la coagulation en inactivant les facteurs Va et VIIIa impliqués dans la formation de la thrombine. L'effet anti-coagulant de l'APC peut être augmenté par son co-facteur: la protéine S. Griffin *et al* ont montré que les HDL augmentent l'inactivation du facteur Va induite par l'APC et cet effet anti-coagulant des HDL est augmenté en présence de la protéine S (Griffin et al., 1999). De plus, des études d'infusions répétées de HDL dans des lapins sous régime enrichi en cholestérol indiquent que les HDL augmentent au niveau de la lésion athéromateuse la quantité de thrombomoduline qui est un facteur anti-coagulant essentiel pour l'activation d'APC et donc l'inhibition de la génération de thrombine (Nicholls et al., 2005).

L'effet anti-thrombotique des HDL a été clairement démontré dans un modèle de thrombose artérielle chez le rat. Dans ce modèle, où la formation du thrombus est induite dans l'aorte par une application externe de FeCl<sub>3</sub>, l'infusion d'apoA-I Milano, un variant de l'apoA-I, induit un prolongement de la période requise pour le développement du thrombus et diminue le poids du thrombus. Ces résultats suggèrent fortement que les HDL peuvent diminuer la formation du thrombus *in vivo* (Li et al., 1999).



**Figure 23: Les HDL possèdent de multiples propriétés anti-thrombotiques** (d'après Mineo *et al*, 2006)

Les HDL affectent la thrombogénéicité de l'endothélium en augmentant le flux sanguin et en inhibant l'activation de l'endothélium, la génération de la thrombine ainsi que l'activation plaquettaire.

### **1-2-5) Altération des propriétés athéroprotectrices des HDL**

Au cours d'une inflammation systémique associée à un stress oxydant, la composition protéique des particules HDL est fortement modifiée et les HDL peuvent perdre leurs propriétés anti-inflammatoires. Au cours d'une inflammation, le foie produit et sécrète différentes protéines inflammatoires telles que la Sérum Amyloïde A (SAA) et la céruloplasmine. Ces protéines vont pouvoir être incorporées dans les HDL plasmatiques en contre-partie d'une diminution de la quantité d'apoA-I, de PON et de PAF-AH associés aux HDL. Cette modification de composition des HDL induit une perte par les HDL de la capacité à protéger les LDL de l'oxydation et augmentent l'expression de la chimiokine MCP-1 (Van Lenten *et al.*, 1995). De plus l'enrichissement des HDL en SAA augmentent *in vitro* la liaison des HDL aux protéoglycanes ainsi la SAA pourrait être responsable de l'immobilisation des particules HDL dans la paroi artérielle, les empêchant donc d'effectuer le transport retour du cholestérol vers le foie (Kontush and Chapman, 2006b). En conditions d'hyperlipidémie, une

réponse inflammatoire aiguë: APR (Acute Phase Response) peut être induite et entraîner des modifications des propriétés fonctionnelles des HDL. En effet, sous régime athérogène, comme après l'injection de LDLox ou de phospholipides oxydés, les souris de fond génétique C57BL/6J présentent une diminution de l'activité de la PON et une association des HDL avec l'apoJ qui est une protéine induite par l'APR. Ce phénomène n'est pas observable chez des souris de fond génétique C3H/HeJ, résistantes à l'athérosclérose. Les souris invalidées pour l'apoE qui sont caractérisées par une hyperlipidémie et une susceptibilité à l'athérosclérose présentent également une réduction de l'activité de la PON et une augmentation de l'apoJ. De plus, les HDL issues de ces souris stimulent l'activité chimioattractante des LDLox pour les monocytes (Navab et al., 1997).

Lors d'une phase aiguë de l'inflammation ou d'une inflammation chronique, le contenu lipidique des HDL a tendance à être modifié avec généralement un enrichissement en triglycérides et une déplétion en esters de cholestérol ce qui entraîne une diminution des taux plasmatiques de HDL-cholestérol. L'enrichissement en triglycérides induit des modifications conformationnelles de l'apoA-I qui diminuent les capacités anti-oxydantes des HDL (Kontush and Chapman, 2006a).

En plus du déplacement de sa liaison aux HDL par la SAA et des modifications conformationnelles, l'apoA-I peut subir des modifications sur certains de ses résidus d'acides aminés sous l'action de la MPO (myéloperoxydase). L'enrichissement de l'apoA-I en nitrotyrosines et chlorotyrosines induit une diminution de la capacité d'efflux de cholestérol dépendant d'ABCA1. De plus, il a été montré que la présence dans le plasma de nitrotyrosine et chlorotyrosine au niveau de l'apoA-I est augmentée chez les individus présentant des maladies cardiovasculaires. Ainsi, la MPO en modifiant l'apoA-I génère des HDL dysfonctionnelles (Zheng et al., 2004).

Ainsi, en absence d'inflammation systémique, les HDL ont des propriétés anti-inflammatoires. Cependant en présence d'une APR ou d'une inflammation chronique comme c'est le cas dans l'athérosclérose, les HDL acquièrent également des propriétés pro-inflammatoires.

## **2) Approches thérapeutiques ciblant les HDL**

En raison de leurs différentes propriétés athéroprotectrices (RCT, anti-oxydant, anti-inflammatoire, anti-thrombotique, protection de l'endothélium), les HDL constituent une bonne cible thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires associées.

Différentes études épidémiologiques ont établi qu'un taux de HDL plasmatiques bas (<1.0 mmol/l ou 40 mg/dl) est un facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires. L'étude Framingham de 1970 est la première à révéler que des taux de HDL plasmatiques bas sont associés avec des événements cardiovasculaires défavorables ((Gordon et al., 1977)). Dans cette étude, il a été montré que des taux de HDL plasmatiques inférieurs à 1.03 mmol/l (40 mg/dl) chez l'homme et inférieurs à 1.29 mmol/l (50 mg/dl) chez la femme sont associés avec une augmentation des risques cardiovasculaires. Inversement, des taux de HDL plasmatiques supérieurs à 1.55 mmol/l (> à 60 mg/dl) sont associés avec une réduction des risques cardiovasculaires (Hausenloy and Yellon, 2009). L'analyse de différentes données épidémiologiques suggère qu'une augmentation des taux plasmatiques de HDL de 0.03 mmol/l (1 mg/dl) entraîne une diminution de 2 à 3% du risque cardiovasculaire (Hausenloy and Yellon, 2008). De plus, de récentes études ont montré que chez les patients traités par des statines, les concentrations en HDL restent un facteur prédictif indépendant d'évènements cardiovasculaires (Barter et al., 2007a).

La concentration plasmatique en HDL est donc un facteur important pour la prise en charge cardiovasculaire des patients. Dans cette partie, différentes stratégies et thérapies actuellement disponibles qui augmentent les taux de HDL plasmatiques seront décrites ainsi que les potentielles futures thérapies pouvant augmenter les taux et/ou la fonctionnalité des HDL.

## **2-1) Augmentation des taux de HDL plasmatiques**

Une augmentation des taux de HDL plasmatiques peut être obtenue par des modifications du mode de vie et par différentes approches thérapeutiques plus ou moins efficaces.

### **2-1-1) Stratégies non pharmacologiques**

De simples modifications du mode de vie peuvent induire une augmentation des taux plasmatiques de HDL.

#### **2-1-1-1) L'exercice physique**

Au cours d'un suivi de 8 mois d'une population d'hommes et de femmes de 50 à 65 ans, il a été observé qu'une augmentation de la quantité d'exercice physique induit une augmentation des taux de HDL-cholestérol. Il apparaît qu'une augmentation de la quantité d'exercice physique soit plus importante qu'une augmentation de l'intensité de l'exercice

physique pour induire une meilleure augmentation des taux de HDL-cholestérol (Kraus et al., 2002). Les travaux de Kodama *et al* ont mis en évidence l'existence d'un volume minimal d'exercice pour induire une augmentation significative des taux de HDL-cholestérol. En effet, l'équivalent d'un exercice physique de 120 minutes (soit une dépense d'énergie de 900 kcal) au minimum doit être réalisé hebdomadairement pour induire une augmentation significative des taux de HDL-cholestérol (Kodama et al., 2007).

### **2-1-1-2) La consommation d'alcool**

Les résultats d'une méta-analyse mettent en évidence que la consommation modérée d'alcool (30 g par jour) induit une augmentation des taux de HDL-cholestérol d'environ 4mg/dl et est associée avec une diminution des risques cardiovasculaires d'environ 25% (Rimm et al., 1999). Toutes les formes d'alcool (vin, bière, spiritueux) présentent un effet cardioprotecteur lorsque la prise est modérée (Rimm et al., 1996). L'augmentation des taux de HDL-cholestérol induite par la consommation d'alcool peut s'expliquer par une augmentation de l'efflux de cholestérol cellulaire et de son estérification dans le plasma (van der Gaag et al., 2001).

### **2-1-1-3) La perte de poids**

L'obésité est associée avec des taux plasmatiques bas de HDL-cholestérol et élevés de triglycérides. Il a été observé qu'une perte de poids induite par un régime alimentaire ou par de l'exercice physique induit une augmentation des taux de HDL-cholestérol (Wood et al., 1988). Dans une méta-analyse, il a été mis en évidence que les sujets perdant activement du poids présentent une diminution des taux de HDL-cholestérol mais lorsque leur poids est stabilisé, on observe une augmentation de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol de 0.009 mmol/L pour chaque kilogramme perdu (Dattilo and Kris-Etherton, 1992).

### **2-1-1-4) L'arrêt du tabac**

Une méta-analyse a démontré que les fumeurs ont généralement des taux plus bas de HDL-cholestérol (-5.7%) et d'apoA-I (-4.2%) en comparaison avec des non-fumeurs. De plus, cette association inverse entre la consommation de cigarettes et les taux de HDL-cholestérol est dose-dépendante ; plus le nombre de cigarettes consommées est important, plus le taux plasmatique de HDL-cholestérol est bas (Craig et al., 1989). Dans une méta-analyse plus récente, comprenant 27 études, il a été observé que l'arrêt du tabagisme induit une augmentation des taux de HDL-cholestérol plasmatiques de 0.100 mmol/L sans modification

des autres paramètres plasmatiques (LDL-cholestérol, cholestérol total et triglycérides) (Maeda et al., 2003).

## **2-1-2) Stratégies pharmacologiques courantes**

### **2-1-2-1) Statines**

Les statines sont des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCoA réductase) qui est une enzyme limitante dans la biosynthèse endogène du cholestérol en permettant la réduction de l'HMGCoA en mévalonate. Les statines induisent donc une diminution de la concentration hépatique en cholestérol qui conduit à l'activation de la transcription de différents gènes tels que le LDLR qui est impliqué dans la clairance plasmatique des particules LDL. Ainsi, l'effet principal des statines est de diminuer fortement les concentrations plasmatiques en LDL-cholestérol. La diminution varie entre 27 et 55% en fonction de la molécule et de la dose prescrite (Nicholls et al.). Les statines induisent également une augmentation modérée (de 5 à 10%) des taux de HDL-cholestérol pouvant aller jusqu'à 16% (Barter et al.). L'effet des statines sur les taux de HDL-cholestérol est relativement faible comparé avec l'effet sur les taux de LDL-cholestérol. Cependant, une récente méta-analyse sur un traitement avec des statines démontre que chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires dont le taux de LDL-cholestérol est fortement diminué, une augmentation des taux de HDL-cholestérol de 7.5% est associée avec une régression de l'athérosclérose (Nicholls et al., 2007).

Différents mécanismes sont impliqués dans l'effet des statines sur les taux de HDL-cholestérol. Plusieurs études révèlent que les statines diminuent le transfert de cholestérol ester entre les particules HDL et les particules athérogènes chez des sujets dyslipidémiques (Caslake et al., 2003; Guerin et al., 2000). En effet, Caslake *et al* ont montré qu'une forte dose de Rosuvastatine induit une diminution de 12% de l'activité de la CETP chez des sujets hypercholestérolémiques et de 59% chez des sujets présentant une dyslipidémie mixée associée avec une diminution de la quantité de CETP de 33 à 37% (Caslake et al., 2003). La supériorité de la réduction de l'activité de la CETP observée chez les sujets présentant une dyslipidémie mixée est le reflet d'une forte diminution des lipoprotéines riches en TG notamment les VLDL (-46%) qui sont des particules accepteuses de cholestérol ester. Les travaux de Guérin *et al* révèlent que la diminution de l'activité de la CETP est significativement corrélée avec la diminution des taux de VLDL induite par un traitement avec l'Atorvastatine (Guerin et al., 2000). De plus, l'augmentation des taux de HDL-

cholestérol induite par les statines peut être également attribuée à une augmentation de l'activité de PPAR $\alpha$  qui est responsable de la stimulation de la synthèse de la transcription de l'apoA-I. En effet, les statines induisent une diminution de la production de géranylgeranyl pyrophosphate, un intermédiaire de la biosynthèse du cholestérol, responsable de l'activation de la petite GTPase RhoA qui apparaît être impliquée dans la modulation de l'activité de PPAR $\alpha$  (Martin et al., 2001).

De nombreuses études ont montré un bénéfice majeur des statines sur la mortalité cardio-vasculaire. Une méta-analyse de 14 essais cliniques regroupant plus de 90 000 patients et concernant différentes statines a montré une diminution de 12% de la mortalité toutes causes comprises et de 19% de la mortalité coronarienne par mmol/l en moins de LDL-cholestérol (Baigent et al., 2005). D'autres études sont nécessaires pour déterminer si les effets induits par les statines sur les taux de HDL-cholestérol influencent l'incidence des maladies cardiovasculaires et de la mortalité cardiovasculaire.

### **2-1-2-2) Fibrates**

Les fibrates sont des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$  qui diminuent principalement les taux de triglycérides de 25 à 45% et augmentent les taux de HDL-cholestérol de 10 à 15%. Ils induisent également une diminution des taux de LDL-cholestérol de 10 à 20% (Hausenloy and Yellon, 2008). En mimant la structure des acides gras libres, les fibrates lient PPAR $\alpha$ , un récepteur nucléaire qui régule la transcription de différents gènes. La diminution de la triglycéridémie peut s'expliquer par une augmentation de la lipolyse due à l'induction de l'expression dans le foie de la LPL et l'inhibition de l'expression de l'apoC-III, une apolipoprotéine inhibitrice de la LPL (Schoonjans et al., 1996) (Staels et al., 1995). Les fibrates induisent également l'expression de l'apoA-I et de l'apoA-II humaines, deux principaux composants des particules HDL (Berthou et al., 1996) (Vu-Dac et al., 1995). De plus, il a été observé que les fibrates induisent une augmentation de l'expression de deux protéines impliquées dans l'efflux de cholestérol: CLA-1 (homologue humain de SR-B1) et ABCA1 au niveau des macrophages humains (Chinetti et al., 2000) (Arakawa et al., 2005). Ces différentes régulations peuvent donc expliquer l'effet des fibrates sur l'augmentation des taux de HDL-cholestérol. Les travaux d'Arakawa *et al* ont démontré que l'augmentation de l'expression d'ABCA1 suite à un traitement avec l'acide fénofibrique, une forme active du Fénofibrate, induit une augmentation de l'efflux de cholestérol à partir des macrophages vers l'apoA-I (Arakawa et al., 2005).

L'effet des fibrates sur le développement de l'athérosclérose a été démontré dans l'étude BECAIT (Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial). Dans cette étude, il a été observé qu'un traitement avec le Bezafibrate sur une durée de 5 ans chez des patients souffrant de dyslipidémie induit une diminution de la progression de l'athérosclérose qui peut être en partie attribuée à une augmentation de 9% des taux plasmatiques de HDL<sub>3</sub>-cholestérol (Ericsson et al., 1996; Ruotolo et al., 1998).

De nombreuses études ont été réalisées afin de savoir si cette amélioration du profil lipidique induit par les fibrates est associée à une diminution significative des accidents cardio-vasculaires. Dans l'étude "Helsinki Heart Study", il a été observé une diminution de 34% de l'incidence des maladies cardiovasculaires dans le groupe de patients dyslipidémiques traités en prévention primaire avec le Gemfibrozil en comparaison avec le groupe placebo. Cet effet bénéfique sur l'incidence des maladies cardiovasculaires est à la fois dû à l'augmentation des taux de HDL-cholestérol (+11%) et à la diminution des taux de LDL-cholestérol (-11%) induites par le traitement avec le Gemfibrozil. Un tel traitement induit également une forte diminution des taux de triglycérides (-35%), mais celle-ci n'a qu'un très faible impact sur l'incidence des maladies cardiovasculaires (Manninen et al., 1988). De plus, l'étude VA-HIT (Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial) a révélée que l'administration de Gemfibrozil, en prévention secondaire, réduit de 22% le risque de mort due à une maladie cardiovasculaire et le risque d'infarctus du myocarde, chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires et présentant des taux bas de HDL-cholestérol et de LDL-cholestérol. Ainsi, l'administration de Gemfibrozil apparaît être bénéfique pour des patients coronariens présentant des taux bas de HDL-cholestérol, caractéristique retrouvée fréquemment chez des patients obèses ou diabétiques (Rubins et al., 1999). Cette étude montre également que la réduction de l'incidence des événements coronariens est en partie due à une augmentation de 6% des taux de HDL-cholestérol (Robins et al., 2001).

Cependant, l'effet des fibrates sur l'incidence des événements coronariens est variable. En effet, bien qu'un traitement avec le Bezafibrate chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires et présentant des taux bas de HDL-cholestérol induit une augmentation de 18% des taux de HDL-cholestérol, seulement une tendance à la diminution des événements cardiovasculaires est observée dans l'étude BIP (Bezafibrate Infarction Protection) (2000). Toutefois, un suivi sur 16 ans de cet essai clinique a démontré que les patients ayant répondu au traitement par une forte augmentation des taux de HDL-cholestérol présentent une diminution significative de la mortalité (Goldenberg et al., 2009b). De plus, cet effet

bénéfique de l'augmentation des taux de HDL-cholestérol est plus important quand les taux de LDL-cholestérol sont faibles (Goldenberg et al., 2009a). Ainsi, cette étude met en évidence la nécessité de cibler les différents paramètres lipidiques pour augmenter les bénéfices cliniques d'une thérapie.

Une récente méta-analyse a synthétisé les données de 18 études incluant plus de 45000 individus et concernant différents fibrates: le Clofibrate, le Bezafibrate, le Gemfibrozil, le Fenofibrate et l'Etofibrate et a démontré qu'une thérapie avec des fibrates ne diminue pas la mortalité toutes causes comprises. Toutefois, un traitement avec des fibrates réduit l'incidence des principaux évènements cardiovasculaires en prévenant les évènements coronariens (Jun et al.).

### **2-1-2-3) Acide nicotinique ou Niacine**

La Niacine est reconnue comme étant l'agent pharmacologique utilisé actuellement en thérapeutique responsable des plus fortes augmentations en HDL-cholestérol (jusqu'à 35%). De plus, la Niacine a des effets favorables sur le profil lipidique en diminuant les concentrations des lipoprotéines athérogènes à apoB (moins 20% pour les LDL) et des triglycérides (moins 40-50%). Les données les plus irréfutables supportant l'utilisation de la Niacine proviennent de l'étude "Coronary Drug Project" dans laquelle sont évalués les effets de la Niacine en monothérapie sur 8341 hommes ayant déjà eu un infarctus du myocarde. Après 15 ans de suivi, il a été montré que la Niacine est associée avec une diminution de 11% de la mortalité (toutes causes de mortalité prises en compte) (Canner et al., 1986). Malgré son efficacité clinique et ses effets bénéfiques sur les modifications du profil lipoprotéique plasmatique, l'utilisation de la Niacine est limitée due à son effet secondaire majeur de flush cutané. Des efforts pour diminuer cet effet secondaire ont conduit à une nouvelle préparation de la Niacine : le Niaspan qui correspond à une reformulation de la Niacine à libération prolongée et qui cause moins de flush que les autres formulations (Cefali et al., 2006).

Chez des patients traités agressivement avec les statines pour diminuer les taux de LDL-cholestérol, des taux bas de HDL-cholestérol constituent un facteur prédictif des principaux évènements cardiovasculaires (Barter et al., 2007a). Ainsi, de nombreuses études ont analysé les effets de l'association des statines avec diverses molécules pharmacologiques pouvant diminuer les taux de HDL-cholestérol. Les études ARBITER-2 (Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing cholesterol) et ARBITER-3 ont évalué l'effet du Niaspan (acide nicotinique à libération prolongée) sur l'épaisseur de l'intima-média (IMT : intima-media thickness) carotidienne, qui est un facteur prédictif d'évènements

cardiovasculaires, chez des patients coronariens sous statines présentant des taux de HDL-cholestérol bas (< à 45 mg/dl). Dans l'étude ARBITER-3, il a été montré qu'une association du Niaspan avec des statines sur 2 ans entraîne une régression significative de l'IMT carotidienne et que cet effet est seulement associé à l'augmentation des taux de HDL-cholestérol (Taylor et al., 2006). Ainsi, l'association acide nicotinique/statine induit une régression de l'athérosclérose en augmentant les taux de HDL-cholestérol. Deux études cliniques, AIM-HIGH et HPS2-THRIVE sont actuellement en cours pour confirmer l'effet bénéfique de l'association de l'acide nicotinique avec les statines sur l'incidence des accidents cardiovasculaires.

Récemment, de nouvelles études ont permis d'apporter des précisions sur le mode d'action de la Niacine. Il semblerait que la Niacine module les taux plasmatiques en triglycérides et en lipoprotéines contenant de l'apoB *via* deux mécanismes :

- la modulation de la synthèse de triglycérides par le foie qui induit une augmentation de la dégradation intracellulaire de l'apoB. En effet, Ganji *et al* ont montré dans un modèle *in vitro* que la Niacine inhibe l'activité de la DGAT2 (Diacylglycerol AcylTransferase 2), une enzyme clé de la synthèse des triglycérides au niveau de l'hépatocyte. Cette inhibition induit une augmentation de la dégradation de l'apoB intracellulaire et une diminution de sa sécrétion (Ganji et al., 2004; Jin et al., 1999). Cependant, ce mécanisme reste à être démontré *in vivo*.

- la modulation de la lipolyse des triglycérides dans le tissu adipeux. Il a été montré par des études *in vitro* que l'activation de HM74, le récepteur de haute affinité pour la Niacine, diminue l'hydrolyse du triacylglycérol en acides gras libres dans des adipocytes (Tunaru et al., 2003; Zhang et al., 2005b). De plus, Tunaru *et al* ont montré l'absence d'effet de la Niacine sur les taux plasmatiques d'acides gras libres dans des souris invalidées pour PUMA-G (HM74 chez la souris). Alors qu'un traitement avec la Niacine chez des souris sauvages placées sous régime enrichi en graisses induit une diminution de 30% des taux plasmatiques de triglycérides, aucun effet de la Niacine n'est observé chez des souris PUMA-G<sup>-/-</sup> (Tunaru et al., 2003). Cette étude suggère donc que, chez la souris, la Niacine, *via* son récepteur PUMA-G, mobilise les acides gras au niveau du tissu adipeux, ce qui induit une diminution de leur disponibilité hépatique pour la synthèse des triglycérides. Cependant chez l'homme, il est observé que la Niacine entraîne seulement une baisse transitoire du taux plasmatique d'acides gras libres suivie d'un rebond. Ainsi, cette voie ne semble pas être physiologiquement majeure chez l'homme pour induire les modifications des profils plasmatiques de la Niacine (Kamanna and Kashyap, 2008).

Concernant les effets sur les taux plasmatiques de HDL-cholestérol, il semblerait que la Niacine diminue le catabolisme de l'apoA-I. Cet effet pourrait s'expliquer par les travaux de Zhang *et al* qui montrent sur des cellules d'hépatocarcinome humain en culture (HepG<sub>2</sub>) que la Niacine est responsable d'une diminution de l'expression de surface de la chaîne  $\beta$  de l'ATP synthase qui se traduit par une diminution de la captation des HDL radiomarquées sur la partie protéique avec l'iode 125 (Zhang et al., 2008). Cet effet de la Niacine sur l'expression de la chaîne  $\beta$  de l'ATP synthase reste toutefois à être démontré *in vivo*. D'autre part, alors que la Niacine induit une augmentation des taux plasmatiques de HDL-cholestérol chez des souris apoE\*3Leiden exprimant la CETP, aucun effet de la Niacine sur les taux de HDL n'est observé chez de simples souris apoE\*3Leiden. Il a été montré chez ces souris apoE\*3Leiden exprimant la CETP que l'augmentation des taux plasmatiques de HDL-cholestérol et d'apoA-I est due à une diminution de l'expression hépatique de la CETP. Il semblerait donc que l'effet de la Niacine sur les taux de HDL-cholestérol passe par une inhibition de la CETP (cf. paragraphe 2-1-3-2) (van der Hoorn et al., 2008).

### **2-1-3) Nouvelles stratégies pharmacologiques**

#### **2-1-3-1) Augmentation des taux d'apoA-I**

Deux mécanismes peuvent induire l'augmentation des taux d'apoA-I : l'augmentation de la production d'apoA-I et la diminution de son catabolisme. De nombreuses données chez l'animal démontrent qu'une surexpression du gène de l'apoA-I humaine augmente les taux d'apoA-I et de HDL-cholestérol et peut même induire la régression de la plaque d'athérome dans certaines conditions (Plump et al., 1994) (Tangirala et al., 1999).

#### **Augmentation de la production d'apoA-I :**

Les agonistes de PPAR $\alpha$  tels que les fibrates sont des agents pharmacologiques qui régulent la transcription de l'apoA-I. Cependant, les fibrates actuellement disponibles (Fénofibrate et Gemfibrozil) sont de faibles agonistes de PPAR $\alpha$  et leurs effets sur les taux plasmatiques de HDL sont généralement faibles. Dans le but d'obtenir des effets plus importants, différents agonistes de PPAR $\alpha$  plus puissants ont été développés.

Le LY518674, un agoniste des PPAR $\alpha$  plus spécifique et plus puissant que le Fénofibrate, induit une augmentation des taux de HDL-cholestérol plus importante que le Fénofibrate chez des souris surexprimant l'apoA-I humaine (Singh et al., 2005). Dans une

étude de dose-réponse chez l'homme, il a été montré que le LY518674, de façon similaire aux fénofibrates, diminue les taux plasmatiques de triglycérides. Le LY518674 augmente également les taux plasmatiques de HDL-cholestérol et d'apoA-I au même titre que les fénofibrates mais seulement à de faibles doses (Nissen et al., 2007a). De façon intéressante, Millar *et al* ont montré qu'à de fortes doses, le LY518674 entraîne une augmentation de la production et du catabolisme de l'apoA-I qui se traduit par des taux plasmatiques d'apoA-I et de HDL-cholestérol inchangés (Millar et al., 2009). L'augmentation du catabolisme de l'apoA-I pourrait être la résultante d'une augmentation du RCT mais ceci reste à être démontré. Bien que le LY518674 soit un agoniste plus spécifique et plus puissant que le Fénofibrate, le LY518674 ne produit pas plus d'effets favorables sur les taux de HDL-cholestérol. De plus, un traitement avec le LY518674 est associé avec différents effets défavorables tels qu'une augmentation de la concentration en créatinine sérique et du LDL-cholestérol (Nissen et al., 2007a). Un autre agoniste de PPAR $\alpha$  est en cours de développement : le CP-778,875. Il a été montré que ce composé augmente les taux de HDL-cholestérol de 14% et diminue la triglycéridémie de 26% chez des patients diabétiques avec une dyslipidémie athérogène. Ce composé a l'avantage de ne pas avoir d'effets défavorables sur les taux de créatinine sérique et de LDL-cholestérol (Terra et al., 2008).

Récemment, dans des études *in vitro* sur des cellules HepG<sub>2</sub>, il a été montré qu'un traitement avec le RVX-208, une petite molécule stimulatrice de la transcription de l'apoA-I, induit une augmentation de la production d'apoA-I qui est associée à une augmentation des taux de pré $\beta$ -HDL et de particules naissantes larges migrant en  $\alpha$ . De façon similaire, *in vivo*, un traitement de 63 jours avec le RVX-208 chez des singes induit une augmentation des taux d'apoA-I (+60%) et de HDL-cholestérol (+97%) qui est associée à une augmentation de l'activité d'efflux par ABCA1, ABCG1 et SR-B1. Dans cette même étude, il a également été montré qu'un traitement de 7 jours avec le RVX-208 chez l'homme augmente les taux d'apoA-I (+10%), de pré $\beta$ -HDL (+42%) et la fonctionnalité des HDL à induire l'efflux de cholestérol (+11%) (Bailey et al.). De plus, des essais de phase I et II avec le RVX-208 ont montré que non seulement la molécule est sûre et bien tolérée mais aussi qu'elle entraîne chez les sujets sains une augmentation des taux de HDL-cholestérol (McNeill). Ces résultats sont prometteurs mais des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si cette molécule peut induire la régression des plaques *via* l'amélioration du profil lipoprotéique.

L'expression de l'apoA-I est également régulée positivement par le récepteur nucléaire LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1) et négativement par le FXR, ce qui fait du LRH-1 et du

FXR des cibles thérapeutiques potentielles pour augmenter les taux d'apoA-I (Claudel et al., 2005; Delerive et al., 2004).

**Diminution du catabolisme de l'apoA-I :**

La lipase endothéliale, liée aux cellules endothéliales, qui hydrolyse les phospholipides associés aux HDL pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour l'augmentation des taux d'apoA-I et de HDL-cholestérol. En effet, la surexpression hépatique de la LE induit une diminution des taux plasmatiques en phospholipides, HDL-cholestérol et apoA-I accompagnée d'une formation de HDL de petites tailles pauvres en lipides et d'un catabolisme accéléré de l'apoA-I radiomarquée issue des HDL par le foie et les reins. Maugeais *et al* suggèrent donc que la LE déplete les particules HDL en phospholipides ce qui déstabilise l'apoA-I et induit sa dissociation et son catabolisme par les reins (Maugeais et al., 2003). Inversement, l'inhibition de la LE par injection d'anticorps inhibiteurs de la LE induit une augmentation significative des taux plasmatiques de HDL-cholestérol, phospholipides et apoA-I chez des souris transgéniques exprimant l'apoA-I humaine (modèle murin proche de l'homme au niveau de l'hétérogénéité des HDL) (Jin et al., 2003). De plus, l'inactivation de la LE chez des souris invalidées pour l'apoE induit une augmentation des taux plasmatiques de HDL-cholestérol mais également des taux de lipoprotéines à apoB. Malgré ce profil lipidique, les souris apoE<sup>-/-</sup> invalidées pour la LE présentent une diminution significative de la taille des lésions qui peut s'expliquer par une augmentation des taux de HDL-cholestérol et une diminution de l'infiltration des monocytes dans l'espace sous-endothélial (Ishida et al., 2004). Les travaux de Badellino *et al* ont mis en évidence que les concentrations plasmatiques en LE sont associées négativement avec les concentrations plasmatiques en HDL-cholestérol et positivement avec le développement de l'athérosclérose (Badellino et al., 2006). De plus, des mutations perte de fonction dans le gène de la LE, chez l'homme, sont associées avec une augmentation des taux de HDL-cholestérol (Edmondson et al., 2009). Ainsi, l'inhibition pharmacologique de la LE pourrait donc être une nouvelle stratégie pour augmenter les taux de HDL-cholestérol en diminuant le catabolisme de l'apoA-I.

**Infusion d'apoA-I et de HDL:**

Une autre alternative pour augmenter les taux d'apoA-I et de HDL est de directement infuser de l'apoA-I ou des HDL natives ou reconstituées (HDLr) dans la circulation. Des études chez le lapin, placé sous régime athérogène, ont montré que des infusions de HDL natives étaient associées à une diminution et même une régression du développement de la

plaque d'athérome (Badimon et al., 1990). Les travaux de Nicholls *et al* ont également montré que l'administration de HDLr, au même titre que les HDL natives, diminue la taille des lésions d'environ 35% chez des lapins placés sous régime athérogène et augmente la stabilité de la plaque en augmentant le nombre de CMLs et en diminuant le nombre de macrophages au niveau de la lésion. Nicholls *et al* ont également montré dans cette étude que la composition en phospholipides et en apolipoprotéines influence les effets bénéfiques des HDL sur la taille et la stabilité de la plaque (Nicholls et al., 2005).

Différentes études précliniques chez l'homme ont ensuite été réalisées pour étudier les effets d'infusion d'apoA-I ou de HDLr. Ainsi, il a été montré qu'une simple infusion d'une durée de 4 heures de HDLr (apoA-I complexée avec de la phosphatidylcholine) chez des patients sains induit une augmentation au cours de l'infusion des taux plasmatiques en apoA-I et phospholipides. L'augmentation des taux d'apoA-I est principalement dans la fraction HDL correspondant aux particules migrant en pré $\beta$  et est associée à une augmentation en parallèle du taux de HDL-cholestérol non estérifié. Une fois l'infusion terminée, il a été observé une diminution de ces différentes concentrations accompagnée d'une augmentation des taux de HDL-cholestérol ester et de HDL migrant un  $\alpha$  qui résulte probablement de la conversion des pré $\beta$ -HDL par la LCAT. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'infusion de HDLr est capable de stimuler le RCT en induisant la production de pré $\beta$ -HDL qui est associée à une augmentation de l'efflux et de l'estérification du cholestérol (Nanjee et al., 1999). Une étude chez des patients souffrant d'une hypercholestérolémie familiale montre une stimulation du RCT après infusion d'une pro-apolipoprotéineA-I (pro-apoA-I) humaine recombinante. La pro-apoA-I est la forme sécrétée de l'apoA-I qui mature en apoA-I après clivage d'une proséquence hexapeptidique par des protéases. Il a été montré que l'administration unique par voie intraveineuse de complexes liposomiques contenant la pro-apoA-I humaine induit une augmentation transitoire des taux d'apoA-I et de HDL-cholestérol pendant les premières 24h après l'injection. De plus, une augmentation de l'excrétion fécale des stérols neutres (+ 39%) et des acides biliaires (+30%) a été observée chez les patients traités avec les HDLr (Eriksson et al., 1999). Ainsi, ces différents résultats suggèrent donc que l'infusion de HDLr ou d'apoA-I peuvent stimuler le RCT.

Dans l'essai clinique ERASE (Effect of rHDL on Atherosclerosis Safety and Efficacy), l'effet d'infusions hebdomadaires pendant 4 semaines de CSL-111, apoA-I complexée avec de la phosphatidylcholine, sur le développement de l'athérosclérose a été étudié. Dans cet essai, une diminution de 3.4% du volume de la plaque après traitement avec le CSL-111 a été observée mais cette diminution n'est pas significativement différente par rapport au groupe

placebo qui présente une diminution de 1.6%. Cependant le volume de la plaque est significativement plus petit par rapport au volume de la plaque avant le début du traitement avec le CSL-111 (Tardif et al., 2007) (cf. paragraphe 2-2-2: apoA-I Milano (Nissen et al., 2003)). Ces résultats surprenants montrent donc qu'une régression rapide de la plaque qui met plusieurs années pour se développer est possible en seulement quelques administrations de molécules actives. L'utilisation de HDLr semble donc être une stratégie efficace pour le traitement de l'athérosclérose. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer les effets de telles infusions sur la survenue d'événements cliniques associés à l'athérosclérose.

### **2-1-3-2) Inhibiteurs de la CETP**

La CETP est une protéine plasmatique qui assure le transfert de cholestérol ester à partir des particules HDL aux lipoprotéines contenant l'apoB (LDL et VLDL) en échange de triglycérides. La CETP induit donc un profil lipidique pro-athérogène avec une déplétion des HDL en cholestérol ester et en parallèle un enrichissement des lipoprotéines à apoB en cholestérol ester. L'intérêt pour l'inhibition de la CETP a débuté après la découverte en 1990 d'individus japonais qui présentent des taux très élevés de HDL-cholestérol associés à une déficience génétique pour la CETP (Inazu et al., 1990). Cette association génétique conduit naturellement au concept qu'une inhibition pharmacologique de la CETP pourrait être une nouvelle approche thérapeutique pour augmenter les taux de HDL-cholestérol. Bien que les effets de la déficience en CETP sur les risques cardiovasculaires ne soient pas très clairs, la CETP a suscité l'intérêt des laboratoires pharmaceutiques qui ont développé des composés pharmacologiques susceptibles de l'inhiber dans l'objectif d'augmenter les taux plasmatiques de HDL-cholestérol. À ce jour, trois inhibiteurs ont atteint le stade de développement clinique: l'Anacetrapib, le Torcetrapib et le Dalcetrapib (ou JTT-705).

Il a été montré qu'un traitement avec le Torcetrapib pendant 16 semaines à des doses suffisantes pour augmenter les taux de HDL-cholestérol d'un facteur 3 induit une diminution du développement de l'athérosclérose de 60% chez des lapins placés sous régime athérogène. Dans cette étude le développement de la plaque est associé positivement avec le ratio "concentration cholestérol total/concentration HDL-cholestérol" (Morehouse et al., 2007).

Dans une première étude clinique chez des sujets sains, un traitement sur 2 semaines avec 60 mg de Torcetrapib, dose utilisée dans les études suivantes, induit une augmentation de 62% des concentrations plasmatiques en HDL-cholestérol et une diminution des taux de LDL-cholestérol de 11%. Ces changements sont accompagnés d'une inhibition de 35% de

l'activité de la CETP et d'une augmentation de la concentration en CETP (Clark et al., 2004). Malgré ces effets bénéfiques sur le profil lipidique, le développement du Torcetrapib a été arrêté en fin 2006 en Phase III de l'étude ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact IN ATtherosclerosis Events) en raison d'une surmortalité. Dans cette étude ILLUMINATE, conduite sur plus de 15000 patients à haut risque cardiovasculaire, bien que la combinaison thérapeutique Torcetrapib + Atorvastatine sur 12 mois induit une augmentation de 72% des taux de HDL-cholestérol et une diminution de 25% des taux de LDL-cholestérol, il a été observé une augmentation de la mortalité toutes causes confondues (événements cardiovasculaires, cancers, infections...) en comparaison avec le groupe traité seulement avec l'Atorvastatine (Barter et al., 2007b). Chez ces patients traités avec la combinaison Torcetrapib + Atorvastatine, une augmentation de la pression artérielle, une diminution de la concentration sérique en potassium ainsi qu'une augmentation des concentrations sériques en sodium, bicarbonate et aldostérone ont été observées. Une analyse *post hoc* de cette étude a montré que le risque de mort est augmenté chez les patients traités avec le Torcetrapib présentant une forte diminution de la concentration en potassium ou une forte augmentation de la concentration en bicarbonate (Barter et al., 2007a).

L'étude ILLUSTRATE (Investigation of Lipid Level Management Using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis by CETP Inhibition and HDL Elevation) a mis en évidence que la majorité des patients traités avec le Torcetrapib ne présente pas de régression de l'athérosclérose. Toutefois, une régression de l'athérosclérose est observée chez les patients présentant les plus fortes augmentations des taux de HDL-cholestérol, suggérant donc que les HDL générées suite à l'inhibition de la CETP sont fonctionnelles (Nissen et al., 2007b) (Nicholls et al., 2008). Des études *in vitro* avec des HDL issues de patients traités avec le Torcetrapib ont confirmé la fonctionnalité des HDL. En effet, les HDL issus de patients sous Torcetrapib (120mg/jour) sont plus efficaces pour promouvoir l'efflux de cholestérol à partir de macrophages chargés (Yvan-Charvet et al., 2007). L'ensemble de ces études suggère donc que les effets négatifs induits par le Torcetrapib ne seraient pas dus à l'inhibition de la CETP mais plutôt aux effets secondaires de la molécule sur la pression artérielle et les concentrations en électrolytes. Forrest *et al* ont démontré *in vivo* chez le rat que les effets du Torcetrapib sur la pression artérielle et la libération de l'aldostérone et de la corticostérone ne sont pas dus à l'inhibition de la CETP, l'Anacetrapib n'ayant pas d'effet sur ces deux paramètres (Forrest et al., 2008). Ainsi, ces résultats n'excluent pas la possibilité qu'un autre composé inhibiteur de la CETP, tel que l'Anacetrapib ou le Dalcetrapib, pourrait avoir des bénéfices sur les risques cardiovasculaires associés à l'athérosclérose.

Les études chez l'animal, plus précisément chez le lapin placé sous régime athérogène, ont montré que l'administration de Dalcetrapib induit une diminution de 70% de la progression de l'athérosclérose (Okamoto et al., 2000). Dans une étude regroupant 198 patients avec une légère hyperlipidémie, un traitement de 4 semaines avec 900mg de Dalcetrapib induit une augmentation de 34% des taux de HDL-cholestérol et une diminution de 7% des taux de LDL-cholestérol. De plus, cette étude a également montré la bonne tolérance de ce composé (de Grooth et al., 2002). Des études sont en cours afin de déterminer si l'amélioration du profil lipidique induite par le Dalcetrapib se traduit par une réduction des risques cardiovasculaires (essai dal-OUTCOMES).

L'Anacetrapib qui possède des propriétés structurales proches du Torcetrapib semble être un composé plus puissant pour induire l'augmentation des taux de HDL-cholestérol. Dans une étude de phase I, il a été observé chez des sujets dyslipidémiques, après un traitement de 28 jours avec l'Anacetrapib, une augmentation de 129% des taux de HDL-cholestérol et une diminution de 38% des taux de LDL-cholestérol (Krishna et al., 2007). En plus d'induire une augmentation plus importante des taux de HDL, cette étude a montré qu'un traitement avec l'Anacetrapib n'entraîne pas d'augmentation de la pression artérielle, contrairement au Torcetrapib. Comme pour le Dalcetrapib, des études complémentaires sont nécessaires pour vérifier les effets de l'Anacetrapib sur les risques cardiovasculaires.

#### **2-1-4) L'augmentation des taux plasmatiques de HDL est-elle vraiment la bonne stratégie?**

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence que la concentration plasmatique en HDL-cholestérol est inversement corrélée avec l'incidence des maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose (Gordon et al., 1989; Gordon et al., 1977). Une des premières études démontrant le bénéfice d'augmenter les taux de HDL-cholestérol est l'étude "Helsinki heart study" dans laquelle il a été montré qu'un traitement avec le Gemfibrozil augmente les taux de HDL-cholestérol de 11% et diminue la concentration plasmatique en cholestérol total de 10%, les taux de LDL-cholestérol de 11% et les taux de triglycérides de 35%. Cette modification du profil lipidique est accompagnée d'une diminution des risques cardiovasculaires chez les patients traités avec le Gemfibrozil. La plus importante réduction du risque cardiovasculaire a été observée chez les patients qui au début de l'étude avaient des taux de HDL-cholestérol bas et de triglycérides élevés (Manttari et al., 1990).

Cependant, dans certaines conditions, des taux plasmatiques bas de HDL-cholestérol ne sont pas associés avec une augmentation des risques cardiovasculaires. En effet, Frikke-

Schmidt *et al* ont montré que des taux plasmatiques de HDL-cholestérol faibles dus à une hétérozygotie pour des mutations perte de fonction de ABCA1 ne sont pas associés avec une augmentation des risques de développer une cardiopathie ischémique (Frikke-Schmidt *et al.*, 2008). Un autre exemple concerne les personnes porteuses de la mutation apoA-1 Milano qui sont caractérisées par des taux plasmatiques très bas de HDL-cholestérol non associés avec une augmentation des risques cardiovasculaires (Franceschini *et al.*, 1980). Ces études suggèrent donc que des facteurs autres que le taux de HDL-cholestérol sont importants pour prédire les accidents cardiovasculaires.

Les travaux de Ansell *et al* ont montré la possibilité de séparer des patients atteints de maladies cardiovasculaires d'individus sains en évaluant les propriétés inflammatoires/anti-inflammatoires des HDL. Dans cette étude, les propriétés inflammatoires/anti-inflammatoires des HDL sont de meilleurs facteurs prédictifs des maladies cardiovasculaires que les taux de HDL-cholestérol. En effet, dans un groupe de 26 patients atteints de maladies cardiovasculaires, seulement 3 ont un taux anormalement bas de HDL-cholestérol alors que 20 patients sur 26 ont des HDL pro-inflammatoires. Dans le groupe contrôle, les 26 individus ont des HDL anti-inflammatoires (Ansell *et al.*, 2003).

De plus, des études chez la souris démontrent que la stimulation du RCT est plus athéroprotectrice que l'augmentation des taux plasmatiques de HDL-cholestérol. Une augmentation des taux de HDL-cholestérol induite par une diminution du catabolisme des HDL n'est pas athéroprotectrice. En effet, les souris invalidées pour SR-B1 et l'apoE qui sont caractérisées par une concentration élevée en HDL-cholestérol due à une diminution du catabolisme des HDL présentent une augmentation de l'incidence de l'athérosclérose (Trigatti *et al.*, 1999). À l'inverse, une surexpression de SR-B1 protège les souris de l'athérosclérose malgré une diminution significative des taux de HDL-cholestérol (Kozarsky *et al.*, 2000).

Ainsi, ces études mettent en évidence que le taux plasmatique de HDL-cholestérol n'est pas le seul déterminant pour le rôle athéroprotecteur des HDL. La fonctionnalité des HDL (transport retour du cholestérol, fonction anti-inflammatoire...) est indépendante de la concentration en HDL et est aussi importante, voire plus importante, pour évaluer les capacités athéroprotectrices des HDL.

## **2-2) Amélioration de la fonctionnalité des HDL**

### **2-2-1) Peptide mimétique de l'apoA-I**

L'apoA-I est la principale apolipoprotéine constituant les HDL. Elle est constituée de 243 acides aminés arrangés en 10 hélices amphipathiques. Grâce à ses propriétés de captation du cholestérol et de phospholipides cellulaires ainsi que grâce à ses propriétés anti-oxydantes, comme nous l'avons vu précédemment, l'apoA-I constitue un facteur athéroprotecteur majeur. Cependant, la protéine entière est non seulement difficile et coûteuse à synthétiser mais ne peut être administrée que par voie intraveineuse. Ainsi, de nombreuses recherches se sont concentrées sur le développement de petits peptides mimétiques de l'apoA-I pouvant être administrés par voie orale. Ces recherches ont abouti à la synthèse de différents peptides de 18 acides aminés qui ne présentent aucune homologie de séquence avec l'apoA-I mais qui ont la capacité de former des hélices amphipathiques de classe A qui miment la liaison de l'apoA-I sur les lipides.

Garber *et al* ont été les premiers à démontrer qu'un peptide mimétique peut inhiber le développement de l'athérosclérose *in vivo*. Ils ont observé que l'administration quotidienne par voie intraveineuse du peptide mimétique 5F, pendant 16 semaines, chez des souris C57BL/6J placées sous régime athérogène induit une diminution significative de la taille des lésions athéromateuses sans modifications majeures du profil lipidique. De plus, il a été montré que les HDL issues des souris traitées avec le 5F, contrairement aux HDL contrôles, ont la capacité d'inhiber l'oxydation des LDL et de prévenir le chimiotactisme des monocytes induit par les LDL dans une co-culture de cellules de la paroi artérielle. Le traitement avec le 5F a donc permis de maintenir les fonctions anti-inflammatoires des HDL en conditions de régime athérogène, ce qui pourrait expliquer en partie l'effet sur le développement de l'athérosclérose (Garber et al., 2001).

Dans le but de faciliter l'administration des peptides mimétiques de l'apoA-I, le composé D-4F qui peut être administré oralement a été synthétisé et est actuellement en cours de développement clinique. Le D-4F est un peptide de 18 acides aminés dont la séquence diffère du 5F mentionné précédemment par seulement un résidu phénylalanine en moins. De plus, le D-4F est constitué par seulement des D-acides aminés qui lui confèrent une résistance à la dégradation par les peptidases gastrointestinales (Navab et al., 2002). Il a été montré que l'administration orale de D-4F entraîne une diminution très importante du développement de l'athérosclérose (environ -75%) dans des modèles de souris susceptibles à l'athérosclérose (ApoE<sup>-/-</sup> ou LDLR<sup>-/-</sup>) sans modification du profil lipidique. De façon similaire au 5F, un

traitement avec le D-4F permet de modifier les HDL de ces souris en HDL anti-inflammatoires qui peuvent ainsi inhiber le chimiotactisme des monocytes induit par les LDL (Navab et al., 2002). Les travaux de Van Lenten *et al* montrent que le peptide D-4F lie les phospholipides et les acides gras insaturés oxydés avec une très forte affinité (Van Lenten et al., 2008). Ces propriétés du peptide mimétique à lier les lipides oxydés pro-inflammatoires pourraient expliquer les effets athéroprotecteurs induits par un traitement avec le D-4F. De plus, des études ultérieures, chez des souris apoE<sup>-/-</sup> ou sauvages, ont permis de montrer qu'une simple administration de D-4F stimule la formation de pré $\beta$ -HDL, l'activité de la paraoxonase associée aux HDL et stimule également le transport retour du cholestérol à partir de macrophages chargés en cholestérol, *in vivo* (Navab et al., 2004). Ces deux propriétés (anti-oxydante et promotion du transport retour du cholestérol) du D-4F peuvent donc être responsables de son effet protecteur sur le développement de l'athérosclérose.

Un premier essai clinique chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires a montré la tolérance et la biodisponibilité du D-4F chez l'homme. Bien que la biodisponibilité de ce peptide soit faible, les HDL isolées des patients traités ont une meilleure activité anti-inflammatoire (Bloedon et al., 2008). De plus, une étude chez la souris et le singe a montré la synergie possible entre le peptide D-4F et les statines. En effet, à des doses de D-4F et de Pravastatine inefficaces en monothérapie, il a été observé une synergie remarquable entre les deux composés qui se traduit par une augmentation des taux de HDL-cholestérol, d'apoA-I, ainsi qu'une potentialisation de l'activité paraoxonase et des propriétés anti-inflammatoires des HDL. L'association D-4F/Pravastatine prévient la formation des lésions chez les animaux jeunes et induit également la régression de lésions établies chez des animaux plus âgés (Navab et al., 2005). Cette étude est donc encourageante pour le développement de combinaisons thérapeutiques de statines avec des peptides mimétiques de l'apoA-I.

Des études récentes ont commencé à étudier l'effet de l'association de 2 peptides mimétiques en tandem. L'étude *in vitro* de peptides tandems composés de 2 peptides 4F liés par différents acides aminés (proline ou alanine) a montré que les tandems sont plus efficaces que le simple peptide 4F pour déplacer l'apoA-I et l'apoE à partir de HDL de souris et promouvoir l'efflux de cholestérol à partir de macrophages chargés en cholestérol. Toutefois, le peptide 4F est le seul capable de diminuer l'oxydation des LDL (Wool et al., 2008). Il semblerait donc que les peptides tandems soient moins efficaces pour protéger les LDL de l'oxydation mais plus efficaces pour remodeler les HDL et pour promouvoir l'efflux de cholestérol par rapport au peptide simple, suggérant donc que ces tandems de peptides pourraient stimuler plus efficacement le RCT. Cependant, des études complémentaires sont

nécessaires pour vérifier l'efficacité de ces tandems de peptides *in vivo* sur le RCT et le développement de l'athérosclérose.

### **2-2-2) Infusion d'apoA-I Milano**

L'apoA-I Milano (apoA-IM) est une forme mutante de l'apoA-I caractérisée par la substitution d'une arginine en position 173 par une cystéine. Cette mutation a été découverte dans un petit village d'Italie du nord chez trois membres d'une même famille qui présentaient des taux de HDL-cholestérol et d'apoA-I très bas et un taux plasmatique de triglycérides élevé. Remarquablement, malgré ce profil lipidique fortement athérogène, aucun membre de la famille ne souffre de maladies cardiovasculaires (Franceschini et al., 1980). La substitution de l'arginine par la cystéine induit une altération des propriétés fonctionnelles de l'apoA-I mutée comparée à la protéine normale, qui conduit à la formation de dimères liés par un pont disulfure avec une autre apoA-IM (apoA-IM/apoA-IM) ou avec l'apoA-II (apoA-IM/apoA-II) (Weisgraber et al., 1980). Le catabolisme de cette apoA-IM sous forme monomérique est très rapide comparé avec l'apoA-I normale, ce qui peut expliquer les taux anormalement bas en HDL-cholestérol et apoA-I chez les porteurs de cette mutation (Roma et al., 1993). Dans l'étude « Limone sul Garda », il a été montré que en comparaison avec des sujets présentant le même niveau d'hypoalphalipoprotéïnémie (moyenne [HDL]=28 mg/dl), les porteurs de la mutation apoA-IM ont une plus faible prévalence de l'athérosclérose (57% versus 33%) et une plus faible épaisseur maximale de l'intima/media au niveau de la carotide (1,8 mm versus 0,9 mm) (Sirtori et al., 2001). Ces données suggèrent donc que l'apoA-IM confère une athéroprotection.

Différentes études chez l'animal ont confirmé le rôle athéroprotecteur de l'apoA-IM. En effet, Shah *et al* ont observé que des injections intraveineuses répétées d'apoA-IM complexée avec de la phosphatidylcholine préviennent la progression de l'athérosclérose malgré une sévère hypercholestérolémie persistante chez des souris invalidées pour l'apoE placées sous régime enrichi en cholestérol. De plus, un tel traitement est associé avec une modification favorable de la composition de la plaque (diminution du contenu en lipides et macrophages) (Shah et al., 1998). Quelques années plus tard, la même équipe a observé des résultats similaires suite à une simple injection d'une forte dose d'apoA-IM complexée avec du dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) chez des souris invalidées pour l'apoE. Cette forte dose d'apoA-IM induit une rapide mobilisation du cholestérol présent dans les tissus qui se traduit par une forte augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol libre. De plus, des analyses histologiques ont révélé une diminution des contenus en lipides et

macrophages au niveau de la plaque, seulement 48 heures après l'injection (Shah et al., 2001). Ces résultats suggèrent donc que cette stratégie pourrait rapidement modifier la composition de la plaque vers un phénotype plus stable. Ibanez *et al* ont également observé une régression de la plaque accompagnée d'une diminution de la densité des macrophages et de l'expression de marqueurs de la vulnérabilité de la plaque tels que le facteur tissulaire et MCP-1 chez le lapin suite à deux injections d'ETC-216 (apoA-IM complexée avec des phospholipides) (Ibanez et al., 2008).

Une étude chez l'homme a permis d'évaluer l'impact de l'ETC-216 sur le volume des plaques d'athérome chez des patients souffrant de syndrome coronarien aigu. Un traitement de cinq semaines par perfusion hebdomadaire d'ETC-216, dans les deux semaines suivant le syndrome coronarien aigu, induit une réduction du volume de la plaque d'athérome de 4,2% par rapport au volume initial. Inversement, les plaques des patients traités par placebo ont augmenté de taille (Nissen et al., 2003). Cependant, cette étude a été menée sur une population réduite; des essais cliniques complémentaires incluant plus de patients et l'incidence des accidents cardiovasculaires doivent donc être réalisés pour confirmer ces résultats prometteurs.

Le fait que même à des concentrations faibles de HDL, l'apoA-IM induit une athéroprotection pourrait s'expliquer par la capacité de l'apoA-IM à produire des HDL plus efficaces dans le processus de transport retour du cholestérol. À ce jour, il existe différents résultats contradictoires sur ce sujet. En effet, Favari *et al* ont montré que les sérums issus de patients porteurs de l'apoA-IM sont plus efficaces que des sérums de patients contrôles, *in vitro*, pour induire l'efflux de cholestérol *via* ABCA1 (Favari et al., 2007). À l'inverse, Weibel *et al* ont montré que des HDL issues de souris exprimant l'apoA-IM sont aussi efficaces que les HDL issues de souris exprimant l'apoA-I humaine pour induire l'efflux de cholestérol *in vitro* (Weibel et al., 2007). De plus, des souris surexprimant l'apoA-I ou l'apoA-IM humaines dans des conditions permettant d'obtenir des taux de HDL-cholestérol similaires ne présentent pas de différences au niveau du RCT. En effet, par rapport à des souris invalidées pour l'apoA-I, ces deux groupes de souris présentent une augmentation similaire de la quantité de cholestérol radiomarqué présent dans les fèces 48 heures après l'injection de macrophages chargés en cholestérol radiomarqué (Alexander et al., 2009). Ainsi, il semblerait que chez la souris si l'apoA-IM est plus athéroprotectrice que l'apoA-I, ce ne soit pas attribuable à une augmentation du processus de transport retour du cholestérol. Des essais cliniques chez l'homme visant à étudier les effets sur le développement de la plaque suite à

des infusions d'apoA-I ou d'apoA-IM devraient permettre de comparer les effets athéroprotecteurs entre ces deux formes d'apoA-I.

Les travaux de Bielicki *et al* montrent que l'apoA-IM possède une puissante activité anti-oxydante en empêchant l'oxydation de phospholipides par la lipoxygénase, alors que l'apoA-I est faiblement active (Bielicki and Oda, 2002). De plus, il a été montré que les HDL isolées de patients porteurs de la mutation apoA-IM sont plus efficaces que des HDL issues de patients contrôles pour stimuler l'expression et l'activation de la eNOS par les cellules endothéliales et pour réguler négativement l'expression de VCAM-1 induite par le TNF $\alpha$  (Gomaschi et al., 2007). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère donc que l'athéroprotection associée à l'apoA-IM pourrait être due en partie à la capacité de l'apoA-IM à inhiber la formation de médiateurs pro-inflammatoires tels que les phospholipides oxydés ainsi qu'à maintenir l'homéostasie endothéliale. Ces différentes études mettent donc en évidence que l'infusion d'apoA-IM représente une bonne stratégie pour le traitement de l'athérosclérose chez l'homme. Cependant, des études cliniques complémentaires sont nécessaires pour évaluer les effets d'un tel traitement sur l'incidence des accidents cardiovasculaires.

### **2-2-3) Stimuler la voie du RCT**

Le RCT est, comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre I, le processus par lequel l'excès de cholestérol des tissus périphériques est amené au foie par les HDL où il sera sécrété dans la bile pour être éliminé finalement dans les fèces. Le concept de développer de nouvelles thérapies qui peuvent promouvoir le RCT est ainsi attrayant. Le RCT peut être stimulé à différents niveaux tels que l'efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques, la captation du cholestérol au niveau hépatique, et le TICE.

#### **2-2-3-1) Stimulation de l'efflux de cholestérol : agonistes du LXR**

Comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre I, le processus actif d'efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques est à ce jour bien caractérisé et implique en particulier deux ABC transporteurs : ABCA1 et ABCG1. ABCA1 est responsable de l'efflux de cholestérol vers les particules d'apoA-I faiblement lipidées alors que ABCG1 serait impliqué dans l'efflux de cholestérol vers des particules HDL matures. Il semblerait que ces deux transporteurs contribuent de façon coopérative dans le RCT *in vivo* (Wang et al., 2007). Les principaux régulateurs d'ABCA1 et ABCG1 sont les récepteurs nucléaires LXR dont le LXR $\alpha$  qui est très fortement exprimé essentiellement au niveau du foie, l'intestin, les reins, la

rate et le tissu adipeux et le LXR $\beta$  qui est exprimé de façon ubiquitaire mais à moindre niveau. Le développement d'agonistes des LXR est donc d'un très grand intérêt dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'athérosclérose.

De nombreuses études chez la souris supportent l'hypothèse que des composants ciblant les LXRs peuvent être bénéfiques dans le traitement de l'athérosclérose. En effet, il a été montré qu'un traitement avec des agonistes du LXR (GW3965 et T0901317) induit une réduction significative de l'athérosclérose chez des souris susceptibles à l'athérosclérose (apoE<sup>-/-</sup> et LDLR<sup>-/-</sup>) (Terasaka et al., 2003) (Joseph et al., 2002). De plus, Naik *et al* ont montré qu'un traitement avec le GW3965, un agoniste synthétique du LXR, augmente les taux de HDL plasmatiques et stimule également le RCT à partir de macrophages chargés en cholestérol vers les fèces, *in vivo*, chez des souris C57BL/6 et également chez un modèle murin qui se rapproche plus de l'homme au niveau de la distribution des lipoprotéines plasmatiques (souris transgéniques pour l'apoB et la CETP humaines) (Naik et al., 2006). Un important facteur impliqué dans cette promotion du RCT par l'activation du LXR est l'augmentation de l'efflux de cholestérol à partir des macrophages chargés en cholestérol tritié qui se traduit par une augmentation dans le plasma de la quantité de traceur radiomarqué à différent temps après l'injection des macrophages. Ces résultats suggèrent donc que les agonistes du LXR sont de bonnes cibles pour le traitement de l'athérosclérose.

Cependant, les LXRs sont responsables de la régulation de nombreux gènes intervenant dans l'homéostasie du cholestérol tels que ACBA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8, l'apoE, la CETP ainsi que de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides comme le Sterol-Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP1c) ou la Fatty Acid Synthase (FAS). Ainsi, le facteur limitant de nombreux agonistes des LXRs non sélectifs est d'induire la stimulation de la biosynthèse hépatique des acides gras conduisant à une stéatose hépatique. De nombreuses études *in vivo* ont montré que suite à un traitement avec des agonistes des LXRs, les souris présentent une accumulation massive de triglycérides dans le foie et une augmentation des taux plasmatiques en triglycérides dues à l'induction de l'expression hépatique de SREBP1c qui induit à son tour l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras (Repa et al., 2000a; Schultz et al., 2000). En plus d'induire un effet lipogénique, les agonistes des LXR pourraient également être responsables de l'augmentation des taux de LDL-cholestérol chez les espèces possédant la CETP (Groot et al., 2005).

Il a été observé qu'un traitement avec un agoniste possédant la même puissance pour les deux isoformes du LXR (LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ ) augmente les taux plasmatiques de HDL-

cholestérol et la concentration hépatique en triglycérides chez des souris sauvages alors que chez des souris déficientes pour le LXR $\alpha$  seule l'augmentation des taux de HDL plasmatiques est observable (Lund et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc que l'activation du LXR $\beta$  est suffisante pour induire l'augmentation des taux de HDL plasmatiques chez la souris, alors que l'augmentation de la concentration hépatique en triglycérides nécessite l'activation du LXR $\alpha$ . Dans cette même étude, l'agoniste du LXR est également capable de stimuler l'efflux de cholestérol chez les souris déficientes pour le LXR $\alpha$  (Lund et al., 2006). De plus, Bradley *et al* ont montré qu'un traitement avec un agoniste des LXRs chez des souris invalidées pour l'apoE et le LXR $\alpha$  entraîne une diminution du développement de l'athérosclérose, suggérant donc que l'activation du LXR $\beta$  est suffisante pour induire un effet athéroprotecteur (Bradley et al., 2007). Ainsi, un agoniste spécifique du LXR $\beta$  pourrait donc augmenter les taux de HDL-cholestérol, stimuler l'efflux du cholestérol à partir des macrophages et diminuer le développement de l'athérosclérose sans induire une accumulation de triglycérides dans le foie.

Récemment, il a été démontré qu'un traitement de 11 semaines avec un puissant activateur stéroïdien synthétique du LXR, le N,N-diméthyl-3 $\beta$ -hydroxy-cholenamide (DMHCA), entraîne une diminution du développement de l'athérosclérose chez les souris invalidées pour l'apoE, sans induire une augmentation des concentrations plasmatique et hépatique en triglycérides. Le DMHCA est capable d'activer sélectivement des gènes cibles du LXR dans certains tissus mais est incapable d'activer les gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique (Kratzer et al., 2009). Basé sur ces observations, le DMHCA pourrait être un bon agent thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose. Bien qu'il ait été démontré que ce composé augmente l'efflux de cholestérol à partir de macrophages *in vitro*, il reste à déterminer si ce composé est efficace pour stimuler le RCT *in vivo* (Quinet et al., 2004). De plus, comme tous les futurs potentiels agonistes du LXR, des études complémentaires chez des modèles animaux possédant la CETP sont nécessaires pour vérifier l'absence d'élévation des taux de LDL plasmatiques.

### **2-2-3-2) Action au niveau de la captation hépatique: augmenter le catabolisme des HDL**

Une autre étape du RCT qui serait intéressante de cibler, et qui pour l'instant n'a pas été explorée comme potentielle cible thérapeutique, est la captation hépatique du cholestérol

transporté par les HDL. À ce jour, deux voies de captation hépatique des HDL faisant intervenir des récepteurs distincts ont été mises en évidence:

- la captation sélective du cholestérol transporté par les HDL qui fait intervenir SR-B1 (cf. Chapitre I paragraphe 4-4-1)

- la captation de la particule HDL entière (holoparticule) *via* une voie récemment identifiée dans notre équipe, la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> (cf. Chapitre I paragraphe 4-4-2).

### **SR-B1: potentielle cible thérapeutique**

Les travaux de Zhang *et al* ont démontré que l'expression hépatique de SR-B1 a un effet direct sur le taux de transport retour du cholestérol entre des macrophages chargés en cholestérol et les fèces chez la souris. En effet, il a été observé qu'une surexpression hépatique de SR-B1 chez la souris induit une augmentation de l'excrétion dans les fèces du cholestérol marqué issu des macrophages et à l'inverse une invalidation de SR-B1 induit une diminution de ce RCT (Zhang *et al.*, 2005a). De plus, la surexpression hépatique de SR-B1 chez des souris invalidées pour le LDLR et placées sous régime athérogène induit une diminution des plaques d'athérosclérose malgré une diminution des taux plasmatiques de HDL-cholestérol (Kozarsky *et al.*, 2000). À l'inverse, des souris invalidées pour SR-B1 au niveau hépatique placées sous régime athéromateux sont caractérisées par une augmentation du développement de l'athérosclérose (Huby *et al.*, 2006). Ainsi, SR-B1 paraît être une bonne cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose. Cependant, comme souligné dans le chapitre I, son implication physiologique chez l'homme reste à démontrer.

### **La voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>**

La voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>, décrite dans le chapitre I (cf. paragraphe 4-4-2), qui est responsable de la captation de particules HDL entières par les hépatocytes fait intervenir différents acteurs: l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, le récepteur purinergique P2Y<sub>13</sub> et le site de liaison de basse affinité d'identité encore inconnue. Ces différents acteurs pourraient constituer de potentielles cibles thérapeutiques dans le traitement de l'athérosclérose. En particulier, le récepteur P2Y<sub>13</sub> apparaît comme une cible thérapeutique intéressante suite à nos travaux, présentés dans le chapitre III (Article 2), qui montrent son implication physiologique dans le RCT *in vivo*.





# **CHAPITRE III**

**RESULTATS EXPERIMENTAUX**

**ET**

**PERSPECTIVES**



**1) ARTICLE 1 :****Mise en évidence d'une activité ecto-adénylate kinase régulant la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> d'endocytose des HDL par les hépatocytes humains****1-1) Introduction**

Un des principaux rôles athéroprotecteurs des HDL est attribué à la capacité de ces lipoprotéines à épurer les cellules des tissus périphériques de leur excès de cholestérol pour ramener celui-ci au foie, où il sera éliminé *via* les voies biliaires, réduisant ainsi l'importance et la fréquence des lésions athéromateuses. Nous avons précédemment décrit que ce processus appelé "transport retour du cholestérol" est l'une des principales voies d'élimination du cholestérol dans l'organisme. La captation hépatique du cholestérol des HDL constitue l'une des dernières étapes de ce processus et pourrait être une cible intéressante pour le traitement de l'athérosclérose.

Récemment, l'équipe a mis en évidence sur des hépatocytes humains, une nouvelle voie d'internalisation des HDL dans laquelle la liaison de l'apoA-I sur une ecto-F<sub>1</sub>-ATPase entraîne la formation d'ADP suite à l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire par ce complexe enzymatique de surface. L'ADP produit active alors le récepteur purinergique P2Y<sub>13</sub>, ce qui entraîne une cascade de signalisation permettant *in fine* l'endocytose des HDL *via* des sites de liaison de basse affinité (cf. Chapitre I paragraphe 4-4-2).

L'activité ATP hydrolase ainsi que l'endocytose des HDL par les hépatocytes humains sont stimulées par l'apoA-I et inhibées par l'IF<sub>1</sub>, un inhibiteur naturel de l'activité ATP hydrolase de l'ATP synthase mitochondriale. L'ADP, produit de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, contrairement à l'ATP, est capable à lui seul de stimuler l'internalisation des HDL par les hépatocytes au même titre que l'apoA-I. L'addition dans le milieu extracellulaire de l'apyrase, une enzyme qui mime l'activité d'ecto-nucléotidases en dégradant l'ADP et l'ATP, entraîne une inhibition de l'internalisation des HDL par les hépatocytes, démontrant ainsi la dépendance de cette voie pour les taux extracellulaires d'ADP et suggérant que l'ATP extracellulaire n'est pas un facteur limitant pour cette voie. Le métabolisme des adénosines-5'-di et tri phosphate dans le milieu extracellulaire des hépatocytes est donc essentiel dans la régulation de la voie d'endocytose des HDL activée par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase.

Dans cette étude, nous nous sommes donc intéressés à la régulation du métabolisme nucléotidique à la surface des hépatocytes humains, et plus précisément à deux activités enzymatiques responsables de la conversion de nucléotides: la Nucléoside DiPhosphoKinase (NDPK) et l'Adénylate Kinase (AK).

La NDPK catalyse le transfert du  $\gamma$ -phosphate d'un trinucleotide sur un dinucleotide (par exemple :  $ADP + NTP \leftrightarrow ATP + NDP$ ) et l'AK forme de l'ATP à partir de deux molécules d'ADP ( $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$ ). Les activités de ces deux enzymes ont été observées à la surface de nombreux types cellulaires comme les kératinocytes humains (Burrell et al., 2005), les cellules endothéliales HUVEC (Yegutkin et al., 2001), les ostéoblastes (Buckley et al., 2003), mais n'ont jamais été étudiées à la surface des hépatocytes. Leur présence à la surface des hépatocytes humains pourrait réguler la voie ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$  d'endocytose des HDL en produisant ou en consommant l'ADP extracellulaire.

L'objectif de cette étude a donc été d'étudier l'expression et l'activité à la surface cellulaire d'hépatocytes humains (HepG<sub>2</sub>: lignée cellulaire dérivée d'hépatocarcinome humain et hépatocytes en culture primaire) de ces deux enzymes, NDPK et AK, et d'étudier leur action sur l'endocytose des HDL par ces modèles cellulaires.

**1-2) Article 1**

Cell. Mol. Life Sci. 63 (2006) 2829–2837  
 1420-682X/06/232829-9  
 DOI 10.1007/s00018-006-6325-y  
 © Birkhäuser Verlag, Basel, 2006

Cellular and Molecular Life Sciences

**Research Article**

## Cell surface adenylate kinase activity regulates the $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ -mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes

A. C. S. Fabre, P. Vantourout, E. Champagne, F. Tercé, C. Rolland, B. Perret, X. Collet, R. Barbaras and L. O. Martinez\*

Hôpital Purpan, INSERM U563, Département LML Bat. C, BP 3048, 31024 Toulouse cedex 03 (France),  
 Fax: +33 561 779 401, e-mail: Laurent.Martinez@Toulouse.inserm.fr

Received 13 July 2006; received after revision 29 August 2006; accepted 19 September 2006  
 Online First 13 November 2006

**Abstract.** We have previously demonstrated on human hepatocytes that apolipoprotein A-I binding to an ecto- $F_1$ -ATPase stimulates the production of extracellular ADP that activates a  $P2Y_{13}$ -mediated high-density lipoprotein (HDL) endocytosis pathway. Therefore, we investigated the mechanisms controlling the extracellular ATP/ADP level in hepatic cell lines and primary cultures to determine their impact on HDL endocytosis. Here we show that addition of ADP to the cell culture medium induced extracellular ATP production that was due to adenyl-

ate kinase (AK;  $2ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$ ) and nucleoside diphosphokinase (NDPK;  $ADP + NTP \rightleftharpoons ATP + NDP$ ) activities, but not to ATP synthase activity. We further observed that *in vitro* modulation of both ecto-NDPK and AK activities could regulate the ADP-dependent HDL endocytosis. But interestingly, only AK appeared to naturally participate in the pathway by consuming the ADP generated by the ecto- $F_1$ -ATPase. Thus controlling the extracellular ADP level is a potential target for reverse cholesterol transport regulation.

**Keywords.** High-density lipoprotein (HDL), apolipoprotein A-I, cholesterol, hepatocyte, nucleotide metabolism, adenylate kinase, nucleoside diphosphokinase.

Cell surface receptors for high-density lipoprotein (HDL) on hepatocytes are major partners in the regulation of cholesterol homeostasis [1]. We have previously identified on the cell surface of human hepatocytes a complex related to the mitochondrial ATP synthase, as a high-affinity receptor for HDL apolipoprotein A-I (apoA-I) [2]. In an attempt to characterize the enzymatic activity of this cell surface ATP synthase, we discovered that the complex could display an ATP hydrolase activity but could not synthesize ATP. We further elucidated a cell surface signal pathway for HDL endocytosis in which apoA-I binding to the ATP synthase (namely ecto- $F_1$ -ATPase) stimulates extracellular ATP hydrolysis, and the ADP gen-

erated selectively activates the nucleotide receptor  $P2Y_{13}$  and subsequent low-affinity-receptor-dependent HDL endocytosis [2, 3]. Strikingly, the ecto- $F_1$ -ATPase activity ( $ATP \rightarrow ADP + Pi$ ) provides a potent  $P2Y_{13}$  receptor agonist (i.e. ADP) and confers on the ecto- $F_1$ -ATPase its ability to stimulate HDL endocytosis. On the other hand, through degradation of extracellular ATP to adenosine, ecto-nucleotidases remove the potential to activate the  $P2Y$  receptor [4]. This characteristic of ecto-nucleotidases can be revealed using the ATP/ADPase apyrase, which mimics ecto-nucleotidase activity and inhibits HDL endocytosis by hepatocytes [2]. Therefore, adenine nucleotide metabolism in the extracellular environment of hepatocytes is likely to be important for the  $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ -mediated HDL endocytosis. Besides ecto-nucleo-

\* Corresponding author.

tidases, nucleotide-converting enzymes such as adenylate kinase (AK;  $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ ) and nucleoside diphosphokinase (NDPK;  $\text{ADP} + \text{NTP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{NDP}$ ) are important ADP-consuming/generating enzymes and may therefore potentially regulate the  $\text{F}_1\text{-ATPase/P2Y}_{13}$ -mediated HDL endocytosis. Although the presence and activities of such nucleotide-converting enzymes have previously been identified on the surface of various cell types [5–8], they have never been studied at the cell surface of hepatocytes.

In this study, we identified both AK and NDPK activities on the surface of HepG<sub>2</sub> hepatocarcinoma cells and primary human hepatocytes. These activities participate, in concert with the ecto- $\text{F}_1\text{-ATPase}$ , in the interconversion of extracellular adenine nucleotides. In this context, we observed that both ecto-NDPK and AK activities could act on HDL endocytosis by modulating the extracellular ADP level. Interestingly, NDPK is unlikely to be constitutively active on human hepatocytes but the endogenous ADP-consuming activity of AK ( $2\text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ) appears to downregulate the ecto- $\text{F}_1\text{-ATPase/P2Y}_{13}$ -mediated HDL endocytosis pathway.

### Materials and methods

**Materials.** Radiolabelled nucleotides were obtained from PerkinElmer and  $^{125}\text{I-Na}$  from GE-Healthcare. The human hepatoblastoma-derived cell line HepG<sub>2</sub> was obtained from the American Type Culture Collection (HB-8065) and was cultured on collagen-I-coated plates (BD Biosciences) in high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics as previously described [9]. All cell culture reagents were from Invitrogen. Anti-NDPK (Nm23-H1) antibody was purchased from Insight Biotechnology. Nucleotides, diadenosine pentaphosphate ( $\text{Ap}_5\text{A}$ ), apyrase type VII and all other reagents (analytical grade) were from Sigma.  $\text{Ap}_5\text{A}$  was treated with 20 units/ml grade VII apyrase for 2 h to hydrolyse contaminating ADP and ATP and apyrase was then inactivated by heat treatment at 100 °C for 10 min. ATP was then added to  $\text{Ap}_5\text{A}$ -treated samples and a luciferin-luciferase bioluminescence assay was performed to ensure that apyrase activity had been inactivated. Primary cultures of adult normal human hepatocytes were kindly provided by the group of P. Maurel (INSERM U128, Montpellier, France) and prepared as described previously [10].

**ATP measurement by bioluminescence assay.** HepG<sub>2</sub> cells were seeded on 24-well plates at 75,000 cells/well (~60% confluence) and allowed to adhere and grow for 48 h. Plates were then washed and equilibrated in either 10% fetal bovine serum or serum-free DMEM without red phenol for 1 h. Cells were then treated with different

nucleotides or nucleotide analogues for 1 min. Supernatants were removed and centrifuged. For the experiments performed in 10% fetal bovine serum, serum proteins were removed from the cellular supernatants by chloroform extraction (1/1, v/v) before assaying ATP production on the upper phase of the extract. Aliquots (100  $\mu\text{l}$ ) of cellular supernatants were analysed using the ATP bioluminescence assay kit CLS II (Roche Diagnostics). Aliquots were added to the ATP assay mixture and luminescence was measured in a microplate luminometer Orion (Berthold detection systems) for 15 s. The ATP standard curve was performed in the same medium as the samples and in the  $10^{-5}$  to  $10^{-10}$  M concentration range. To monitor the number of cells in each well, adherent viable cells were lysed in NaOH 0.1 M and pH-equilibrated to 7.4 with HCl 1 M. Cellular protein concentration was then determined using the Bio-Rad protein assay dye and BSA as a standard. Data are expressed as picomoles of ATP produced per milligram of cell protein and the corresponding ATP molar concentrations have been specified in the results section when required.

**Dual-label HPLC analysis.** Nucleotides were separated by HPLC through PartiSphere SAX column (Whatman) and quantified on a continuous-flow, in-line scintillation detector (Parkard 500TR) as previously described [11]. The elution positions were determined using appropriate standards. No ATP was detectable in the [ $^3\text{H}$ ]ADP preparation used in all experiments.

**HDL<sub>3</sub>, apoA-I preparations and  $^{125}\text{I}$ -labelling.** HDL<sub>3</sub> was isolated from the plasma of normolipidemic donors as previously described [12]. ApoA-I was isolated from HDL<sub>3</sub> by ion exchange chromatography as described in Mezdour et al. [13].  $^{125}\text{I}$ -labelling of HDL<sub>3</sub> was performed by the N-bromosuccinimide method [14]. Specific radioactivity of  $^{125}\text{I}$ -ApoA-I ranged from 600 to 1000 cpm/ng of protein.

**HDL internalization assays.** HDL internalization assays were performed as previously described [3]. Briefly, HepG<sub>2</sub> cells were seeded on 24-well plates at 75,000 cells/well (~60% confluence) and allowed to adhere and grow for 48 h. Primary human hepatocytes were seeded at confluence and used no longer than a week after preparation. Hepatocytes were washed and equilibrated in serum-free DMEM for 1 h at 37 °C, and were then incubated for 5 min at 37 °C with 75  $\mu\text{g/ml}$  of  $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub>. Cells were washed three times in serum-free DMEM, then dissociation of extracellular-membrane-bound HDL was performed at 4 °C in serum-free DMEM for 90 min. Cells were washed again three times in serum-free DMEM, then lysed in 0.5 ml NaOH 1 M for cell radioactivity counting and protein concentration measurement. Results are expressed as the percent variation of inter-

nalization compared to the control (set at 0); the control corresponds to a mean value of  $\sim 200$  ng of internalized HDL<sub>3</sub> per milligram of cell protein.

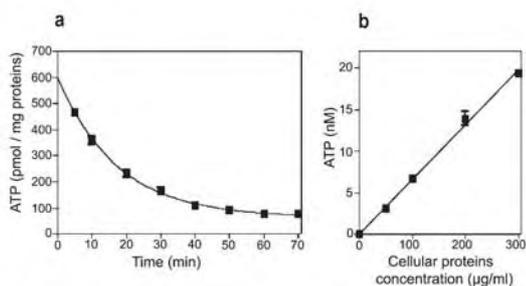
## Results

**HepG<sub>2</sub> cells release ATP into the culture medium.** We first determined whether HepG<sub>2</sub> cells were able to release ATP into the culture medium. After washing, HepG<sub>2</sub> cells were incubated in serum-free DMEM to assay extracellular ATP levels over time. HepG<sub>2</sub> cells released ATP immediately after medium change (Fig. 1a). The extracellular ATP concentration then decreased and stabilized over 1 h of incubation to a value of  $76.5 \pm 6.5$  pmol ATP/mg cell protein ( $\sim 12$  nM). The same results were obtained when the experiment was performed in DMEM with 10% fetal bovine serum (data not shown). No lactate dehydrogenase activity could be detected in the medium sample (data not shown), indicating that no cell lysis occurred during the time of the experiment.

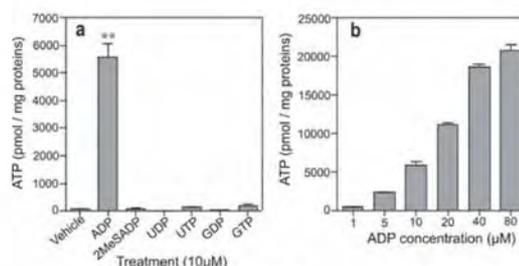
To determine whether ATP release was dependent on cell number, HepG<sub>2</sub> cells were seeded at various densities, allowed to grow for 48 h before incubation in serum-free medium for 1 h and ATP levels were measured. We observed a strong correlation between ATP concentration in the culture medium and the cell number (Fig. 1b).

Thus HepG<sub>2</sub> cells released ATP constitutively but the stabilization of extracellular ATP level over a short time (Fig. 1a) suggests a sharp regulation.

**ADP increases the ATP concentration in cell culture medium.** To clarify the mechanism of ATP release, we determined whether HepG<sub>2</sub> cells were able to convert nu-



**Figure 1.** ATP release from HepG<sub>2</sub> cells as a function of medium change (a) and cell protein concentration (b). (a) HepG<sub>2</sub> cells were seeded on 24-well plates at 75,000 cells/well ( $\sim 60\%$  confluence) and allowed to adhere and grow for 48 h. Complete medium was then removed, replaced with serum-free DMEM; the extracellular medium was then collected at each indicated time point, and ATP was measured by luminometry. (b) HepG<sub>2</sub> cells were seeded at different densities from 25,000 to 150,000 cells/well then treated as in a, except that cells were incubated for 1 h with serum-free medium for stabilization before the ATP content was measured. Data shown are the mean  $\pm$  SE (n = 3) and are representative of three separate experiments.

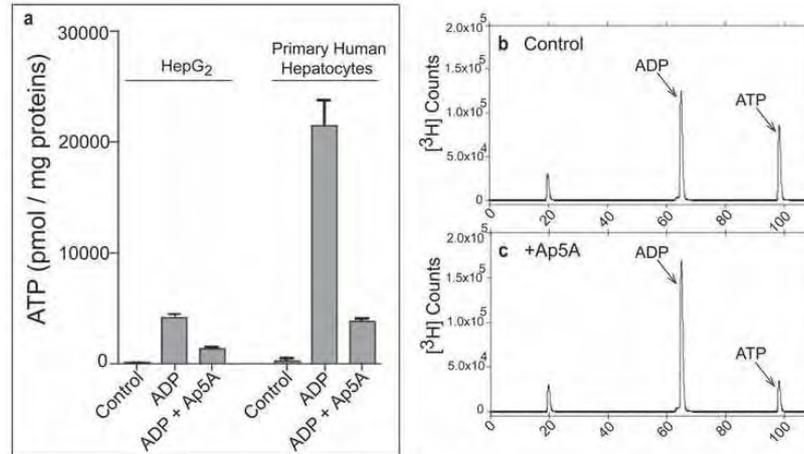


**Figure 2.** Effect of nucleotides on the ATP concentration in the culture medium. HepG<sub>2</sub> cells were seeded on 24-well plates at 75,000 cells/well ( $\sim 60\%$  confluence) and allowed to adhere and grow to confluence for 48 h. (a) Cells were incubated in serum-free DMEM for 1 h then nucleotides or nucleotide analogues (10  $\mu$ M final concentration in DMEM) were added to HepG<sub>2</sub> cells for 1 min before samples of culture medium were taken and the ATP content measured by luciferin-luciferase assay.  $**p < 0.05$  in comparison with vehicle. (b) Cells were incubated in serum-free DMEM for 1 h, then increasing concentrations of ADP (1–80  $\mu$ M) were added to HepG<sub>2</sub> cells for 1 min before samples of culture medium were collected and the ATP content was measured by luciferin-luciferase assay. Data shown are the mean  $\pm$  SE (n = 4) and are representative of three separate experiments.

cleotides to ATP. HepG<sub>2</sub> cells were incubated with various nucleotides and the extracellular ATP concentration was measured. Figure 2a shows that addition of ADP (10  $\mu$ M) to HepG<sub>2</sub> cells resulted in an increase of extracellular ATP content to  $5871 \pm 476$  pmol ATP/mg cell protein ( $\sim 1$   $\mu$ M), which corresponded to an  $\sim 100$ -fold increase of extracellular ATP content compared to the control without ADP added (vehicle). The same concentration (10  $\mu$ M) of UDP, UTP, GDP, GTP or 2MeSADP (non-hydrolysable analogue of ADP) had no effect on the culture medium ATP concentration. Furthermore, ADP-induced ATP production correlated strictly with the added ADP concentration (Fig. 2b) and we could observe an ADP-induced ATP production (up to  $\sim 0.1$   $\mu$ M) with as little as 1  $\mu$ M ADP added. Thus ADP to ATP conversion may participate significantly in extracellular ATP generation.

### Contribution of nucleotide conversion enzymes for extracellular ADP to ATP conversion on hepatocytes.

Two important reactions by which ADP can be converted to ATP have been identified at the cell surface of various cell types: AK and ecto-NDPK [8, 15, 16]. AK catalyses the reaction  $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$  and is inhibited by Ap<sub>5</sub>A [17]. NDPK catalyses a transphosphorylation reaction, transferring the  $\gamma$ -phosphate from a nucleoside triphosphate to a nucleoside diphosphate (e.g.  $\text{ADP} + \text{NTP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{NDP}$ ). However, these different enzymatic activities have never been clearly identified at the hepatocyte cell surface. Contrasting with these ADP-to-ATP conversion enzymes, the classical mitochondrial ATP synthase complex catalyses the synthesis of ATP from ADP and inorganic phosphate using a proton-motive force (ADP



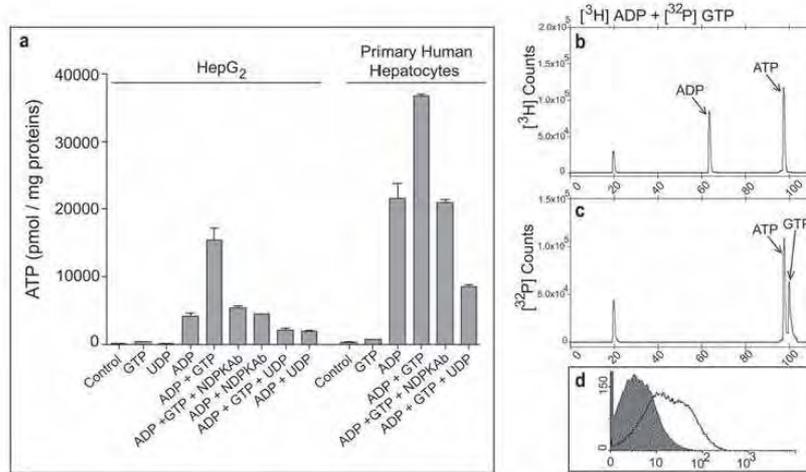
**Figure 3.** The conversion of ADP to ATP in culture medium of HepG2 cells and primary human hepatocytes is dependent on AK activity. (a) Confluent HepG<sub>2</sub> cells or primary human hepatocytes were washed and preincubated for 1 h in 0.5 ml of serum-free medium. The AK inhibitor Ap<sub>5</sub>A (10 μM) was then added for 10 min. ADP (10 μM) was introduced for 1 min and cell culture medium samples were collected for ATP measurement by luciferin-luciferase assay. Data shown are the mean ± SE (n = 4) and are representative of three separate experiments. (b, c) HPLC analysis of metabolic products of ADP at the HepG<sub>2</sub> cell surface. Cells were washed and preincubated for 1 h in 0.5 ml of serum-free medium and subsequently incubated for 5 min in the presence of [<sup>3</sup>H]ADP (1 μCi) alone (b) or simultaneously with Ap<sub>5</sub>A (10 μM) (c). Samples of cell medium were then taken and nucleotides were separated by HPLC and [<sup>3</sup>H] species detection was performed. The retention times for various standards are indicated with arrows. Data are representative of two separate experiments.

+ Pi ⇌ ATP). We have previously shown that the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase on hepatocytes could only hydrolyse ATP [2] whereas an ecto-F<sub>1</sub>-ATPase present on the endothelial cell surface could both synthesise and hydrolyse ATP [18].

Using the ATP bioluminescence assay and HPLC analysis of radiolabelled nucleotides, we investigated the potential roles of cell surface AK, NDPK and F<sub>1</sub>-ATPase activities in the extracellular conversion of ADP to ATP on HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes.

By ATP bioluminescence assay, we first observed that the extracellular conversion of ADP to ATP was inhibited in the presence of Ap<sub>5</sub>A (10 μM) by 65 ± 3% on HepG<sub>2</sub> cell and 82 ± 4% on primary human hepatocytes (Fig. 3a), suggesting that most of the ATP generated at the hepatocyte cell surface was produced by adenylate kinase activity (2ADP ⇌ ATP + AMP). Maximal inhibition of the ADP to ATP conversion occurred at 10 μM Ap<sub>5</sub>A, as reported for other cell types [16], and higher concentrations of Ap<sub>5</sub>A did not further inhibit ADP to ATP conversion (data not shown). To confirm that ADP was directly converted to ATP, HPLC analysis of extracellular [<sup>3</sup>H]-ADP metabolic products was performed on HepG<sub>2</sub> cells. Incubation of HepG<sub>2</sub> cells with [<sup>3</sup>H]-ADP (10 μM) for 5 min induced [<sup>3</sup>H]-ATP production in the extracellular medium (Fig. 3b), and the generated [<sup>3</sup>H]-ATP decreased by 68 ± 3% when 10 μM Ap<sub>5</sub>A was added simultaneously with [<sup>3</sup>H]-ADP (Fig. 3c), confirming the role of AK activity in the ADP-to-ATP conversion at the cell surface of hepatocytes.

Secondly, an ATP bioluminescence assay performed on HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes indicated that the generation of extracellular ATP was higher upon incubation with both ADP (10 μM) and GTP (20 μM) compared to ADP or GTP alone (Fig. 4a) and ATP production correlated with the GTP concentration (data not shown). This is an indication of involvement of a transphosphorylation reaction using GTP as a phosphate donor. Moreover, the response to ADP + GTP was reduced to that of ADP alone in the presence of an anti-NDPK antibody (no effect was observed with a non-immune rabbit IgG; not shown). Finally, we tested the inhibition of NDPK activity by high concentration of UDP as reported previously [19]. Indeed, ATP generation was strongly reduced when a high concentration (1 mM) of UDP was added in combination with ADP + GTP (a higher concentration of UDP did not lead to further inhibition; not shown). Interestingly, ATP generation following ADP addition (without GTP) was decreased by ~50% with UDP (1 mM) whereas anti-NDPK antibody had no effect on the ATP level under the same conditions. Furthermore, HPLC analysis revealed rapid formation of [<sup>3</sup>H]/[γ-<sup>32</sup>P] double-labelled ATP when HepG<sub>2</sub> cells were incubated for 5 min with both [<sup>3</sup>H]-ADP and [γ-<sup>32</sup>P]-GTP (Fig. 4b, c), confirming that the γ-<sup>32</sup>P of GTP had been transferred to the [<sup>3</sup>H]-ADP through a cell surface transphosphorylation NDPK activity. The presence of NDPK at the cell surface was confirmed by flow cytometry performed on intact HepG<sub>2</sub> cells using the anti-NDPK antibody



**Figure 4.** The conversion of ADP to ATP in culture medium of HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes is dependant on NDPK activity. (a) ADP and other nucleotides were introduced alone or simultaneously to confluent HepG<sub>2</sub> cells or primary human hepatocytes for 1 min. Cell culture medium samples were then collected and ATP was measured by luciferin-luciferase assay. Where not shown, ADP was used at 10 μM, GTP at 20 μM and UDP at 1 mM. When used, NDPK antibody (100 μg/ml) was pre-incubated for 30 min prior to addition of nucleotides. Data shown are the mean ± SE (n = 4) and are representative of two separate experiments. (b, c) HPLC analysis of metabolic products of ADP at the HepG<sub>2</sub> cell surface. Cells were washed and pre-incubated for 1 h in 0.5 ml of serum-free medium and subsequently incubated for 5 min in the presence of [<sup>3</sup>H]ADP (1 μCi) + γ[<sup>32</sup>P]GTP (1 μCi). Samples of cell medium were then taken, nucleotides were separated by HPLC, and dual detection was performed (b: [<sup>3</sup>H] species detection; c: [<sup>32</sup>P] species detection). The retention times for various standards are indicated with arrows. (d) NDPK is present at the cell surface of hepatocytes. Flow cytometry on intact HepG<sub>2</sub> cells. Undashed histogram represents cells incubated with an antibody against the NDPK enzyme. Dashed histogram represents cells incubated with the isotypic control antibody.

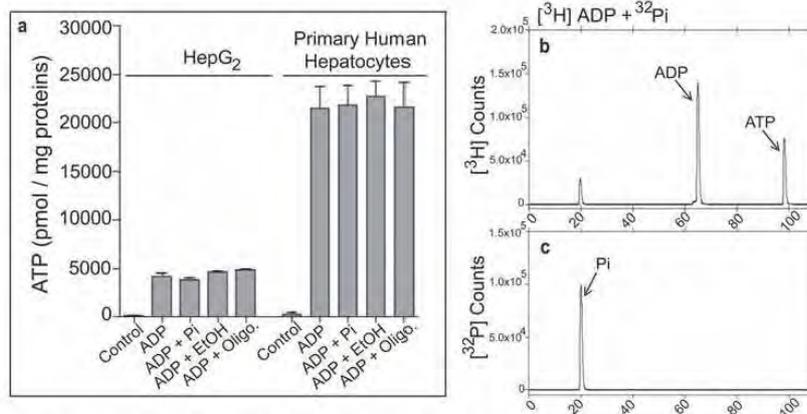
(Fig. 4d). Altogether, these data strongly implicate NDPK in extracellular ATP generation, at least in the presence of extracellular triphosphate nucleotides, such as GTP.

ATP synthase uses P<sub>i</sub> as a substrate for ATP production. However, an ATP bioluminescence assay performed on HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes showed that addition of inorganic phosphate (50 mM) to the culture medium together with ADP did not further increase extracellular ATP production (Fig. 5a), as previously reported by Yegutkin et al. [16] on human endothelial cells (HUVECs). In addition, incubation of HepG<sub>2</sub> cells with [<sup>3</sup>H]-ADP (10 μM), [<sup>32</sup>P]i and unlabelled phosphate (10 mM) induced [<sup>3</sup>H]-ATP production in the extracellular medium (Fig. 5b) but the [<sup>3</sup>H]-ATP generated was not <sup>32</sup>P-labelled (Fig. 5c), strongly indicating that extracellular ATP was not produced by the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase activity, as previously reported [2]. Similar results were obtained at 1 and 10 min incubation time (data not shown). As confirmation, oligomycin (an inhibitor of mitochondrial ATP synthase [20]) did not reduce the extracellular ADP-to-ATP conversion compared to the control (Fig. 5a). Altogether, these data indicate that the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase is not involved in the extracellular ADP-to-ATP conversion on hepatocytes, a process which more likely implicates AK and NDPK activities.

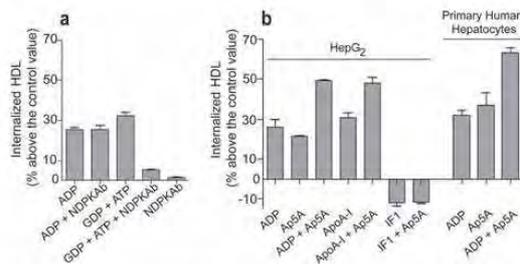
**Contribution of NDPK and AK activities to HDL endocytosis by hepatocytes.** The F<sub>1</sub>-ATPase-mediated HDL endocytosis pathway is strictly dependent on the extracellular ADP level through the activation of the ADP-activated P<sub>2</sub>Y<sub>13</sub> receptor [2, 3]. Since the above results suggested that cell surface AK and NDPK activities were important in the extracellular metabolism of adenine nucleotides, we investigated the impact of these activities on HDL endocytosis by HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes.

Addition of ATP + GDP to the HepG<sub>2</sub> cell medium to generate extracellular ADP through NDPK transphosphorylation activity (ATP + GDP → ADP + GTP) stimulated HDL endocytosis as efficiently as ADP addition (Fig. 6a). This stimulation was abolished when cells were pre-incubated with the anti-NDPK antibody, confirming that NDPK was specifically involved under ATP + GDP treatment. Importantly, anti-NDPK antibody did not significantly modulate HDL endocytosis in the absence of exogenous nucleotides or in the presence of ADP alone. This suggests that NDPK activity is unlikely to be involved in the basal level of HDL endocytosis. Similar results were obtained with primary human hepatocytes (data not shown).

Strikingly, the AK inhibitor Ap<sub>5</sub>A stimulated HDL endocytosis by HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes



**Figure 5.** Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase activity is not involved in the conversion of ADP to ATP in culture medium of HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes. (a) ADP (10 μM) was introduced alone or simultaneously with inorganic phosphate (50 mM) to confluent HepG<sub>2</sub> cells or primary human hepatocytes for 1 min. Cell culture medium samples were then collected and ATP was measured by luciferin-luciferase assay. When used, oligomycin (10 μg/ml) was pre-incubated for 10 min prior to addition of ADP (10 μM). Because oligomycin was dissolved in ethanol, an ethanol (1/100) control was performed. Data shown are the mean ± SE (n = 3) and are representative of three separate experiments. (b, c) HPLC analysis of metabolic products of ADP at the HepG<sub>2</sub> cell surface. Cells were washed and pre-incubated for 1 h in 0.5 ml of serum-free medium and subsequently incubated for 5 min in the presence of [<sup>3</sup>H]ADP (1 μCi) + <sup>32</sup>Pi (0.5 μCi). Samples of cell medium were then taken and species were separated by HPLC and dual detection was performed (b: [<sup>3</sup>H] species detection; c: [<sup>32</sup>P] species detection). The retention times for various standards are indicated with arrows.



**Figure 6.** Effect of NDPK and AK activity on HDL<sub>3</sub> internalization by HepG<sub>2</sub> cells. Cells were incubated for 5 min at 37 °C with 75 μg/ml <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> and different modulators were then applied as described in Materials and methods. Where not shown, nucleotides and IF<sub>1</sub> were used at 100 nM, ApoA was used at 1 μM, apoA-I at 10 μg/ml and anti-NDPK antibody (NDPK Ab) at 100 μg/ml.

and this effect was additive to ADP stimulation (Fig. 6b). This reveals that unlike NDPK, AK is constitutively active and consumes extracellular ADP (2ADP → ATP + AMP), thus inhibiting the ADP-dependent P2Y<sub>13</sub>-mediated HDL endocytosis pathway. As previously reported [2], apoA-I stimulated HDL endocytosis up to ~30% (Fig. 6b). Interestingly, the inhibition of AK activity by ApoA enhanced by ~50% the stimulation of HDL endocytosis by apoA-I (Fig. 6b), which suggests that AK activity counteracts the apoA-I effect by consuming the ADP generated through apoA-I interaction with the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. Finally, we

previously observed that the F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor IF<sub>1</sub> could inhibit both extracellular ADP generation and HDL endocytosis by HepG<sub>2</sub> cells [2]. Here, we observed that, in the presence of IF<sub>1</sub>, the AK inhibitor ApoA could not upregulate HDL endocytosis (Fig. 6b). This is again a strong indication that, in basal conditions, AK mostly downregulates HDL internalization through consuming the ADP generated by the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase.

**Discussion**

This work was designed to characterize the ecto-enzymatic activities that control the ADP/ATP level on human hepatocytes and to determine their impact on the F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>-mediated HDL endocytosis pathway [2, 3]. First, it is clear that the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase substrate, i.e. ATP, is present at the surface of hepatocytes independently of cell lysis (Fig. 1). Indeed, mechanical perturbations induced by changing cell culture medium [21] trigger the release of ATP (Fig. 1a) [22] that stabilizes after 1 h. This basal extracellular ATP level most likely reflects a dynamic equilibrium in which the ATP metabolism at the cell surface of resting cells is balanced by constitutive ATP release. This constitutive ATP release might depend on ATP-binding cassette (ABC) transporters [23], the cell surface voltage-dependent anion channel VDAC [24], vesicle secretion [21, 25] or a network of mitochondria-associated tubules [26].

Interestingly, ADP but not ATP can stimulate the ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ -mediated HDL endocytosis pathway [2, 3]. This indicates that the extracellular level of ATP is not limiting in this pathway, but the availability of ADP produced from ATP by the ecto- $F_1$ -ATPase is the limiting step of  $P2Y_{13}$  activation. The concentration of extracellular ADP may be regulated by ecto-kinases activities that modulate extracellular ATP/ADP levels, such as AK ( $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ ) or NDPK ( $\text{ADP} + \text{NTP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{NDP}$ ), both of which have been reported at the cell surface of various cell types [6–8, 15, 16, 25]. Here, we clearly showed that both AK and NDPK activities are also present at the cell surface of hepatocytes. Indeed, we have observed that the conversion of exogenously added ADP to ATP occurs rapidly and increases in parallel with ADP concentration (Fig. 2a, b). The higher activity observed on primary hepatocytes compared to HepG<sub>2</sub> cells may be attributable to an increased metabolism already described in primary cultures [27, 28]. This extracellular ADP-to-ATP conversion is mainly mediated by AK, as shown by the 68% and 82% inhibition observed in the presence of the AK inhibitor  $\text{Ap}_5\text{A}$  for HepG<sub>2</sub> cells and primary human hepatocytes, respectively. However, because  $\text{Ap}_5\text{A}$  does not completely abolish the conversion of ADP to ATP, a small fraction of ATP may be produced by other ecto-nucleotide kinase enzymes. We also found that ecto-NDPK activity, which uses a  $\gamma$ -phosphate donor in the reaction  $\text{ADP} + \text{NTP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{NDP}$ , can take part in extracellular ATP production when hepatocytes are incubated with both ADP and GTP. Indeed, this extracellular ADP-to-ATP conversion increases in a dose-dependant manner with GTP concentration, can be reduced by NDPK antibody to the level obtained with ADP alone, and is strongly inhibited in the presence of a high concentration (1 mM) of UDP, as previously reported [19]. The last effect may be attributed to the ability of UDP to also counteract AK activity in an alternative reaction  $\text{ADP} + \text{UDP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{UTP}$  [29]. This hypothesis is supported by the fact that the anti-NDPK antibody strictly inhibits the GTP-induced ADP-to-ATP conversion and has no effect on ATP production when ADP is added alone (Fig. 4a). However, we do not totally exclude the possibility that NDPK may be activated by adding ADP alone, as nucleoside triphosphate, particularly UTP, has been reported to be constitutively released by cells [30, 31].

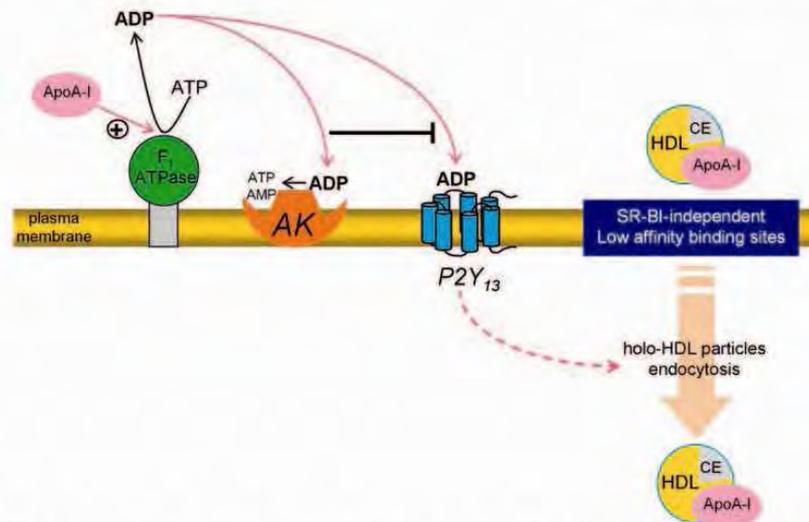
Although we have previously reported that the ecto-ATP synthase (namely ecto- $F_1$ -ATPase) had only an ATP hydrolysis activity on hepatocytes [2], this ecto-enzyme was also found to both hydrolyse and synthesise ATP on keratinocytes [8] and endothelial cells [18]. We therefore investigated again whether an ecto-ATP synthase activity ( $\text{ADP} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{ATP}$ ) could be involved in the extracellular ADP-to-ATP conversion observed on hepatocytes. Contrasting with other studies reporting that oligomycin (a potent inhibitor of the mitochondrial  $F_1F_0$  ATP synthase

by interaction with the  $F_0$  subcomplex [20]) could partially inhibit the extracellular ADP-to-ATP conversion [8], we did not observe in our system any effect of oligomycin on extracellular ATP production by hepatocytes. Furthermore, following incubation of HepG<sub>2</sub> cells with [<sup>3</sup>H]-ADP and [<sup>32</sup>Pi], we unambiguously observe that the generated [<sup>3</sup>H]-ATP is not <sup>32</sup>P-labelled (Fig. 6b, c), suggesting a reaction different from that of the conventional ATP synthase, as previously reported by Yegutkin et al. [16] on human endothelial cells. Consistent with our data on hepatocytes, Yegutkin et al. [16] attributed this extracellular ATP production on endothelial cells to AK and NDPK activities but not to ATP synthase activity. Therefore, cell surface ATP synthesis observed on endothelial cells by other groups is probably not only due to the ATP synthase activity and further investigations are needed regarding other ecto-nucleotide kinases activities. However, it remains to be elucidated whether we are dealing with similar entities of the ATP synthase on the different cell types.

Thus, our data rule out the ability of the ecto- $F_1$ -ATPase to synthesise ATP on hepatocytes and show that the ADP-to-ATP conversion at the hepatocyte cell surface is mainly due to AK and ecto-NDPK activities, the later being fully active when a co-substrate (e.g. GTP) is added.

This ADP-to-ATP conversion may be essential in the regulation of the  $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ -mediated HDL endocytosis pathway. Indeed, our results reveal that ecto-NDPK activity can stimulate HDL endocytosis only when the enzyme is activated with exogenous substrates (e.g. ATP + GDP) to generate extracellular ADP. By contrast, the AK inhibitor  $\text{Ap}_5\text{A}$  stimulates HDL endocytosis, suggesting that ecto-AK is constitutively active in consuming extracellular ADP. Moreover, because  $\text{Ap}_5\text{A}$  does not further stimulate HDL endocytosis when the  $F_1$ -ATPase activity is inhibited by  $\text{IF}_1$ , it appears that most of the ADP constitutively generated by the ecto- $F_1$ -ATPase ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$ ) is consumed by AK activity. Therefore, in the  $P2Y_{13}$ -mediated pathway of HDL endocytosis, the availability of ADP to stimulate  $P2Y_{13}$  and finally HDL uptake is a crucial point of regulation. It may depend on the balance between the constitutive AK activity that removes extracellular ADP and the ecto- $F_1$ -ATPase that synthesises ADP. Activation of ADP synthesis by apoA-I unbalances the pathway and increases HDL endocytosis when required (Fig. 7).

The present work provides a better understanding of a cell surface nucleotide signal which is the initial step of the  $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$  pathway and will eventually lead to the endocytosis of the holo-HDL particles (protein plus lipid) through a low-affinity HDL-binding site as previously described [2, 32, 33]. The identity of the low-affinity receptor is still unknown and needs further investigations. Although Cla-1 (the human orthologue of SR-BI) may be a good candidate [34], neither SR-



**Figure 7.** Model of F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>-mediated HDL endocytosis by hepatocytes. Cell surface AK activity downregulates an SR-BI-independent holo-HDL particle endocytosis pathway by consuming the ADP generated by the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. This process depends on the balance between the AK activity that removes extracellular ADP and the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase that synthesizes ADP. Activation of ADP synthesis by apoA-I unbalances the pathway and increases HDL endocytosis when required. CE, cholesterol ester.

BI/Cla-1-blocking antibody nor SR-BI/Cla-1 siRNA on HepG<sub>2</sub> cells could modify the basal or ADP-induced HDL uptake by HepG<sub>2</sub> cells [1, and our unpublished data]. Thus, it is more likely that the final step of this pathway, i.e. uptake of the holo-HDL particles, occurs through an HDL low-affinity receptor other than SR-BI/Cla-1 (Fig. 7). This is consistent with other data suggesting that the selective lipid uptake, which is one of the main features displayed by SR-BI [34], does not require HDL endocytosis [35, 36] and that the amount of HDL trafficking through the SR-BI-dependent retroendocytic pool is too small to support the SR-BI-mediated selective lipid uptake [37].

In conclusion, this study provides new insights into the F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>-mediated HDL endocytosis pathway by showing that modulation of the extracellular ADP level through ecto-AK and ecto-F<sub>1</sub>-ATPase activities is a potential target for reverse cholesterol transport regulation. This opens up new strategies for the design of drugs able to increase HDL-cholesterol clearance for enhanced atheroprotective effects.

*Acknowledgements.* We thank Dr. B. Payrastra (INSERM U563, Toulouse, France) for expert assistance with nucleotide HPLC analysis, Prof. P. Maurel (INSERM U128, Montpellier, France) for providing primary human hepatocytes and Prof. J. Walker, M. Montgomery and M. Runswick (Dunn Human Nutrition Unit, Cambridge, UK) for helpful discussions. This study was supported by the Association Pour la Recherche sur le Cancer (ARC-3495), the Alliance Program from Egide and the British Council.

- Martinez, L. O., Jacquet, S., Terce, F., Collet, X., Perret, B. and Barbaras, R. (2004) New insight on the molecular mechanisms of high-density lipoprotein cellular interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1–18.
- Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J. E., Terce, F., Collet, X., Perret, B. and Barbaras, R. (2003) Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421, 75–79.
- Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L. O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., Nauze, M., Champagne, E., Terce, F., Gachet, C., Perret, B., Collet, X., Boeynaems, J. M. and Barbaras, R. (2005) The nucleotide receptor P2Y(13) is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2508–2515.
- Plesner, L. (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158, 141–214.
- Yegutkin, G. G., Henttinen, T., Samburski, S. S., Sychala, J. and Jalkanen, S. (2002) The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem. J.* 367, 121–128.
- Buckley, K. A., Golding, S. L., Rice, J. M., Dillon, J. P. and Gallagher, J. A. (2003) Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *FASEB J.* 17, 1401–1410.
- Donaldson, S. H., Picher, M. and Boucher, R. C. (2002) Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 209–215.
- Burrell, H. E., Wlodarski, B., Foster, B. J., Buckley, K. A., Sharpe, G. R., Quayle, J. M., Simpson, A. W. and Gallagher, J. A. (2005) Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 280, 29667–29676.
- Barbaras, R., Collet, X., Chap, H. and Perret, B. (1994) Specific binding of free apolipoprotein A-I to a high-affinity bind-

- ing site on HepG2 cells: characterization of two high-density lipoprotein sites. *Biochemistry* 33, 2335–2340.
- 10 Ferrini, J. B., Ourlin, J. C., Pichard, L., Fabre, G. and Maurel, P. (1998) Human hepatocyte culture. *Methods Mol. Biol.* 107, 341–352.
  - 11 Payrastré, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M. and Gratacap, M. (2001) Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal* 13, 377–387.
  - 12 Martínez, L. O., Georgeaud, V., Rolland, C., Collet, X., Tercé, F., Perret, B. and Barbaras, R. (2000) Characterization of two high-density lipoprotein binding sites on porcine hepatocyte plasma membranes: contribution of scavenger receptor class B type I (SR-BI) to the low-affinity component. *Biochemistry* 39, 1076–1082.
  - 13 Mezdour, H., Clavey, V., Kora, I., Koffigan, M., Barkia, A. and Fruchart, J. C. (1987) Anion-exchange fast protein liquid chromatographic characterization and purification of apolipoproteins a-i a-ii c-i c-ii c-iii-0 c-iii-1 c-iii-2 and e from human plasma. *J. Chromatogr.* 414, 35–46.
  - 14 Sinn, H. J., Schrenk, H. H., Friedrich, E. A., Via, D. P. and Dresel, H. A. (1988) Radioiodination of proteins and lipoproteins using N-bromosuccinimide as oxidizing agent. *Anal. Biochem.* 170, 186–192.
  - 15 Lazarowski, E. R., Homolya, L., Boucher, R. C. and Harden, T. K. (1997) Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. *J. Biol. Chem.* 272, 20402–20407.
  - 16 Yegutkin, G. G., Henttinen, T. and Jalkanen, S. (2001) Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J.* 15, 251–260.
  - 17 Sinev, M. A., Sineva, E. V., Ittah, V. and Haas, E. (1996) Domain closure in adenylate kinase. *Biochemistry* 35, 6425–6437.
  - 18 Moser, T. L., Kenan, D. J., Ashley, T. A., Roy, J. A., Goodman, M. D., Misra, U. K., Cheek, D. J. and Pizzo, S. V. (2001) Endothelial cell surface F1-FO ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiotensin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6656–6661.
  - 19 Lascu, I. and Gonin, P. (2000) The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 237–246.
  - 20 Linnett, P. E. and Beechey, R. B. (1979) Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol.* 55, 472–518.
  - 21 Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. and Harden, T. K. (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* 64, 785–795.
  - 22 Schlosser, S. F., Burgstahler, A. D. and Nathanson, M. H. (1996) Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9948–9953.
  - 23 Roman, R. M., Wang, Y., Lidofsky, S. D., Feranchak, A. P., Lomri, N., Scharshmidt, B. F. and Fitz, J. G. (1997) Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. *J. Biol. Chem.* 272, 21970–21976.
  - 24 Okada, S. F., O'Neal, W. K., Huang, P., Nicholas, R. A., Ostrowski, L. E., Craigen, W. J., Lazarowski, E. R. and Boucher, R. C. (2004) Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. *J. Gen. Physiol.* 124, 513–526.
  - 25 Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. and Harden, T. K. (2000) Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J. Biol. Chem.* 275, 31061–31068.
  - 26 Beaudoin, A. R., Grondin, G. and Gendron, F. P. (1999) Immunolocalization of ATP diphosphohydrolase in pig and mouse brains, and sensory organs of the mouse. *Prog. Brain Res.* 120, 387–395.
  - 27 Wilkening, S., Stahl, F. and Bader, A. (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1035–1042.
  - 28 Einarsson, C., Ellis, E., Abrahamsson, A., Ericzon, B. G., Bjorkhem, I. and Axelson, M. (2000) Bile acid formation in primary human hepatocytes. *World J. Gastroenterol.* 6, 522–525.
  - 29 Willemoes, M. and Kilstrup, M. (2005) Nucleoside triphosphate synthesis catalysed by adenylate kinase is ADP dependent. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 195–199.
  - 30 Harden, T. K. and Lazarowski, E. R. (1999) Release of ATP and UTP from astrocytoma cells. *Prog. Brain Res.* 120, 135–143.
  - 31 Lazarowski, E. R. and Harden, T. K. (1999) Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1272–1278.
  - 32 Garcia, A., Barbaras, R., Collet, R., Bogoy, A., Chap, H. and Perret, B. (1996) High density lipoprotein3 (HDL3) receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry* 35, 13064–13070.
  - 33 Guendouzi, K., Collet, X., Perret, B., Chap, H. and Barbaras, R. (1998) Remnant high density lipoprotein2 particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG2). *Biochemistry* 37, 14974–14980.
  - 34 Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518–520.
  - 35 Nieland, T. J., Ehrlich, M., Krieger, M. and Kirchhausen, T. (2005) Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI. *Biochim. Biophys. Acta* 1734, 44–51.
  - 36 Harder, C. J., Vassiliou, G., McBride, H. M. and McPherson, R. (2006) Hepatic SR-BI-mediated cholesteryl ester selective uptake occurs with unaltered efficiency in the absence of cellular energy. *J. Lipid Res.* 47, 492–503.
  - 37 Sun, B., Eckhardt, E. R., Shetty, S., van der Westhuyzen, D. R. and Webb, N. R. (2006) Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts. *J. Lipid Res.* 47, 1700–1713.



To access this journal online:  
<http://www.birkhauser.ch>

### **1-3) Un ABC transporteur pourrait être responsable de l'activité adénylate kinase à la surface des hépatocytes**

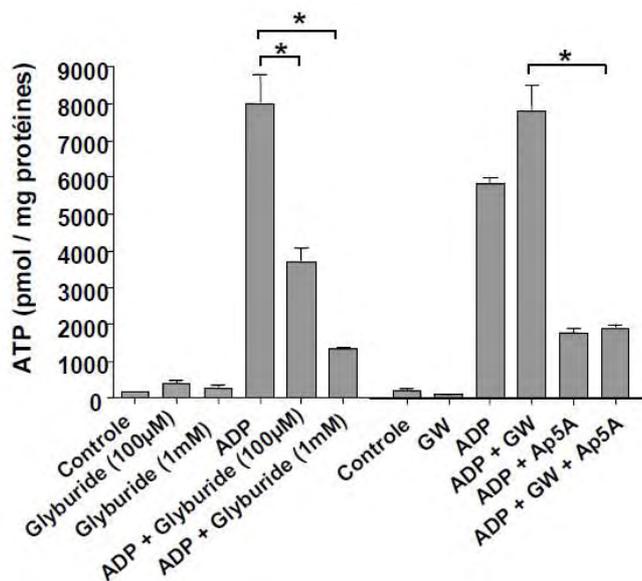
Les résultats présentés ci-dessus indiquent qu'une activité AK à la surface des hépatocytes est capable de réguler constitutivement et négativement l'endocytose des HDL par les hépatocytes en consommant l'ADP extracellulaire généré par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. Ainsi, l'identification de l'enzyme responsable de cette activité AK, qui pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour la régulation du transport retour du cholestérol, constitue donc une perspective de recherche intéressante.

Six isoformes classiques d'adénylate kinase (AK1-6) sont connues et leurs activités ont été observées dans différents tissus et dans différents compartiments cellulaires (cytoplasme, espace intermembranaire mitochondrial, matrice mitochondriale et noyau) (Noma, 2005). Aucune activité de l'une de ces 6 isoformes n'a été observée au niveau de la membrane plasmique. Cependant, il a été montré qu'une nouvelle isoforme de l'AK1 cytosolique, AK1 $\beta$ , est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique de différents modèles cellulaires (murins et humains). Cette AK1 $\beta$  membranaire diffère de l'AK1 cytoplasmique par l'ajout de 18 acides aminés dans sa partie N-terminale qui lui permet de se lier à la bicouche lipidique (Collavin et al., 1999; Ruan et al., 2002). Il a été également démontré que les domaines de liaison des nucléotides (NBD domains) du CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), un ABC transporteur présent au niveau de la membrane plasmique, sont capables de catalyser *in vitro* l'activité AK en plus de leur activité ATPasique (Ramjeesingh et al., 2008; Randak and Welsh, 2003). Nous avons donc voulu vérifier si l'activité AK en surface des hépatocytes est la résultante de l'activité d'un ABC transporteur.

Pour cela, nous avons traité les cellules HepG<sub>2</sub> pendant 10 minutes avant l'ajout de l'ADP dans le milieu extracellulaire, avec un inhibiteur des ABC transporteurs classiquement utilisé, le glyburide, à différentes concentrations (100 $\mu$ M, 1mM). Ce traitement a conduit à une forte diminution de la quantité d'ATP présent dans le milieu extracellulaire en réponse à l'ADP (**Figure 24**). Cette inhibition de la conversion de l'ADP en ATP est similaire à celle induite par le prétraitement des cellules avec l'Ap5A, l'inhibiteur de l'activité AK. Ces résultats suggèrent que l'activité AK pourrait correspondre à l'activité d'un ABC transporteur présent à la surface des hépatocytes.

Le LXR étant un récepteur nucléaire capable d'induire la transcription de différents ABC transporteurs, nous avons donc testé l'effet d'un agoniste du LXR, le GW3965 (Collins et al., 2002), sur la conversion de l'ADP en ATP. Nous avons observé, après traitement des

cellules avec le GW3965 (10 $\mu$ M) pendant 24h, une augmentation de la conversion de l'ADP en ATP. Cette augmentation, bien que non significative, est totalement inhibée par le traitement des cellules avec l'Ap5A (**Figure 24**). Ceci renforce donc l'hypothèse que l'activité AK à la surface des hépatocytes pourrait être la résultante de l'activité d'un ABC transporteur.



**Figure 24: Activité adénylate kinase catalysée par un ABC transporteur à la surface des cellules HepG<sub>2</sub>**

Une heure après le changement du milieu de culture, les cellules HepG<sub>2</sub> sont prétraitées ou non avec le glyburide (100 $\mu$ M, 1mM) ou l'Ap5A (10 $\mu$ M) pendant 10 minutes. À la fin de l'incubation, l'ADP (10 $\mu$ M) est ajouté. Le milieu de culture est récupéré 30 secondes après et la concentration extracellulaire en ATP est déterminée par bioluminescence. Le glyburide est dilué dans du DMSO puis dans le milieu d'incubation, la concentration en DMSO n'excédant pas 1%. Un contrôle avec du DMSO (1/100) a été effectué.

Pour les expériences avec l'agoniste du LXR, les cellules sont prétraitées ou non 24h avec le GW3965 (10 $\mu$ M).

Les résultats exprimés en pmol d'ATP/mg de protéines cellulaires correspondent à la moyenne  $\pm$  écart type (n=3) et sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. \* : p < 0,05

#### **1-4) Conclusion**

Ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de deux activités enzymatiques, AK et NDPK, à la surface des hépatocytes humains (cellules HepG<sub>2</sub> et hépatocytes humains primaires). En contrôlant les taux d'ADP et d'ATP extracellulaires, ces deux activités contribuent à la régulation de la voie d'endocytose des HDL dépendante de l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> par l'ADP produit par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase. Contrairement à l'activité AK qui régule constitutivement (c'est-à-dire sans apport de nucléotides) et négativement l'endocytose des HDL en consommant l'ADP produit par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase,

l'activité NDPK a un effet sur cette endocytose seulement en présence d'un apport exogène de nucléotides.

L'activité AK, en régulant naturellement l'endocytose des HDL par les hépatocytes, endocytose dépendante de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase et du récepteur P2Y<sub>13</sub>, possède donc un grand intérêt pour les études de la régulation de la dernière étape de la voie de transport retour du cholestérol. La connaissance de l'identité de l'enzyme responsable de cette activité AK à la surface des hépatocytes est donc une perspective de recherche intéressante. Les résultats préliminaires avec le glyburide ou le GW3965 suggèrent l'implication d'un ABC transporteur dans l'activité AK. Des expériences complémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer cette hypothèse (cf. Perspectives 4-1-1).

De plus ces travaux nous ont permis de confirmer que l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase présente à la surface des hépatocytes n'a pas la capacité de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP à la surface des hépatocytes.

**2) ARTICLE 2 :****Importance physiologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le transport retour du cholestérol****2-1) Introduction**

Le récepteur P2Y<sub>13</sub> est un élément clé de la voie d'endocytose hépatique des particules HDL entières. Dans cette voie, la liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase stimule la production d'ADP extracellulaire qui va induire l'endocytose des particules HDL entières suite à l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub>. Le rôle de P2Y<sub>13</sub> dans cette voie d'endocytose des HDL a été démontré dans différents modèles d'hépatocytes humains en culture et *in situ* sur des foies perfusés de souris (Jacquet et al., 2005). Les informations sur son rôle physiologique sont aujourd'hui inexistantes. La captation hépatique des HDL constituant l'une des dernières étapes de la voie de transport retour du cholestérol, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'implication physiologique *in vivo* du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le transport retour du cholestérol chez la souris.

Pour cette étude, nous disposons d'un modèle murin invalidé pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> qui a été développé dans les équipes du Professeur B. Robaye et de JM. Boeynaems (Université libre de Bruxelles) avec qui nous avons collaboré. De plus, nous disposons également d'un agoniste partiel du récepteur P2Y<sub>13</sub>, l'AR-C69931MX, également appelé Cangrelor. Sur des hépatocytes humains ainsi que *in situ* sur des foies perfusés de souris, il a été montré qu'un traitement avec le Cangrelor stimule l'endocytose des HDL au même titre que l'apoA-I.

Pour l'étude de l'implication physiologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le transport retour du cholestérol, nous avons analysé les effets d'une activation et/ou de l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> sur différentes étapes du transport retour du cholestérol :

- la captation hépatique des HDL par des expériences de perfusion de foie de souris et sur des hépatocytes primaires murins

- les HDL étant la source essentielle de cholestérol éliminé dans la bile sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaries (cf. Chapitre I, paragraphe 4-5), les sécrétions biliaries en cholestérol et acides biliaries ont été analysées par des expériences de canulations biliaries. De plus, nous avons utilisé la technique développée par le Pr. Rader qui consiste à injecter à l'animal en intrapéritonéal des macrophages préalablement chargés en cholestérol radiomarqué et à suivre le devenir de ce cholestérol au niveau du plasma, du foie et des fèces. Par cette technique, le transport retour du cholestérol est suivi de son initiation (efflux au

niveau des macrophages) jusqu'à sa finalité (l'excrétion du cholestérol dans les fèces) (Zhang et al., 2003).

2-2) Article 2**RAPID COMMUNICATION****P2Y<sub>13</sub> Receptor is Critical for Reverse Cholesterol Transport**

Aurélie C. Fabre,<sup>1,2\*</sup> Camille Malaval,<sup>1,2\*</sup> Abduehakem Ben Addi,<sup>3\*</sup> Céline Verdier,<sup>1,2</sup> Véronique Pons,<sup>1,2</sup> Nizar Serhan,<sup>1,2</sup> Laetitia Lichtenstein,<sup>1,2</sup> Guillaume Combes,<sup>1,2</sup> Thierry Huby,<sup>4</sup> François Briand,<sup>5</sup> Xavier Collet,<sup>1,2</sup> Niels Nijstad,<sup>6</sup> Uwe J.F. Tietge,<sup>6</sup> Bernard Robaye,<sup>3</sup> Bertrand Perret,<sup>1,2</sup> Jean-Marie Boeynaems,<sup>3</sup> and Laurent O. Martinez<sup>1,2</sup>

**A major atheroprotective functionality of high-density lipoproteins (HDLs) is to promote “reverse cholesterol transport” (RCT). In this process, HDLs mediate the efflux and transport of cholesterol from peripheral cells and its subsequent transport to the liver for further metabolism and biliary excretion. We have previously demonstrated in cultured hepatocytes that P2Y<sub>13</sub> (purinergic receptor P2Y, G protein-coupled, 13) activation is essential for HDL uptake but the potential of P2Y<sub>13</sub> as a target to promote RCT has not been documented. Here, we show that P2Y<sub>13</sub>-deficient mice exhibited a decrease in hepatic HDL cholesterol uptake, hepatic cholesterol content, and biliary cholesterol output, although their plasma HDL and other lipid levels were normal. These changes translated into a substantial decrease in the rate of macrophage-to-feces RCT. Therefore, hallmark features of RCT are impaired in P2Y<sub>13</sub>-deficient mice. Furthermore, cangrelor, a partial agonist of P2Y<sub>13</sub>, stimulated hepatic HDL uptake and biliary lipid secretions in normal mice and in mice with a targeted deletion of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in liver (hypomSR-BI-knockout<sup>liver</sup>) but had no effect in P2Y<sub>13</sub> knockout mice, which indicate that P2Y<sub>13</sub>-mediated HDL uptake pathway is independent of SR-BI-mediated HDL selective cholesteryl ester uptake. **Conclusion:** These results establish P2Y<sub>13</sub> as an attractive novel target for modulating RCT and support the emerging view that steady-state plasma HDL levels do not necessarily reflect the capacity of HDL to promote RCT. (HEPATOLOGY 2010;52:1477-1483)**

**T**he risk of developing atherosclerosis, a leading cause of death in industrialized countries, is directly related to the plasma concentration of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and inversely related to high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels. Although HDL particles directly protect the vascular wall, their beneficial effect is mostly attributed to their central functions in “reverse cholesterol transport” (RCT). This is a process in which

excess cholesterol from peripheral tissue and macrophages/foam cells is taken up and processed in HDL particles and later delivered to the liver, before being excreted in the bile as free cholesterol or after transformation into bile acids.<sup>1</sup> This process, the principal way by which the body eliminates cholesterol, relies on specific interactions between HDL particles and peripheral cells (cholesterol efflux) on the one hand and hepatocytes (HDL cholesterol uptake) on the other

*Abbreviations: abca1, ATP-binding cassette, subfamily A, member 1; abcb4, ATP-binding cassette b4; abcb11/bsep, ATP-binding cassette b11/bile salt export pump; abcg1, ATP-binding cassette g1; abcg5/abcg8, ATP-binding cassette g5/g8; apoA-I, apolipoprotein A-I; ATP, adenosine triphosphate; HDL, high-density lipoprotein; hmgr, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; mRNA, messenger RNA; ntcp, Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide; oatp, organic anion transport polypeptide; P2Y<sub>13</sub>, purinergic receptor P2Y, G-protein-coupled 13; RCT, reverse cholesterol transport; SR-BI, scavenger receptor class B, type I.*

*From the <sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 563, Toulouse, France; <sup>2</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, CHU de Toulouse, Toulouse, France; <sup>3</sup>Institute of Interdisciplinary Research, Interdisciplinary Institute for Research in Human and Molecular Biology (IRIBHM), Université Libre de Bruxelles, Erasme Hospital, Brussels, Belgium; <sup>4</sup>INSERM Unité Mixte de Recherche en Santé 939, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, Hôpital de la Pitié, Paris, France; <sup>5</sup>Physiogenex SAS, Prologue Biotech, Labège, France; <sup>6</sup>Department of Pediatrics, Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, University Medical Center of Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands*

*Received May 24, 2010; accepted July 29, 2010.*

*\*These authors contributed equally to this work.*

*This study was supported by the Avenir program of the French National Institute for Health and Medical Research. A.C.F. held a fellowship from FRM (Fondation pour la Recherche Médicale). U.J.F.T. is supported by the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO) VIDI # 917-56-358.*

1477

hand. Hepatic HDL uptake can involve either the selective uptake of cholesteryl ester (CE) from HDL particles into hepatocytes (i.e., uptake of CE without HDL proteins) or holoparticle HDL endocytosis (i.e., uptake of both HDL protein and lipid moieties).

The scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is a HDL receptor that mediates selective uptake *in vivo*. In SR-BI-deficient mice, HDL selective CE uptake by the liver decreases by more than 90% but HDL holoparticle uptake is unchanged, suggesting that holoparticle uptake does not involve SR-BI.<sup>2,3</sup> A likely candidate mechanism mediating HDL holoparticle uptake in the absence of SR-BI is the cell-surface complex related to mitochondrial F<sub>1</sub>-adenosine triphosphatase (ATPase), namely ecto-F<sub>1</sub>-ATPase.<sup>4</sup> When HDL binds to apolipoprotein A-I (apoA-I), this enzyme generates extracellular adenosine diphosphate (ADP) which then specifically activates the P2Y<sub>13</sub> receptor which is a G-protein-coupled receptor. This results in HDL holoparticle endocytosis mediated by as-yet unidentified low-affinity binding sites. In addition, cangrelor, which acts as a partial agonist of the P2Y<sub>13</sub> receptor, stimulates HDL endocytosis by human hepatocytes and perfused mouse liver.<sup>5</sup>

In this study, we generated P2Y<sub>13</sub>-null mice (−/−) in order to investigate the potential contribution of P2Y<sub>13</sub> to RCT.

## Materials and Method

For a detailed description of materials and methods used, please see Supporting Information.

## Results

To investigate the role of P2Y<sub>13</sub> in cholesterol metabolism *in vivo*, we generated P2Y<sub>13</sub>-null mice (−/−) by a gene-targeting strategy (Fig. 1) and their wild-type littermates (+/+) were used as controls. Physical examination of the (−/−) mice on a chow diet indicated that P2Y<sub>13</sub> deletion had no detrimental effect on development, fertility, or any hematological or biochemical parameters. Of note, we found no difference in plasma total cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride levels between the (+/+) and (−/−) mice maintained on chow diet (Table 1). Hepatic lipids were

also similar, except that free cholesterol content was significantly lower in (−/−) mice than in (+/+) mice (Table 1), suggesting that the hepatic cholesterol metabolism is impaired in mice lacking the P2Y<sub>13</sub> gene.

To examine HDL uptake mediated by P2Y<sub>13</sub>, we allowed endocytosis of fluorescent DyLight<sup>549</sup>-HDL in primary hepatocytes isolated from P2Y<sub>13</sub> (−/−) and (+/+) mice. After 30 minutes of endocytosis, fluorescent DyLight<sup>549</sup>-HDL showed a punctate endosomal pattern in hepatocytes from (+/+) mice (Fig. 2A). In contrast, the staining was strikingly different in hepatocytes from P2Y<sub>13</sub> (−/−) mice, showing very few vesicular structures positive for fluorescent DyLight<sup>549</sup>-HDL (Fig. 2B), which suggests that receptor-mediated HDL uptake is markedly impaired when P2Y<sub>13</sub> is not expressed. We next compared the uptake of radiolabeled HDL by livers of P2Y<sub>13</sub> (−/−) and (+/+) mice. Hepatic uptake of <sup>125</sup>I-HDL was significantly lower in livers from P2Y<sub>13</sub> (−/−) mice compared to (+/+) (−20.3% ± 5.6%; Fig. 2C). Remarkably, the P2Y<sub>13</sub> partially agonistic compound cangrelor (10 μM) induced marked stimulation of <sup>125</sup>I-HDL hepatic uptake in livers from (+/+) mice (+34.9% ± 6.4% versus phosphate-buffered saline control) but had no effect in livers from P2Y<sub>13</sub> (−/−) mice (Fig. 2C). This confirms that cangrelor acts specifically via P2Y<sub>13</sub> activation and suggests that P2Y<sub>13</sub> can be activated *in vivo* to promote hepatic HDL uptake. Moreover, the stimulation of <sup>125</sup>I-HDL hepatic uptake by cangrelor was also observed in livers from mice with a targeted deletion of SR-BI in liver (hypomSR-BI-KO<sup>liver</sup>,<sup>6</sup>). The level of stimulation was the same as in P2Y<sub>13</sub> (+/+) mice (Fig. 2C), suggesting that the P2Y<sub>13</sub>-mediated HDL uptake pathway is independent of SR-BI-mediated HDL selective CE uptake.

Because biliary sterols are supposedly derived mainly from HDL cholesterol,<sup>7,8</sup> we next investigated whether the lower free cholesterol liver content in P2Y<sub>13</sub>-KO mice would be translated into altered biliary lipid secretion rates (Table 1). Bile flow and bile acid secretion were somewhat lower following P2Y<sub>13</sub> inactivation. Biliary secretion of cholesterol and phospholipids were significantly lower in P2Y<sub>13</sub>-KO mice compared to wild type controls (*P* < 0.05), indicating that hepatobiliary cholesterol transport is impaired in these mice. Conversely, cangrelor (8 nmol/kg) treatment

Address reprint requests to: Laurent O. Martinez, Ph.D., INSERM U563–CHU Purpan BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: laurent.martinez@inserm.fr; fax: +33 562 748 666.

Copyright © 2010 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.23897

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

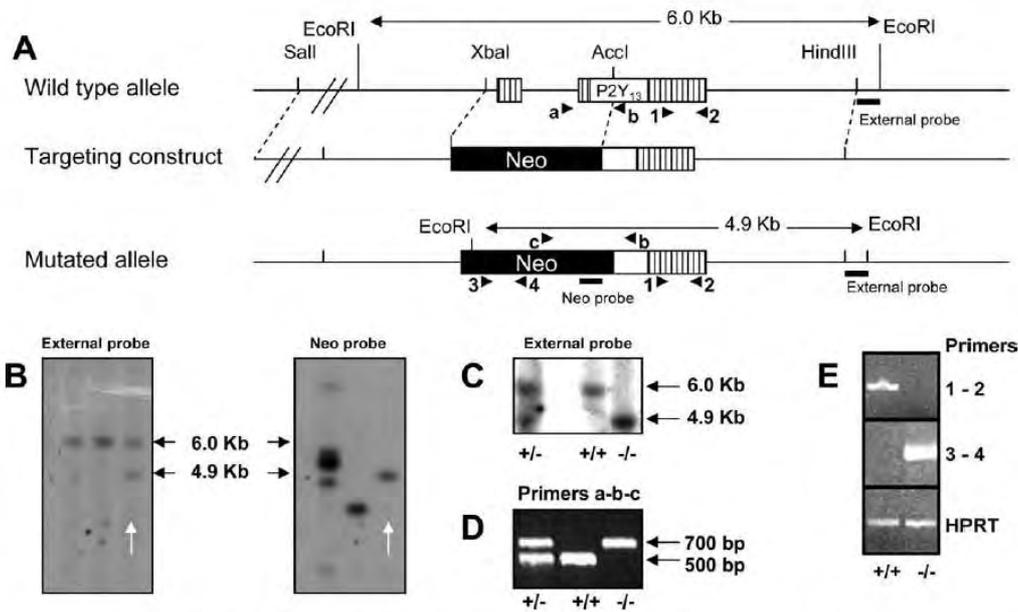


Fig. 1. Gene targeting strategy and characterization of P2Y<sub>13</sub>-deficient mice. (A) Schematic representation of the genomic P2Y<sub>13</sub> locus, the targeting vector, and the mutated P2Y<sub>13</sub> allele. Boxes represent exons. The first noncoding exon and 182 base pairs of the second exon have been replaced by the neomycin resistance cassette in the mutated allele. (B) Screening of the targeted embryonic stem cell clones by Southern blotting. The white arrow highlights a positive clone. (C,D) Genotyping by (C) Southern blotting and (D) polymerase chain reaction (PCR) of litters obtained from P2Y<sub>13</sub> heterozygous breeding. (E) Characterization of the P2Y<sub>13</sub> mutant mice by PCR. Mice (P2Y<sub>13</sub>-KO and control littermates) were tested for the expression in the liver of P2Y<sub>13</sub> mRNA (primers 1-2), Neo (primers 3-4), and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) transcript. Neo, neomycin (resistance cassette); Het, heterozygote; WT, wild-type; KO, knockout.

dramatically increased biliary total cholesterol, bile acid and phospholipid secretion together with bile flow in wild-type and hypomSR-BI-KO<sup>liver</sup> mice but not in P2Y<sub>13</sub>-KO mice (Fig. 3). In both wild-type and P2Y<sub>13</sub>-KO mice, plasma lipid levels remained unchanged over 4 hours after cangrelor treatment (data not shown). This suggests that pharmacological activation of P2Y<sub>13</sub> might stimulate biliary lipid secretion *in vivo* with unchanged plasma lipid levels. This occurred independently of SR-BI, previously reported to mediate biliary cholesterol secretion, without concomitant changes in either biliary bile acid or phospholipid secretion.<sup>9,10</sup>

To test the possibility that P2Y<sub>13</sub> is involved in RCT *in vivo*, [<sup>3</sup>H]cholesterol-loaded peritoneal macrophages from C57BL6/J mice were injected intraperitoneally in P2Y<sub>13</sub> (-/-) and (+/+) mice. The kinetics of [<sup>3</sup>H] counts in plasma were not significantly changed in P2Y<sub>13</sub> (-/-) mice versus (+/+) control mice (Fig. 4A). Likewise, there was no difference in [<sup>3</sup>H]cholesterol count in the liver at the end of the 48-hour period (Fig. 4B), which is consistent with most RCT experiments showing that the tracer amount recovered in the liver after 48 hours is essentially unchanged.<sup>11</sup> Nonetheless, absence of P2Y<sub>13</sub> resulted in a significant

reduction in overall macrophage-to-feces RCT, as reflected by lower counts in feces from both the bile acid and neutral sterol fractions (Fig. 4C).

Table 1. Plasma, Hepatic, and Biliary Lipid Values in Wild-Type and P2Y<sub>13</sub>-KO Mice

	Wild-Type (+/+)	P2Y <sub>13</sub> -KO (-/-)
<b>Plasma (mg/dL)</b>		
Total cholesterol	82 ± 12	79 ± 8
HDL cholesterol	63 ± 7	66 ± 10
Triglycerides	41 ± 12	41 ± 8
<b>Liver (nmol/mg of tissue)</b>		
Free cholesterol	6.01 ± 0.25	4.76 ± 0.31*
Cholesteryl ester	0.46 ± 0.05	0.49 ± 0.35
Triglycerides	7.74 ± 2.04	7.43 ± 2.02
Liver weight (% of body weight)	4.03 ± 0.11	3.84 ± 0.15
<b>Biliary lipid</b>		
Bile flow (μL/minute/100 g body weight)	5.70 ± 0.46	4.34 ± 0.67
Cholesterol secretion (nmol/min/100 g body weight)	2.60 ± 0.20	1.67 ± 0.21*
Bile acid secretion (nmol/minute/100 g body weight)	141 ± 23	94 ± 12
Phospholipid secretion (nmol/minute/100 g body weight)	15.41 ± 1.04	10.46 ± 1.12*

Blood samples were collected from mice fasted for 3 hours. Values are expressed as means ± SEM; n ≥ 10 mice per group for plasma values and n ≥ 6 for liver and biliary lipid values.

\*Indicates significant difference (P < 0.05) from wild-type (+/+) mice.

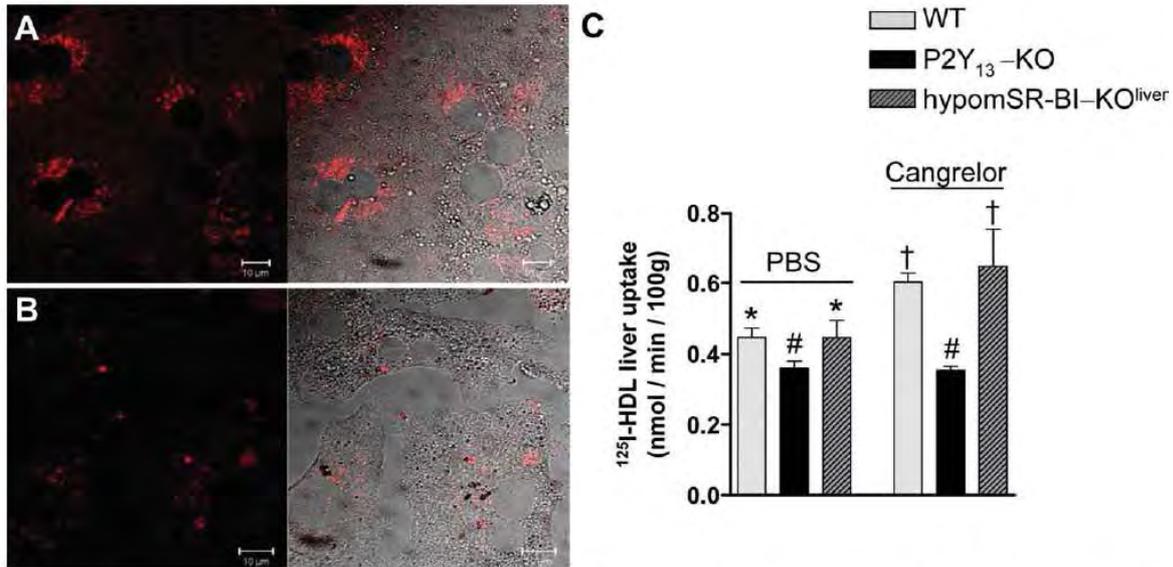


Fig. 2. Effect of P2Y<sub>13</sub> deletion on HDL uptake in murine liver. DyLight<sup>549</sup>-HDL uptake in primary hepatocytes from (A) wild-type or (B) P2Y<sub>13</sub>-KO mice. Cells were incubated for 30 minutes at 37°C with 50 μg/mL DyLight<sup>549</sup>-HDL then washed and processed for fluorescence microscopy as described in Materials and Methods. Right panels represent an overlap of DyLight<sup>549</sup>-HDL staining with the phase contrast image. (C) The <sup>125</sup>I-HDL uptake in liver from wild-type (WT), P2Y<sub>13</sub>-KO, or hypomSR-BI-KO<sup>liver</sup> mice. Mouse livers were perfused for 10 minutes at 37°C in phosphate-buffered saline (PBS) medium containing 50 μg/mL <sup>125</sup>I-HDL with or without 10 μM Cangrelor. Values are expressed as means ± standard errors of the mean (SEM). n = 5-6 mice for each group. P < 0.05 among \*, #, and † groups for each measurement.

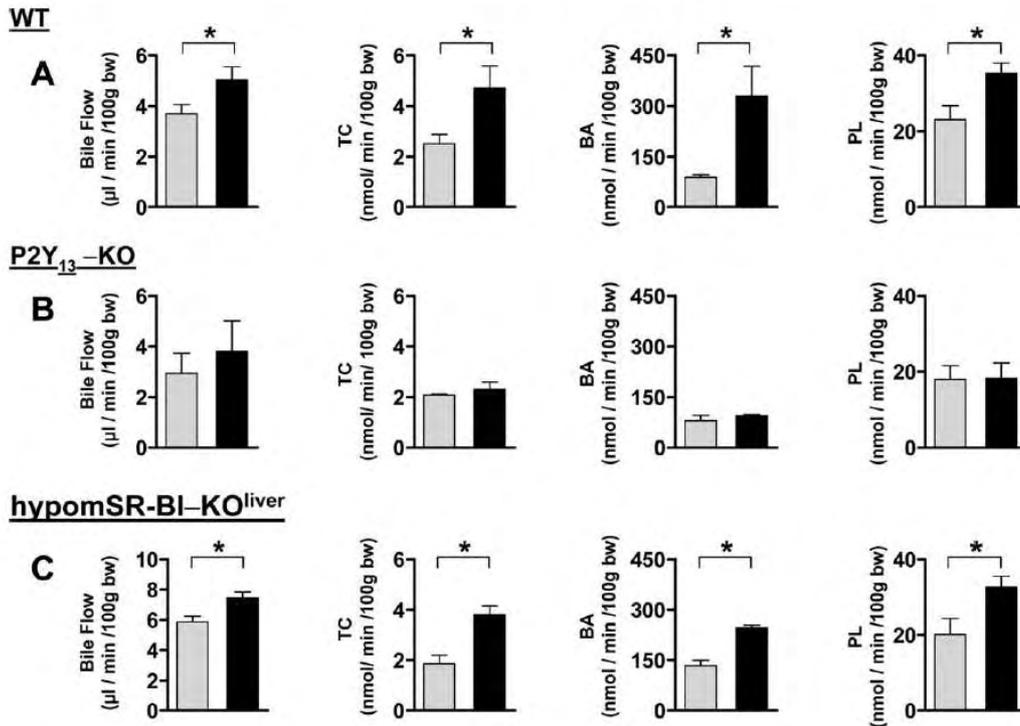


Fig. 3. Biliary lipid secretion rates in response to cangrelor treatment in (A) wild-type, (B) P2Y<sub>13</sub>-KO, and (C) hypomSR-BI-KO<sup>liver</sup> mice. The gallbladder was cannulated and mice were injected with cangrelor (8 nmol/kg body weight [bw], black bars) or PBS (gray bars). Then, the bile was collected for 210 minutes. Total cholesterol (TC), bile acid (BA), and phospholipids (PL) were determined as described in Materials and Methods. Values are expressed as means ± SEM; n = 6, 5, and 4 mice for (A), (B), and (C), respectively. \*Indicates significant difference (P < 0.05) between the cangrelor-treated animals and their corresponding controls.

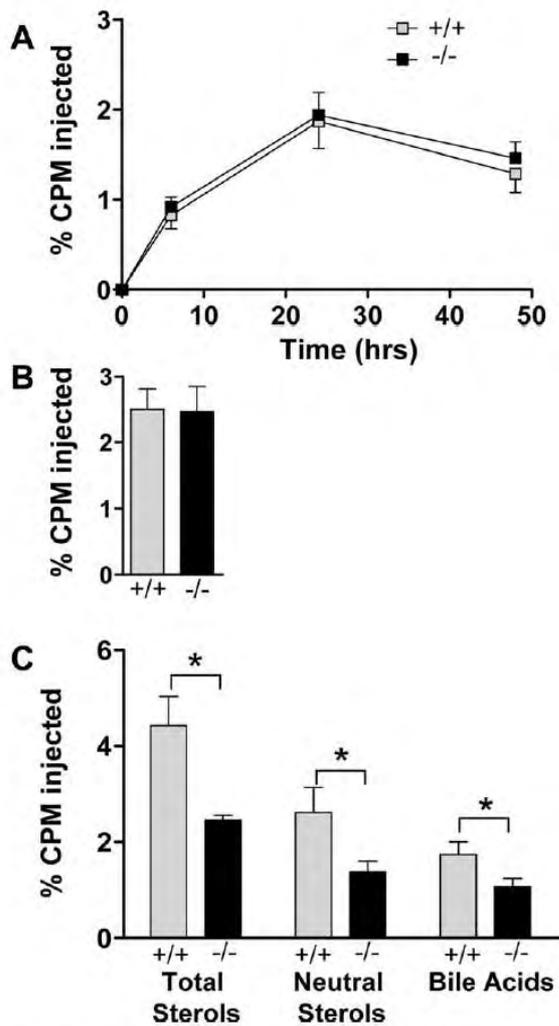


Fig. 4. Effect of P2Y<sub>13</sub> deletion on macrophage-to-feces RCT. Two millions [<sup>3</sup>H]cholesterol-loaded peritoneal macrophages from C57BL/6 mice were injected intraperitoneally in P2Y<sub>13</sub> (-/-) (black squares and bars) and (+/+) (gray squares and bars) mice. (A) Time course of [<sup>3</sup>H]cholesterol content in plasma. Mice were bled 6, 24, and 48 hours after injection with macrophages and counts per minute (CPM) in plasma were assessed directly by liquid scintillation. (B) Liver [<sup>3</sup>H]cholesterol content. At 48 hours after injection with macrophages, mice were killed, and a portion of liver was isolated for <sup>3</sup>H-tracer analysis. (C) Fecal <sup>3</sup>H-tracer distribution. After injection of macrophages, feces were collected continuously from 0 to 48 hours. Fecal bile acid and neutral sterol fractions were separated essentially as described in Materials and Methods and counts in the respective fractions were related to the total amount of feces produced over the whole experimental period. Data are expressed as a percentage of CPM injected ± SEM; n = 6 mice per group. \*P < 0.05 compared with +/+.

Hepatic expression of genes that are involved in cholesterol transport and metabolism was determined to assess potential changes due to P2Y<sub>13</sub> deletion (Table 2). Hepatic messenger RNA (mRNA) expression of

ATP-binding cassette transporters *abca1*, which plays a pivotal role in the efflux of cholesterol to apoA-I, and *abcg1*, which has a similar role in the efflux to HDL,<sup>12,13</sup> were significantly lower in P2Y<sub>13</sub> (-/-) mice compared to (+/+) mice (Table 2; *abca1* -56% ± 5% and *abcg1* -67% ± 7%), suggesting that hepatic HDL biogenesis might be impaired in these mice. However, P2Y<sub>13</sub> deletion had no significant effect on the hepatic mRNA expression of biliary lipid transport proteins *abcg5/abcg8*, bile salt export pump (*abcb11/bsep*), sodium taurocholate cotransporting polypeptide (*ntcp*), and organic anion transport polypeptide (*oatp*). This suggests that the observed lower biliary lipid output in P2Y<sub>13</sub> (-/-) mice was not due to modulation of expression of these lipid transporters. The mRNA levels of the bile acid synthesis enzymes (cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 [*cyp7a1*]; *cyp27a1*; and *cyp8b1*) were unchanged by P2Y<sub>13</sub> deficiency, indicating that the lower biliary cholesterol and phospholipid secretion observed in P2Y<sub>13</sub> (-/-) mice was not due to altered bile acid synthesis. SR-BI expression was also unaffected by the absence of P2Y<sub>13</sub> which, together with the fact that cangrelor still stimulates both hepatic HDL uptake and biliary lipid secretion in mice lacking hepatic SR-BI as in wild-type mice, support the idea of independent P2Y<sub>13</sub> and SR-BI-mediated HDL uptake pathways. No significant change was observed in the sterol regulatory element binding protein 2 target genes, low-density lipoprotein receptor, or 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase mRNA levels in the liver of P2Y<sub>13</sub> (-/-) mice, suggesting that cholesterol derived from HDL and entering the liver via P2Y<sub>13</sub> is not accessible to the endoplasmic reticulum cholesterol pool which regulates hepatic cholesterol synthesis.<sup>14</sup>

### Discussion

These data indicate that P2Y<sub>13</sub> activity is involved in macrophage-to-feces RCT. *In situ* liver perfusion and gallbladder cannulation experiments suggest that this occurs by promoting hepatic HDL uptake and biliary lipid secretion, independently of SR-BI-mediated HDL selective CE uptake. Surprisingly, although hallmark features of RCT are impaired in P2Y<sub>13</sub>-deficient mice, these mice have unchanged HDL cholesterol levels compared to wild-type mice. Thus, the P2Y<sub>13</sub>-dependent RCT pathway might contribute only minimally to the overall plasma HDL levels. In concordance with this observation, ABCA1 expression in macrophages does not seem to be a major contributing factor to plasma HDL levels although ABCA1

**Table 2. Effect of P2Y<sub>13</sub> Deletion on Hepatic mRNA Expression of Genes Involved in Lipid Homeostasis**

Gene Name	Fold-Change	Accession Number	Gene Title
atp5B	1.02 ± 0.04	NM_016774	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
scarb1	0.90 ± 0.08	NM_016741	scavenger receptor class B, type 1
ldlr	0.78 ± 0.1	NM_010700	low density lipoprotein receptor
abca1	<b>0.43 ± 0.05**</b>	NM_013454	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1
abcg1	<b>0.31 ± 0.07**</b>	NM_009593	ATP-binding cassette, subfamily G, member 1
apoa1	1.13 ± 0.09	NM_009692	Apolipoprotein A-I
cyp7a1	1.11 ± 0.11	NM_007824	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
cyp27a1	1.12 ± 0.09	NM_024264	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
cyp8b1	1.14 ± 0.08	NM_010012	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
abcg5	0.97 ± 0.16	NM_031884	ATP-binding cassette, subfamily G, member 5
abcg8	1.19 ± 0.09	NM_026180	ATP-binding cassette, subfamily G, member 8
abcb4/mdr2	0.75 ± 0.05	NM_021022	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 4
abcb11/bsep	1.06 ± 0.06	NM_021022	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 11
ntcp/slc10a1	0.82 ± 0.09	NM_011387	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1
oatp/slc11a1	0.89 ± 0.09	NM_013797	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
hmgcr	0.78 ± 0.12	NM_008255	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
srebp2	1.19 ± 0.09	NM_033218	sterol regulatory element binding transcription factor 2

Real-time PCR was performed on separate livers ( $n \geq 8$ ) of 3-hour-fasted wild-type and P2Y<sub>13</sub>-KO mice (males, 8-10 weeks old, chow diet). For all genes scored, the fold-change was calculated by dividing the KO value by the wild-type value (e.g., a drop of 60% from wild-type is reported as 0.40). Comparison of gene expression values between wild-type and P2Y<sub>13</sub>-KO mice was done with the use of the Student *t* test (two-tailed). The threshold for fold-change was set above 1.5 or below 0.5 and \*\* $P < 0.01$ .

seems to contribute considerably to the efflux of excess cholesterol from these cells.<sup>15</sup> An alternate idea is that compensatory processes might explain why plasma HDL levels are unaltered in P2Y<sub>13</sub>-null mice. Most HDL contributed to the plasma pool is hepatic in origin, mainly through the lipidation of nascent apoA-I by ABCA1,<sup>12,16</sup> the expression of which contributes up to approximately 70% to plasma HDL biogenesis *in vivo*. Recent studies also demonstrate that ABCG1, implicated in cholesterol efflux toward HDL, might also contribute to plasma HDL levels.<sup>13</sup> A possibility is that circulating HDL levels in P2Y<sub>13</sub>-null mice are unaffected, because the decreased HDL uptake is balanced by a decrease in hepatic HDL formation. On the one hand, HDL uptake and thereby catabolism is decreased in P2Y<sub>13</sub>-null mice and, on the other hand, HDL formation in these mice might be lower as reflected by the decreased hepatic ABCA1 and ABCG1 expression. Although not formally tested, these findings are consistent with the overall concept of the role of hepatic ABCA1/ABCG1 in HDL formation.<sup>12,16</sup> The phenotype observed in P2Y<sub>13</sub>-null mice suggests that plasma HDL cholesterol may not always be the most reliable marker for assessing the potential utility of new therapeutic agents targeting HDL. It is thus important to develop effective approaches to evaluate HDL functionality. Our results show that pharmacological activation of P2Y<sub>13</sub> has the potential to raise biliary lipid secretion by enhancing hepatic HDL uptake. An interesting feature is that P2Y<sub>13</sub> activation not only drives biliary cholesterol secretion but also

the secretion of PL and bile acids, which suggest that pharmacological activation of P2Y<sub>13</sub> would not induce cholestasis. If P2Y<sub>13</sub> has similar activity in humans, it may become an attractive target for RCT promotion.

**Acknowledgment:** We thank the technical service of the animal (Genotoul Anexplo Platform) and lipidomic (Metatoul platform) facilities of the Bio-Medical Research Federative Institute of Toulouse (IFR150), Michel Nauze and Corinne Rolland for technical assistance, and Dr. Florence Bietrix (University of Amsterdam, the Netherlands) for support and guidance.

## References

1. Glomset JA, Norum KR. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Adv Lipid Res* 1973;11:1-65.
2. Brundert M, Ewert A, Heeren J, Behrendt B, Ramakrishnan R, Greten H, et al. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:143-148.
3. Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJ. Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem* 2009;284:6093-6100.
4. Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezón E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003;421:75-79.
5. Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, Sak K, Rolland C, Perez C, et al. The nucleotide receptor P2Y<sub>13</sub> is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2508-2515.
6. Huby T, Doucet C, Dacher C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, et al. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest* 2006;116:2767-2776.

7. Portal I, Clerc T, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Lafont H, et al. Importance of high-density lipoprotein-phosphatidylcholine in secretion of phospholipid and cholesterol in bile. *Am J Physiol* 1993;264:G1052-G1056.
8. Robins SJ, Fasulo JM. High density lipoproteins, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *J Clin Invest* 1997;99:380-384.
9. Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type 1-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:170-180.
10. Wiersma H, Gatti A, Nijstad N, Oude Elferink RP, Kuipers F, Tietge UJ. Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice. *HEPATOLOGY* 2009;50:1263-1272.
11. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2006;113:90-97.
12. Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, Kluckman KD, Brunham LR, Mulya A, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005;115:1333-1342.
13. Wiersma H, Nijstad N, de Boer JF, Out R, Hogewerf W, Van Berkel TJ, et al. Lack of Abcg1 results in decreased plasma HDL cholesterol levels and increased biliary cholesterol secretion in mice fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 2009;206:141-147.
14. DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* 2008;18:609-621.
15. Haghpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest* 2001;108:1315-1320.
16. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003;44:296-302.

**Table S1. PCR primers**

	Sequence (5'--3')
P2Y <sub>13</sub>	(1) CAGACTTGATAATGGCAC
P2Y <sub>13</sub>	(2) TCAGAATAAACACAGCCC
Neo	(3) CCGGAACCCCTTAATATAACTTCG
Neo	(4) CAAGCTGATCCTCTAGTCGAGCC
HPRT	F CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG
HPRT	R GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC
gen1	(a) ATCCCCAGCAATTCCACCT
gen2	(b) CCTGCTGTCCTTACTCCTAAACTTC
gen3	(c) GGCTCGACTAGAGGATCAGCTTG

**Table S2. Real-time PCR primers**

Gene	Accession Number	Forward Primer	Reverse Primer
HPRT	NM_013556	TGG GAG GCC ATC ACA TTG T	TCC AGC AGG TCA GCA AAG AA
TBP	NM_003194	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
ATP5B	NM_016774	AGGGATCGATCACCTCGGTG	TCAGGTCATCAGCAGGCACA
SCARB	NM_016741	CGC CGA CCC TGT GTT GTC	GGA TGT CTA GGA ACA AGG AAT GCT
LDLR	NM_010700	GCATCAGCTTGGACAAGGTGT	GGGAACAGCCACCATTGTTG
ABCA1	NM_013454	ATC GTG TCT CGC CTG TTC TCA	GTC CTT AAT GCT GGT ATC TCT TTG G
ABCG1	NM_009593	TCTGAGGGATCTGGTCTGAA	CCCCTGATGCCACTTCCAT
APOA1	NM_009692	TCC TCC TTG GGC CAA CAG	TGA CTA ACG GTT GAA CCC AGA GT
CYP7A1	NM_007824	CAGGGAGATGCTCTGTGTTCA	AGGCATACATCCCTTCCGTGA
CYP27A1	NM_024264	GCCTTGACAAGGAAGTGACT	CGCAGGTCTCCTTAATCACA
CYP8B1	NM_010012	AAGGCTGGCTTCTGAGCTT	AACAGCTCATCGGCCTCATC
ABCG5	NM_031884	TGG CCC TGC TCA GCA TCT	ATTTTAAAGGAATGGCATCTCTT
ABCG8	NM_026180	CCGTGTCAGATTTCCAATGA	GGCTTCCGACCCATGAATG
ABCB11	NM_021022	TGAAGCTACATCTGCCTTAGACACA	CCGACCCTCTCTGGCTTTG
SLC10A1 / Ntcp	NM_011387	ATGACCACCTGCTCCAGCTT	GCCTTTGTAGGGCACCTTGT
SLCO1A2 / Oatp	NM_013797	CAGTCTACGAGTGTGCTCCAGAT	ATGAGGAATACTGCCTCTGAAGTG
HMGCR	NM_008255	CCGGCAACAACAAGATCTGTG	ATGTACAGGATGGCGATGCA
SREBP2	NM_033218	CTGCAGCCTCAAGTGCAAAG	CAGTGTGCCATTGGCTGTCT

### **2-3) Conclusion**

Ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois l'implication physiologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le transport retour du cholestérol *in vivo* chez la souris.

En effet, l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> induit une diminution du transport retour du cholestérol à partir de macrophages chez la souris. Cette diminution est la résultante d'une diminution de la captation hépatique des particules HDL entières qui se traduit par une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides. Les sécrétions en acides biliaires sont également diminuées chez les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> mais de façon non significative. À l'inverse, un traitement avec le Cangrelor, l'agoniste partiel du récepteur P2Y<sub>13</sub>, induit une augmentation de la captation hépatique de particules HDL entières et une augmentation des sécrétions biliaires en cholestérol, acides biliaires et phospholipides chez des souris C57BL/6 et chez les souris invalidées pour SR-B1 au niveau hépatique. Par contre, aucun effet du Cangrelor n'est observé chez les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub>. Ainsi, ces résultats démontrent donc que le récepteur P2Y<sub>13</sub> est impliqué dans la dernière étape du transport retour du cholestérol et qu'une activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> peut induire une augmentation de l'élimination hépatobiliaire du cholestérol indépendamment de SR-B1. Ainsi, si P2Y<sub>13</sub> possède le même rôle chez l'homme, son activation pourrait constituer une stratégie intéressante pour stimuler le RCT.

De façon intéressante, les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> présentent un profil lipidique plasmatique similaire à des souris sauvages et une diminution de l'expression hépatique des ARN messagers d'ABCA1 et ABCG1, deux protéines impliquées dans la biogenèse des HDL. Ces résultats suggèrent donc que le catabolisme des HDL ainsi que la biogenèse des HDL sont diminués chez les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub>. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour vérifier que l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> induit une diminution de la biogenèse des HDL (cf. Perspectives 4-2-1).

### 3) Implication du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose

#### 3-1) Introduction

Comme nous venons de le voir, le récepteur P2Y<sub>13</sub> est impliqué dans le transport retour du cholestérol. Dans la continuité de ce travail, nous avons voulu étudier l'implication de ce récepteur dans le développement de l'athérosclérose. Les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> présentent une diminution du transport retour du cholestérol des macrophages vers les fèces qui est la résultante d'une diminution de la captation hépatique des HDL et d'une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol et acides biliaires. Ces résultats laissent présager un rôle athéroprotecteur de P2Y<sub>13</sub>. En effet, les souris invalidées pour SR-B1 au niveau hépatique présentent une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol et une diminution de la captation sélective du cholestérol ester transporté par les HDL, se traduisant par une diminution du transport retour du cholestérol des macrophages vers les fèces. De plus, ces souris développent des plaques d'athérosclérose de taille plus importante par rapport à des souris sauvages lorsqu'elles sont placées sous régime athéromateux ou lorsqu'elles sont croisées avec des souris invalidées pour l'apoE ou le LDLR (Huby et al., 2006; Kozarsky et al., 2000; Trigatti et al., 1999; Zhang et al., 2005a).

Cependant, contrairement aux souris invalidées pour SR-B1, les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> ne présentent pas de modifications du profil plasmatique en cholestérol et HDL-cholestérol, ce qui laisse penser que la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> est, chez la souris, quantitativement moins importante que la voie SR-B1 (cf. article 2, Tableau 1) (Huby et al., 2006). Nous avons donc voulu déterminer quelles pouvaient être les conséquences d'un tel phénotype sur le développement de l'athérosclérose.

Les souris C57BL/6 peuvent présenter une initiation du développement de l'athérosclérose, lorsqu'elles sont placées sous un régime athéromateux (enrichi en cholestérol et graisses) sur une longue durée de 3 mois (Chiba et al., 2002). Ainsi, pour étudier l'effet de l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> sur le développement de l'athérosclérose, nous avons donc placé les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> sous régime enrichi en cholestérol (1.25%) et graisses (6%) pendant 16 semaines. De plus, nous avons croisé les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> avec des souris invalidées pour l'apoE qui sont fortement susceptibles à l'athérosclérose.

### **3-2) Matériels et Méthodes**

#### **Expérimentation animale**

Les croisements et la stabulation des souris ont été réalisés au sein de l'animalerie de l'IFR30 (Toulouse, Purpan). À l'âge de 8 semaines, les souris ont été placées sous un régime hypercholestérolémiant (High Cholesterol Diet, HCD: 1.25% cholestérol, 6% graisse ; cf. Annexe 2: composition détaillée). Après 16 semaines de régime, les souris ont été sacrifiées après 3 heures de jeûne. Le sang et le cœur des souris ont été prélevés pour réaliser les dosages plasmatiques et les coupes histologiques au niveau du sinus aortique.

Les souris invalidées pour l'apoE et P2Y<sub>13</sub> ont été nourries avec un régime classique et sacrifiées à l'âge de 15 semaines après un jeûne de 3 heures. Au cours du sacrifice, le sang et le cœur ont été prélevés.

#### **Dosage des lipides plasmatiques**

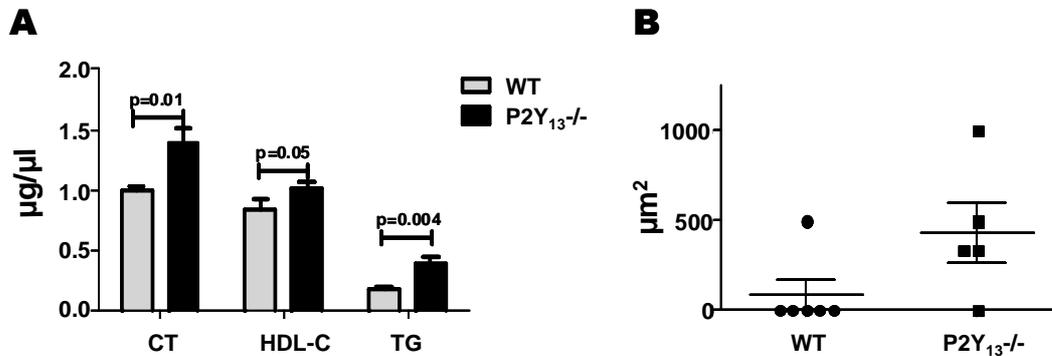
Le sang de chaque animal est collecté en présence d'héparine (10% du volume sanguin) et centrifugé à 4500 rpm pour récupérer le plasma. Les HDL sont séparées des autres lipoprotéines plasmatiques (LDL et VLDL) par la technique de précipitation du phosphotungstate/MgCl<sub>2</sub> (Biolabo). Le cholestérol des HDL ainsi que le cholestérol total sont dosés par la méthode enzymatique CHOD-PAD adaptée aux micro-mesures (Biolabo) et l'absorbance est mesurée à 480nm. Les triglycérides sont dosés par la méthode enzymatique GPO-PAP (Biolabo).

#### **Analyse des plaques d'athérome**

Les cœurs ont été récupérés et placés dans du PBS à 4°C pendant 24h. Ils ont ensuite été inclus dans du gel de protection des tissus et congelés à -80°C. Des coupes de sinus aortique de 10 µm d'épaisseur sont réalisées et montées sur lames à raison de 5 coupes par lame et 10 lames par cœur. Pour chaque cœur, deux lames sont colorées à l'huile rouge (0.5% « red oil » dans de l'isopropanol) pendant 10 minutes. Les noyaux sont ensuite colorés à l'hématoxyline. La taille des lésions d'athérosclérose est quantifiée à l'aide du logiciel Leica Q Win.

### 3-3) Résultats

#### 3-3-1) Implication de P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose en conditions de régime hypercholestérolémiant (HCD)



**Figure 25 : Effet de l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> sur le développement de l'athérosclérose en conditions de régime hypercholestérolémiant**

A) Concentrations plasmatiques en cholestérol, HDL-cholestérol et triglycérides après 16 semaines de régime.

B) Taille des plaques d'athérosclérose au niveau du sinus aortique après 16 semaines de régime

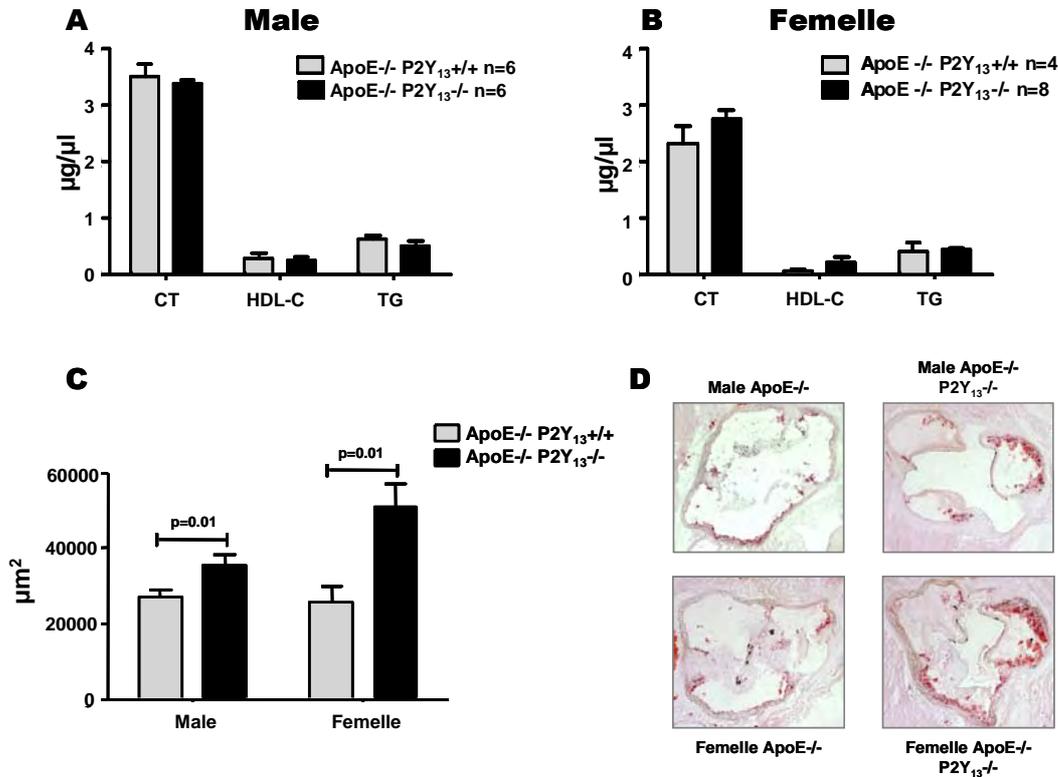
À l'âge de 8 semaines, des souris mâles C57BL/6 ou invalidées pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> ont été placées sous un régime HCD (1.25% cholestérol, 6% graisse) au cours duquel la prise de poids et de nourriture a été contrôlée. La prise de poids et de nourriture est similaire entre les deux groupes de souris au cours des 16 semaines de régime.

Après 16 semaines de régime HCD, les souris invalidées pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> présentent une augmentation des concentrations plasmatiques en cholestérol total, en HDL-cholestérol et triglycérides en comparaison avec des souris sauvages (**Figure 25 A**).

De plus, les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> présentent une augmentation de l'initiation du développement de l'athérosclérose en comparaison à des souris sauvages. En effet, 4 souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> sur 5 présentent une initiation du développement de l'athérosclérose alors que seulement une souris sauvage sur 5 présente une initiation de plaque (**Figure 25 B**).

Ces résultats traduisent donc l'importance de P2Y<sub>13</sub> dans le métabolisme du cholestérol et dans l'initiation du développement de l'athérosclérose.

**3-3-2) Effet de l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> sur le développement de l'athérosclérose chez des souris invalidées pour l'apoE**



**Figure 26: Effet de l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> chez les souris invalidées pour l'apoE sur le développement de l'athérosclérose**

A et B : Concentrations plasmatiques en cholestérol, HDL-cholestérol et triglycérides à l'âge de 15 semaines (A : mâle, B : femelle).

C : Taille des plaques d'athérosclérose au niveau du sinus aortique à l'âge de 15 semaines

D : Photographies de coupes histologiques du sinus aortique colorées à l'huile rouge

À l'âge de 15 semaines, les souris invalidées pour l'apoE et P2Y<sub>13</sub> présentent des concentrations plasmatiques en cholestérol, HDL-cholestérol et triglycérides similaires à des souris uniquement invalidées pour l'apoE (**Figure 26 A et B**). Cependant, malgré un profil plasmatique similaire, les souris invalidées pour l'apoE et P2Y<sub>13</sub> présentent des plaques d'athérosclérose de taille supérieure par rapport aux souris uniquement invalidées pour l'apoE (**Figure 26 C et D**).

Ces résultats démontrent l'implication de P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose sans que celui-ci ne perturbe les profils lipidiques plasmatiques.

### **3-4) Conclusion**

Ces travaux préliminaires suggèrent que le récepteur P2Y<sub>13</sub> est impliqué dans le développement de l'athérosclérose.

Chez les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub>, un régime HCD de 16 semaines induit une augmentation de l'initiation du développement de l'athérosclérose par rapport aux souris sauvages. Le régime HCD induit une augmentation des concentrations plasmatiques en cholestérol total, HDL-cholestérol et triglycérides chez les souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages (**Figure 25 A**) alors qu'aucune différence de profil lipidique plasmatique n'apparaissait sous régime normal (**chow diet, Article 2 Tableau 1**). Il est possible que les éventuels mécanismes de compensation mis en place pour maintenir une cholestérolémie normale sous régime "chow diet" (c'est-à-dire diminution de l'expression hépatique d'ABCA1/G1, cf. **Article 2, Tableau 2**) soient inexistants ou insuffisants en conditions de stress hypercholestérolémique pour maintenir des taux de lipides plasmatiques identiques aux souris sauvages. Bien que les taux de HDL-cholestérol soient plus élevés chez les souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup> sous régime HCD, ces souris sont davantage susceptibles à l'athérosclérose par rapport aux souris sauvages. Ainsi, de façon identique aux modèles animaux établis avec SR-B1 (Huby et al., 2006; Kozarsky et al., 2000; Trigatti et al., 1999), cette étude va à l'encontre du dogme qui veut que les taux plasmatiques de HDL soient inversement corrélés avec l'incidence des maladies cardiovasculaires. Ces travaux soutiennent donc l'idée qu'une stimulation du transport retour du cholestérol en augmentant la captation des HDL par le foie pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique pour la prévention et le traitement de l'athérosclérose.

L'invalidation de P2Y<sub>13</sub> chez des souris invalidées pour l'apoE, confirme l'implication de P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose. En effet, les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> et l'apoE (mâles et femelles) présentent des lésions d'athérosclérose de taille plus importante que des souris uniquement invalidées pour l'apoE. Des études complémentaires sont en cours sur ce dernier modèle afin de vérifier que le phénotype obtenu est bien corrélé à une diminution du RCT (cf. Perspectives 4-2-2).

#### **4) Perspectives générales**

La voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> est une nouvelle voie d'endocytose hépatique des HDL. Nos travaux ont permis de mettre en évidence à la surface des hépatocytes humains une activité adénylate kinase qui régule constitutivement et négativement l'endocytose des HDL dépendante de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase et de P2Y<sub>13</sub>. Nous avons également démontré l'implication physiologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le processus de transport retour du cholestérol *in vivo* chez la souris. Des résultats préliminaires suggèrent également que le récepteur P2Y<sub>13</sub> joue un rôle protecteur dans le développement de l'athérosclérose. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives de recherche qui permettront de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette voie et leurs régulations et de valider un certain nombre de cibles thérapeutiques pour le traitement de l'athérosclérose.

#### **4-1) Voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>: mécanismes moléculaires et régulations**

##### **4-1-1) Caractérisation de la protéine à activité adénylate kinase à la surface des hépatocytes**

L'activité AK (2ADP → ATP + AMP) que nous avons mis en évidence à la surface des hépatocytes régule de façon constitutive et négativement l'endocytose des HDL en consommant l'ADP généré par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase (cf. Chapitre III, Article 1).

Les ABC transporteurs sont des candidats potentiels pour cette activité AK de surface cellulaire. En effet, les domaines de liaison des nucléotides (NBD domains) du CFTR, un ABC transporteur présent au niveau de la membrane plasmique, sont capables de catalyser *in vitro* l'activité AK (Ramjeesingh et al., 2008; Randak and Welsh, 2003). De même, un autre membre de la famille ABC, Rad50, qui est étroitement associé avec une exo-endonucléase Mre11, possède non seulement une activité ATP hydrolase mais également une activité AK (Bhaskara et al., 2007).

Nos résultats préliminaires avec le glyburide, un inhibiteur des ABC transporteur, et avec l'agoniste du LXR connu pour induire une augmentation de la transcription de différents ABC transporteurs, suggèrent que l'activité AK à la surface des hépatocytes pourrait être la résultante de l'activité d'un ABC transporteur. Cependant, le glyburide est un inhibiteur peu spécifique capable d'inhiber également des canaux potassiques ATP dépendant (Niki et al., 1990), et le GW3965 peut induire l'expression de protéines différentes des ABC transporteurs. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si l'activité AK correspond réellement à l'activité d'un ABC transporteur. Nous pourrions

notamment vérifier que l'augmentation de l'activité AK observée après un traitement au GW3965 peut être inhibée par le glyburide.

Différents ABC transporteurs sont exprimés à la surface des hépatocytes dont certains jouent un rôle important au niveau de la membrane basolatérale dans le métabolisme du cholestérol et pourraient donc être responsables de cette activité AK. Parmi ces ABC transporteurs, ABCA1 et ABCG1, en particulier, sont impliqués dans la biogenèse des HDL et leur expression est régulée par LXR. Des expériences de quantification des nucléotides extracellulaires sur des hépatocytes humains transfectés avec un vecteur exprimant le shRNA (short hairpin RNA) de ABCA1 ou ABCG1 seront nécessaires pour étudier l'implication de l'un de ces ABC transporteurs dans l'activité AK. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que cette activité soit due à un autre ABC transporteur.

Une isoforme d'AK, l'AK1 $\beta$ , a été localisée à la membrane plasmique de différents types cellulaires (Collavin et al., 1999; Ruan et al., 2002). Nous envisageons donc de vérifier sa présence au niveau de la membrane plasmique d'hépatocytes humains ainsi que son implication dans l'internalisation des HDL.

#### **4-1-2) Adressage de la F<sub>1</sub>-ATPase à la membrane plasmique**

Divers travaux, dont ceux de notre équipe, ont démontré la présence de plusieurs sous-unités de la F<sub>1</sub>-ATPase au niveau de la membrane plasmique de différents modèles cellulaires (hépatocytes, kératinocytes, ostéoblastes, cellules endothéliales...) (cf. Chapitre I, paragraphe 4-4-2-2). Ces résultats sont surprenants puisque l'ATP synthase est connue comme étant un complexe protéique majeur du feuillet interne de la mitochondrie. Il est important de noter que la F<sub>1</sub>-ATPase à la surface de différents modèles cellulaires est fonctionnelle, du moins en termes d'activité ATPase, suggérant que la structure globale de l'enzyme est proche de celle de la mitochondrie.

La plupart des sous-unités de l'ATP synthase mitochondriale sont codées par le génome nucléaire et possèdent un peptide signal d'import à la mitochondrie. Une des hypothèses pour expliquer l'adressage de sous-unités de l'ATP synthase à la surface cellulaire pourrait être que ces sous-unités soient directement adressées à la membrane plasmique grâce à un peptide signal différent du peptide signal d'import mitochondrial. Cependant, au vu du nombre important de sous-unités de l'ATP synthase et de protéines mitochondriales présentes à la surface cellulaire, cette hypothèse paraît peu probable. De ce fait, l'hypothèse mise en avant dans notre équipe est la présence d'un transport vésiculaire entre la mitochondrie et la

membrane plasmique qui participerait à l'adressage de la  $F_1$ -ATPase à la surface cellulaire. L'existence de vésicules d'origine mitochondriale et de nouvelles voies de transport au départ de la mitochondrie est de plus en plus documentée dans la littérature. Une nouvelle protéine MAPL (Mitochondria-Anchored Protein Ligase) a d'ailleurs été récemment caractérisée dans des vésicules d'origine mitochondriale impliquées dans une nouvelle voie de transport intracellulaire allant des mitochondries vers le péroxisome (Neuspiel et al., 2008).

Dans la mitochondrie, l'ATP synthase est localisée dans la membrane interne et est particulièrement enrichie dans des domaines spécialisés appelés "sites de contact" constitués de membrane externe intacte associée avec de la membrane interne altérée (Hoppel et al., 2002). De façon intéressante, les "sites de contact" participent aux processus de fusion et fission mitochondriale impliqués dans la dynamique mitochondriale (Reichert and Neupert, 2002). La dynamique mitochondriale est contrôlée par diverses protéines, parmi lesquelles les mitofusines et OPA1 (Optic atrophy protein 1), des GTPases qui participent aux événements de fusion mitochondriale mais également Fis1 (Mitochondrial fission 1 protein) et Drp1 (Dynamin-related protein 1) qui régulent les événements de fusion et de fission (Chen and Chan, 2005). Ces différentes protéines pourraient donc contribuer à la formation de vésicules d'origine mitochondriale et à leur fusion avec la membrane plasmique.

Afin d'élucider le mécanisme d'adressage de la  $F_1$ -ATPase à la surface cellulaire, des protéines de fusion fluorescentes des différentes sous-unités de l'ATP synthase ont été générées afin de suivre leur dynamique en temps réel par vidéo-microscopie et de mettre en évidence des populations de vésicules d'origine mitochondriale contenant la  $F_1$ -ATPase ainsi que d'éventuels événements de fusion avec la membrane plasmique.

Afin d'identifier des protéines impliquées dans l'adressage de la  $F_1$ -ATPase à la membrane plasmique, une approche de criblage siRNA à grande échelle pourra être entreprise par microscopie confocale à l'aide des protéines de fusion fluorescentes des différentes sous-unités de l'ATP synthase. Dans un premier temps, l'expression des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale et dans le transport vésiculaire pourra être ciblée.

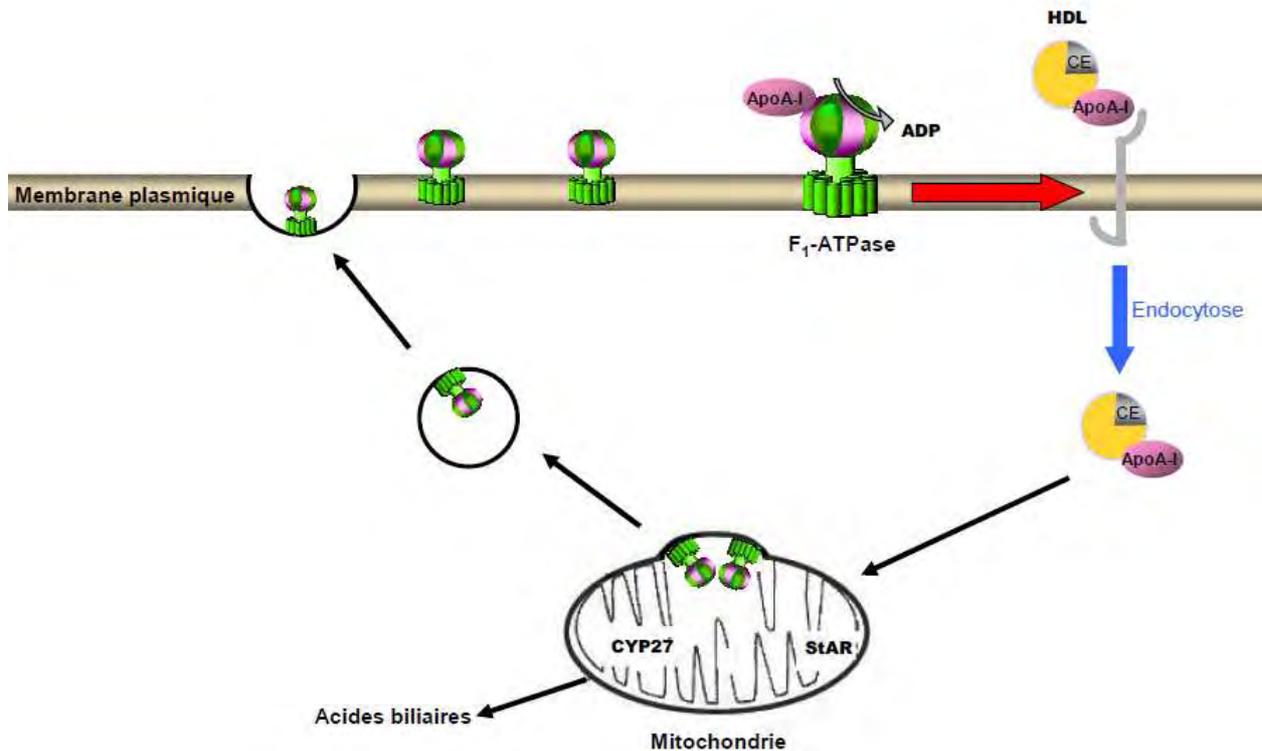
#### **4-1-3) Régulation de l'expression de la $F_1$ -ATPase en surface cellulaire**

Il est bien établi que la voie du LDL récepteur est régulée par les taux de cholestérol intracellulaire. La  $F_1$ -ATPase étant impliquée dans la captation des HDL par les hépatocytes, son expression au niveau de la membrane plasmique pourrait être également régulée par les taux cellulaires en cholestérol dans les hépatocytes.

Trois sources de cholestérol intracellulaire sont susceptibles d'intervenir :

- le cholestérol néosynthétisé *via* la voie de l'HMG-CoA réductase
- les stocks intracellulaires qui se trouvent majoritairement dans le réticulum endoplasmique
- le cholestérol de la mitochondrie

Au vu de notre hypothèse sur l'existence d'un adressage de la F<sub>1</sub>-ATPase de la mitochondrie vers la membrane plasmique par la fusion de vésicules d'origine mitochondriale avec la membrane plasmique, on peut envisager que l'expression à la surface cellulaire de la F<sub>1</sub>-ATPase soit régulée par le contenu en cholestérol de la membrane interne mitochondriale. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le cholestérol transporté par les HDL sert préférentiellement à la biosynthèse des acides biliaires, qui se déroule en partie dans la mitochondrie (Botham and Bravo, 1995). En effet, la voie dite « acide » de synthèse des acides biliaires fait intervenir la stérol 27-hydrolase mitochondriale (ou CYP27A1). Dans cette voie, le transport du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne mitochondriale, qui est pauvre en cholestérol, constitue l'étape limitante (Pandak et al., 2002). Le contenu en cholestérol de la membrane interne est régulé par la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) qui transporte le cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie (Christenson and Strauss, 2000). Il serait donc intéressant d'analyser l'effet d'une augmentation du contenu en cholestérol dans la membrane interne de la mitochondrie, par surexpression de la protéine StAR par exemple, sur l'expression de la F<sub>1</sub>-ATPase à la surface des hépatocytes. Cette étude pourrait permettre de mettre en évidence un mécanisme de rétrocontrôle positif de l'élimination du cholestérol dans lequel le contenu en cholestérol de la membrane interne mitochondriale activerait à la fois la synthèse des acides biliaires par CYP27A1 et l'endocytose des HDL en adressant la F<sub>1</sub>-ATPase à la surface cellulaire (**Figure 27**).



**Figure 27: Mécanisme proposé de rétrocontrôle positif de l'élimination biliaire du cholestérol**

Dans le mécanisme hypothétique proposé dans la figure 27, le cholestérol des HDL serait transporté à la mitochondrie où il pourrait servir préférentiellement de substrat à CYP27A1, ce qui pourrait expliquer l'orientation spécifique du cholestérol des HDL vers les voies biliaires (Botham and Bravo, 1995).

#### **4-2) Voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> et l'athérosclérose**

##### **4-2-1) P2Y<sub>13</sub> et la biogenèse des HDL**

Au travers de l'étude des différents gènes régulés lors de l'inactivation de P2Y<sub>13</sub>, nous avons pu observer une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines ABCA1 et ABCG1 qui sont toutes deux impliquées dans l'efflux du cholestérol cellulaire (cf. Chapitre I). L'induction de la modulation de l'expression d'ABCA1 et ABCG1 sous-entend que l'endocytose du cholestérol par la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> est qualitativement importante puisqu'une modulation de celle-ci entraîne des adaptations géniques importantes.

Le transporteur ABCA1 participe en particulier à l'efflux du cholestérol cellulaire vers l'apoA-I délipidée et donc à la néo-formation des HDL au niveau hépatique. Nous pouvons

donc proposer que lors de l'invalidation de P2Y<sub>13</sub>, la diminution de la captation hépatique des HDL pourrait être compensée par une diminution de la production hépatique des HDL *via* ABCA1. Ce mécanisme de compensation permettrait d'expliquer le phénotype des animaux invalidés pour P2Y<sub>13</sub> qui présentent une diminution de la captation hépatique des HDL sans modification des concentrations plasmatiques en HDL-cholestérol (cf. Article 2).

Pour valider cette hypothèse, des expériences comparant l'efflux de cholestérol radiomarqué à partir d'hépatocytes primaires de souris sauvages ou de souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> vers l'apoA-I sont nécessaires. Pour confirmer la présence de ce mécanisme de compensation chez l'homme des expériences similaires pourront être réalisées à l'aide d'hépatocytes primaires humains ou de cellules HepG<sub>2</sub> transfectées avec un shRNA ciblant le récepteur P2Y<sub>13</sub>.

La régulation de l'expression d'ABCA1 et ABCG1 *via* P2Y<sub>13</sub> pourrait être une stratégie intéressante pour moduler le transport retour du cholestérol en stimulant la biogenèse des HDL et l'efflux de cholestérol. Il serait donc intéressant de voir si une activation de P2Y<sub>13</sub> induit, à l'inverse de son invalidation, une augmentation de l'expression de ces deux transporteurs de cholestérol. À ce jour, la modulation de l'expression d'ABCA1 n'est pas encore utilisée en thérapeutique au vu des effets indésirables des agonistes du LXR tels que l'hypertriglycéridémie causée principalement par une activation des voies de synthèse hépatique des acides gras et l'augmentation des taux de LDL-cholestérol (cf. Chapitre II, paragraphe 2-2-3-1). Si l'activation de P2Y<sub>13</sub> induit une augmentation de l'expression d'ABCA1, elle pourrait donc permettre de cibler de manière spécifique à la fois la captation hépatique des HDL mais aussi la biogenèse des HDL par le foie.

#### **4-2-2) P2Y<sub>13</sub>, RCT et développement de l'athérosclérose**

Nous avons montré que l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> chez des souris susceptibles à l'athérosclérose (ApoE<sup>-/-</sup>) induit une augmentation de la taille des lésions athéromateuses (cf. Chapitre III, paragraphe 3-3-2). Il est donc important de vérifier que l'effet de P2Y<sub>13</sub> sur le développement de l'athérosclérose est la résultante de son implication dans le RCT. Pour cela, nous envisageons de réaliser des mesures de flux biliaire et de transport retour du cholestérol (type "macrophage to feces") chez les animaux doublement invalidés pour P2Y<sub>13</sub> et l'apoE en comparaison avec des souris invalidées uniquement pour l'apoE.

### **4-2-3) P2Y<sub>13</sub> et l'inflammation**

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, l'inflammation joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. Au niveau de l'espace sous-endothélial, la stimulation de l'inflammation par les LDLox induit le recrutement et l'activation des macrophages et des cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigènes qui vont elles-mêmes activer des lymphocytes T qui vont relarguer des cytokines pro-inflammatoires. Ces différents types cellulaires vont participer à la formation de la plaque en coordonnant leurs actions. Un grand nombre de récepteurs nucléotidiques est exprimé à la surface de ces cellules et peut jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose (Wang et al., 2004). Par exemple, le récepteur P2Y<sub>11</sub> module l'activation des monocytes et donc la réponse inflammatoire en inhibant la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires induites par l'activation des TLRs, et en augmentant la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Kaufmann et al., 2005). Amisten *et al* ont montré qu'un polymorphisme du récepteur P2Y<sub>11</sub> est associé avec une augmentation du risque d'accidents cardiovasculaires qui pourrait être la résultante d'une augmentation des taux de protéine C-réactive qui est un marqueur de l'inflammation (Amisten et al., 2007). Le récepteur P2Y<sub>6</sub> est également impliqué dans l'inflammation. Il a été montré que les macrophages issus de souris invalidées pour P2Y<sub>6</sub> ne répondent plus à l'effet potentialisateur de l'UDP sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et MIP-2 (Macrophage-Inflammatory Protein-2) (Bar et al., 2008).

Il a été montré que le récepteur P2Y<sub>13</sub> est lui aussi exprimé à la surface de différentes cellules du système immunitaire (monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes T) (Zhang et al., 2002a). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'implication du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le processus d'inflammation au cours du développement de l'athérosclérose. Pour cela, des transferts de moelle osseuse de souris invalidées seulement pour l'apoE dans des souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> et l'apoE préalablement irradiées pourront être réalisés. Ainsi, le développement de l'athérosclérose pourra être comparé entre des souris invalidées totalement pour P2Y<sub>13</sub> (ApoE<sup>-/-</sup> P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>) et des souris exprimant seulement P2Y<sub>13</sub> au niveau des cellules du système immunitaire. Notamment, différents paramètres pourront être analysés sur des coupes de sinus aortiques tels que la taille des lésions (coloration à l'huile rouge) et l'infiltration des macrophages (marquage anti-MOMA-2) et des lymphocytes T (marquage anti-CD3).

#### **4-2-4) Effet de l'activation de P2Y<sub>13</sub> sur le RCT et l'athérosclérose**

Nous avons observé que l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> induit une diminution de la captation hépatique des HDL qui se traduit par une diminution de l'élimination biliaire du cholestérol et du RCT. Nous avons également observé que l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> par le Cangrelor induit une augmentation de la captation hépatique des HDL et une augmentation de l'élimination biliaire du cholestérol. Ces résultats suggèrent donc qu'une activation de P2Y<sub>13</sub> pourrait induire une stimulation du RCT. Il serait donc intéressant de vérifier cela par la méthode développée par le Pr. Rader qui consiste à injecter des macrophages chargés en cholestérol radiomarqué dans le péritoine des souris et à suivre son élimination dans les fèces pendant 48 heures. Du fait du temps de demi-vie très court du Cangrelor ( $t_{1/2} < 9\text{min}$  chez l'homme) (Storey et al., 2001), il serait judicieux de placer en sous-cutané des pompes osmotiques de type Alzet®, qui permettraient sa diffusion de façon continu tout le long de l'expérience.

De plus, les pompes Alzet® offrant la possibilité de traiter l'animal sur des périodes allant de quelques jours à 2 mois, les effets d'une activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> avec le Cangrelor sur le développement de l'athérosclérose pourront également être étudiés chez des souris susceptibles à l'athérosclérose (ApoE<sup>-/-</sup> ou LDLR<sup>-/-</sup>). Au préalable, il faudra vérifier l'effet du Cangrelor sur la désensibilisation du récepteur P2Y<sub>13</sub>.

#### **4-2-5) Etude du RCT et du développement de l'athérosclérose dans un modèle invalidé pour P2Y<sub>13</sub> et SR-B1**

Nos travaux ont démontré que la voie d'endocytose des HDL *via* le récepteur P2Y<sub>13</sub> est indépendante de la captation sélective du cholestérol ester *via* SR-B1 (cf. Article 2). En effet, une activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> avec le Cangrelor induit une augmentation de la captation hépatique de HDL radiomarquées et de l'élimination biliaire du cholestérol de façon similaire chez des souris sauvages et des souris invalidées pour SR-B1 au niveau hépatique. Il serait donc intéressant de croiser des souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> avec des souris invalidées pour SR-B1 au niveau hépatique pour étudier l'effet de la double inactivation sur le RCT et le développement de l'athérosclérose. Ce modèle permettra de vérifier si ces deux voies sont indépendantes ou s'il existe des phénomènes de compensation entre chacune de ces voies.

#### **4-2-6) Etude du développement de l'athérosclérose et du RCT dans un modèle "humanisé"**

Le modèle murin est un bon modèle d'étude *in vivo* par sa taille et sa vitesse de reproduction. Cependant, le métabolisme des lipoprotéines de ces animaux est très différent de celui de l'homme, notamment en raison de l'absence totale de CETP. Ainsi, pour l'étude de l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> dans un modèle plus proche de la physiologie humaine, des souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> pourront être croisées avec des souris transgéniques pour la CETP.

Le lapin apparaît également comme un meilleur modèle pour l'étude du métabolisme du cholestérol puisque cet animal est naturellement susceptible à l'athérosclérose et qu'il possède une activité CETP qui lui confère un profil lipoprotéique proche de l'homme. Ce modèle animal pourrait être utilisé pour étudier l'effet du Cangrelor sur le RCT et le développement de l'athérosclérose.

Une autre différence entre l'homme et la souris est l'expression hépatique de NPC1L1. Alors que chez l'homme NPC1L1 est exprimé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, chez la souris NPC1L1 est présent seulement au niveau entérocytaire. Au niveau hépatique, NPC1L1 semble jouer un rôle dans la réabsorption du cholestérol de la bile vers l'hépatocyte. En effet, l'expression hépatique de NPC1L1 chez la souris, entraîne une diminution importante de la concentration de cholestérol biliaire et le traitement de ces souris avec l'Ezetimibe (inhibiteur de NPC1L1) restaure des concentrations biliaires en cholestérol similaires à des souris sauvages (Temel et al., 2007). Ainsi, en réabsorbant le cholestérol dans la bile, NPC1L1 pourrait contrecarrer les effets bénéfiques d'une activation de P2Y<sub>13</sub> sur l'élimination biliaire du cholestérol. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de la modulation du récepteur P2Y<sub>13</sub> sur la régulation des sécrétions biliaires et du transport retour du cholestérol chez ce modèle de souris exprimant NPC1L1 au niveau hépatique. Si NPC1L1 s'avère inhiber les effets bénéfiques d'une activation du récepteur P2Y<sub>13</sub>, l'association d'un activateur de P2Y<sub>13</sub> avec l'Ezetimibe pourrait être envisagée comme stratégie thérapeutique chez l'homme.

#### **4-2-7) P2Y<sub>13</sub> : une nouvelle cible en thérapeutique humaine ?**

Bien que des études complémentaires soient nécessaires, nos résultats suggèrent que le récepteur P2Y<sub>13</sub> est une potentielle cible thérapeutique dans la lutte contre l'athérosclérose en jouant un rôle clé dans le RCT. Au vu du profil d'expression limité du récepteur P2Y<sub>13</sub> (foie, rate, cerveau), des molécules activatrices de P2Y<sub>13</sub> pourraient facilement activer le récepteur hépatique sans moduler l'activité des récepteurs P2Y<sub>13</sub> extra-hépatiques en étant dégradées au

cours de leur passage dans le foie. Actuellement, la seule molécule agoniste de P2Y<sub>13</sub> est le Cangrelor. Cependant, l'utilisation de cette molécule en thérapeutique est dépendante de son faible temps de demi-vie plasmatique chez l'homme ( $t_{1/2} < 9\text{min}$ ) (Storey et al., 2001) qui obligerait son administration par voie intraveineuse. De plus, le Cangrelor n'est pas spécifique du récepteur P2Y<sub>13</sub>, il est également un antagoniste du récepteur P2Y<sub>12</sub>, impliqué dans l'agrégation plaquettaire. Au vu du manque de spécificité du Cangrelor et de sa faible stabilité, il apparaît donc nécessaire de rechercher d'autres agonistes du récepteur P2Y<sub>13</sub>.





# **BIBLIOGRAPHIE**



(2000). Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *Circulation* 102, 21-27.

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., *et al.* (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* 58, 281-341.

AbuMweis, S.S., Vanstone, C.A., Lichtenstein, A.H., and Jones, P.J. (2009). Plant sterol consumption frequency affects plasma lipid levels and cholesterol kinetics in humans. *Eur J Clin Nutr* 63, 747-755.

Acton, S., Osgood, D., Donoghue, M., Corella, D., Pocovi, M., Cenarro, A., Mozas, P., Keilty, J., Squazzo, S., Woolf, E.A., *et al.* (1999). Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 1734-1743.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* (New York, NY 271, 518-520.

Agellon, L.B., Drover, V.A., Cheema, S.K., Gbaguidi, G.F., and Walsh, A. (2002). Dietary cholesterol fails to stimulate the human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 277, 20131-20134.

Aiello, R.J., Brees, D., Bourassa, P.A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpassand, M., and Francone, O.L. (2002). Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 630-637.

Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Bjorkhem, I., Pettersson, S., and Gustafsson, J.A. (2001). Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXR $\beta$ -deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 107, 565-573.

Alexander, E.T., Weibel, G.L., Joshi, M.R., Vedhachalam, C., de la Llera-Moya, M., Rothblat, G.H., Phillips, M.C., and Rader, D.J. (2009). Macrophage reverse cholesterol transport in mice expressing ApoA-I Milano. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1496-1501.

Alrefai, W.A., and Gill, R.K. (2007). Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharmaceutical research* 24, 1803-1823.

Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., *et al.* (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* (New York, NY 303, 1201-1204.

Amisten, S., Meidute-Abaraviciene, S., Tan, C., Olde, B., Lundquist, I., Salehi, A., and Erlinge, D. ADP mediates inhibition of insulin secretion by activation of P2Y13 receptors in mice. *Diabetologia* 53, 1927-1934.

Amisten, S., Melander, O., Wihlborg, A.K., Berglund, G., and Erlinge, D. (2007). Increased risk of acute myocardial infarction and elevated levels of C-reactive protein in carriers of the Thr-87 variant of the ATP receptor P2Y11. *European heart journal* 28, 13-18.

Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Suchy, F.J. (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *The Journal of biological chemistry* 276, 28857-28865.

Ansell, B.J., Navab, M., Hama, S., Kamranpour, N., Fonarow, G., Hough, G., Rahmani, S., Mottahedeh, R., Dave, R., Reddy, S.T., *et al.* (2003). Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 108, 2751-2756.

Arakawa, R., Tamehiro, N., Nishimaki-Mogami, T., Ueda, K., and Yokoyama, S. (2005). Fenofibric acid, an active form of fenofibrate, increases apolipoprotein A-I-mediated high-density lipoprotein biogenesis by enhancing transcription of ATP-binding cassette transporter A1 gene in a liver X receptor-dependent manner. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1193-1197.

Axelsson, M., and Sjovall, J. (1990). Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem* 36, 631-640.

Azuma, Y., Takada, M., Shin, H.W., Kioka, N., Nakayama, K., and Ueda, K. (2009). Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes Cells* 14, 191-204.

Badellino, K.O., Wolfe, M.L., Reilly, M.P., and Rader, D.J. (2006). Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis. *PLoS Med* 3, e22.

Badimon, J.J., Badimon, L., and Fuster, V. (1990). Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *The Journal of clinical investigation* 85, 1234-1241.

Baigent, C., Keech, A., Kearney, P.M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R., *et al.* (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366, 1267-1278.

Bailey, D., Jahagirdar, R., Gordon, A., Hafiane, A., Campbell, S., Chatur, S., Wagner, G.S., Hansen, H.C., Chiacchia, F.S., Johansson, J., *et al.* RVX-208: a small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo. *J Am Coll Cardiol* 55, 2580-2589.

- Baker, P.W., Rye, K.A., Gamble, J.R., Vadas, M.A., and Barter, P.J. (2000). Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of lipid research* 41, 1261-1267.
- Ballatori, N., Christian, W.V., Lee, J.Y., Dawson, P.A., Soroka, C.J., Boyer, J.L., Madejczyk, M.S., and Li, N. (2005). OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42, 1270-1279.
- Bar, I., Guns, P.J., Metallo, J., Cammarata, D., Wilkin, F., Boeynants, J.M., Bult, H., and Robaye, B. (2008). Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology* 74, 777-784.
- Barbaras, R., Collet, X., Chap, H., and Perret, B. (1994). Specific binding of free apolipoprotein A-I to a high-affinity binding site on HepG2 cells: characterization of two high-density lipoprotein sites. *Biochemistry* 33, 2335-2340.
- Barrans, A., Collet, X., Barbaras, R., Jaspard, B., Manent, J., Vieu, C., Chap, H., and Perret, B. (1994). Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *The Journal of biological chemistry* 269, 11572-11577.
- Barter, P. (2000). CETP and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 2029-2031.
- Barter, P., Gotto, A.M., LaRosa, J.C., Maroni, J., Szarek, M., Grundy, S.M., Kastelein, J.J., Bittner, V., and Fruchart, J.C. (2007a). HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *The New England journal of medicine* 357, 1301-1310.
- Barter, P.J., Brandrup-Wognsen, G., Palmer, M.K., and Nicholls, S.J. Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database. *Journal of lipid research* 51, 1546-1553.
- Barter, P.J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S.M., Kastelein, J.J., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., Mosca, L., Tardif, J.C., Waters, D.D., *et al.* (2007b). Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *The New England journal of medicine* 357, 2109-2122.
- Barter, P.J., and Kastelein, J.J. (2006). Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and management of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 47, 492-499.
- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science (New York, NY)* 290, 1771-1775.
- Berthou, L., Duverger, N., Emmanuel, F., Langouet, S., Auwerx, J., Guillouzo, A., Fruchart, J.C., Rubin, E., Deneffe, P., Staels, B., *et al.* (1996). Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 97, 2408-2416.

Bhaskara, V., Dupre, A., Lengsfeld, B., Hopkins, B.B., Chan, A., Lee, J.H., Zhang, X., Gautier, J., Zakian, V., and Paull, T.T. (2007). Rad50 adenylate kinase activity regulates DNA tethering by Mre11/Rad50 complexes. *Molecular cell* 25, 647-661.

Bielicki, J.K., and Oda, M.N. (2002). Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 41, 2089-2096.

Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Comera, C., Schaak, S., Barbaras, R., Groen, A.K., Perret, B., *et al.* (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *The Journal of biological chemistry* 281, 7214-7219.

Blair, A., Shaul, P.W., Yuhanna, I.S., Conrad, P.A., and Smart, E.J. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *The Journal of biological chemistry* 274, 32512-32519.

Bloedon, L.T., Dunbar, R., Duffy, D., Pinell-Salles, P., Norris, R., DeGroot, B.J., Movva, R., Navab, M., Fogelman, A.M., and Rader, D.J. (2008). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *Journal of lipid research* 49, 1344-1352.

Bobryshev, Y.V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 37, 208-222.

Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897.

Botham, K.M., and Bravo, E. (1995). The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Progress in lipid research* 34, 71-97.

Bowry, V.W., Stanley, K.K., and Stocker, R. (1992). High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10316-10320.

Boyer, P.D. (2000). Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *Biochimica et biophysica acta* 1458, 252-262.

Bradley, M.N., Hong, C., Chen, M., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Wang, X., Lusis, A.J., Collins, A., Hseuh, W.A., Collins, J.L., *et al.* (2007). Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE. *The Journal of clinical investigation* 117, 2337-2346.

Breitenstein, A., Tanner, F.C., and Luscher, T.F. Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis? *Circ J* 74, 3-12.

Broedl, U.C., Maugeais, C., Marchadier, D., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2003). Effects of nonlipolytic ligand function of endothelial lipase on high density lipoprotein metabolism in vivo. *The Journal of biological chemistry* 278, 40688-40693.

- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Brundert, M., Ewert, A., Heeren, J., Behrendt, B., Ramakrishnan, R., Greten, H., Merkel, M., and Rinninger, F. (2005). Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 143-148.
- Brunham, L.R., Kruit, J.K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J.M., Pape, T.D., Coburn, B.A., Bissada, N., Staels, B., Groen, A.K., *et al.* (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *The Journal of clinical investigation* 116, 1052-1062.
- Buckley, K.A., Golding, S.L., Rice, J.M., Dillon, J.P., and Gallagher, J.A. (2003). Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *Faseb J* 17, 1401-1410.
- Bui, Q.T., Prempeh, M., and Wilensky, R.L. (2009). Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2109-2113.
- Burrell, H.E., Wlodarski, B., Foster, B.J., Buckley, K.A., Sharpe, G.R., Quayle, J.M., Simpson, A.W., and Gallagher, J.A. (2005). Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 280, 29667-29676.
- Busch, S.J., Barnhart, R.L., Martin, G.A., Fitzgerald, M.C., Yates, M.T., Mao, S.J., Thomas, C.E., and Jackson, R.L. (1994). Human hepatic triglyceride lipase expression reduces high density lipoprotein and aortic cholesterol in cholesterol-fed transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 269, 16376-16382.
- Busti, C., Falcinelli, E., Momi, S., and Gresele, P. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Intern Emerg Med* 5, 13-25.
- Cai, L., Eckhardt, E.R., Shi, W., Zhao, Z., Nasser, M., de Villiers, W.J., and van der Westhuyzen, D.R. (2004). Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells. *Journal of lipid research* 45, 253-262.
- Calabresi, L., Franceschini, G., Sirtori, C.R., De Palma, A., Saresella, M., Ferrante, P., and Taramelli, D. (1997). Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochemical and biophysical research communications* 238, 61-65.
- Calabresi, L., Gomaraschi, M., Villa, B., Omoboni, L., Dmitrieff, C., and Franceschini, G. (2002). Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 656-661.
- Cali, J.J., and Russell, D.W. (1991). Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 266, 7774-7778.

- Canner, P.L., Berge, K.G., Wenger, N.K., Stamler, J., Friedman, L., Prineas, R.J., and Friedewald, W. (1986). Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J Am Coll Cardiol* 8, 1245-1255.
- Cartwright, I.J., and Higgins, J.A. (2001). Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes. *The Journal of biological chemistry* 276, 48048-48057.
- Caslake, M.J., Stewart, G., Day, S.P., Daly, E., McTaggart, F., Chapman, M.J., Durrington, P., Laggner, P., Mackness, M., Pears, J., *et al.* (2003). Phenotype-dependent and -independent actions of rosuvastatin on atherogenic lipoprotein subfractions in hyperlipidaemia. *Atherosclerosis* 171, 245-253.
- Cefali, E.A., Simmons, P.D., Stanek, E.J., and Shamp, T.R. (2006). Improved control of niacin-induced flushing using an optimized once-daily, extended-release niacin formulation. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 44, 633-640.
- Champagne, E., Martinez, L.O., Collet, X., and Barbaras, R. (2006). Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions. *Current opinion in lipidology* 17, 279-284.
- Chang, B.H., Liao, W., Li, L., Nakamuta, M., Mack, D., and Chan, L. (1999). Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *The Journal of biological chemistry* 274, 6051-6055.
- Chau, P., Nakamura, Y., Fielding, C.J., and Fielding, P.E. (2006). Mechanism of prebeta-HDL formation and activation. *Biochemistry* 45, 3981-3987.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human molecular genetics* 14 *Spec No. 2*, R283-289.
- Chen, W., Wang, N., and Tall, A.R. (2005). A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes. *The Journal of biological chemistry* 280, 29277-29281.
- Cheng, L., Mantile, G., Pauly, R., Nater, C., Felici, A., Monticone, R., Bilato, C., Gluzband, Y.A., Crow, M.T., Stetler-Stevenson, W., *et al.* (1998). Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation* 98, 2195-2201.
- Cheng, S.H., and Stanley, M.M. (1959). Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 101, 223-225.
- Cheung, M.C., Wolfbauer, G., and Albers, J.J. (1996). Plasma phospholipid mass transfer rate: relationship to plasma phospholipid and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters. *Biochimica et biophysica acta* 1303, 103-110.

- Chi, Z., and Melendez, A.J. (2007). Role of cell adhesion molecules and immune-cell migration in the initiation, onset and development of atherosclerosis. *Cell adhesion & migration* *1*, 171-175.
- Chiba, S., Okamoto, H., Kon, S., Kimura, C., Murakami, M., Inobe, M., Matsui, Y., Sugawara, T., Shimizu, T., Uede, T., *et al.* (2002). Development of atherosclerosis in osteopontin transgenic mice. *Heart and vessels* *16*, 111-117.
- Chinetti, G., Gbaguidi, F.G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., Chapman, J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Najib-Fruchart, J., *et al.* (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* *101*, 2411-2417.
- Chisolm, G.M., and Steinberg, D. (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* *28*, 1815-1826.
- Christenson, L.K., and Strauss, J.F., 3rd (2000). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochimica et biophysica acta* *1529*, 175-187.
- Chroni, A., Duka, A., Kan, H.Y., Liu, T., and Zannis, V.I. (2005). Point mutations in apolipoprotein A-I mimic the phenotype observed in patients with classical lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Biochemistry* *44*, 14353-14366.
- Clark, R.W., Sutfin, T.A., Ruggeri, R.B., Willauer, A.T., Sugarman, E.D., Magnus-Aryitey, G., Cosgrove, P.G., Sand, T.M., Wester, R.T., Williams, J.A., *et al.* (2004). Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *24*, 490-497.
- Claudel, T., Staels, B., and Kuipers, F. (2005). The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *25*, 2020-2030.
- Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I.P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J.C., Dallongeville, J., Hum, D.W., Kuipers, F., *et al.* (2002). Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *The Journal of clinical investigation* *109*, 961-971.
- Cockerill, G.W., Huehns, T.Y., Weerasinghe, A., Stocker, C., Lerch, P.G., Miller, N.E., and Haskard, D.O. (2001). Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* *103*, 108-112.
- Cockerill, G.W., Rye, K.A., Gamble, J.R., Vadas, M.A., and Barter, P.J. (1995). High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *15*, 1987-1994.

Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., Jr., and Hobbs, H.H. (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *The New England journal of medicine* 354, 1264-1272.

Collavin, L., Lazarevic, D., Utrera, R., Marzinotto, S., Monte, M., and Schneider, C. (1999). wt p53 dependent expression of a membrane-associated isoform of adenylate kinase. *Oncogene* 18, 5879-5888.

Collet, X., Tall, A.R., Serajuddin, H., Guendouzi, K., Royer, L., Oliveira, H., Barbaras, R., Jiang, X.C., and Francone, O.L. (1999). Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *Journal of lipid research* 40, 1185-1193.

Collins, J.L., Fivush, A.M., Watson, M.A., Galardi, C.M., Lewis, M.C., Moore, L.B., Parks, D.J., Wilson, J.G., Tippin, T.K., Binz, J.G., *et al.* (2002). Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *Journal of medicinal chemistry* 45, 1963-1966.

Communi, D., Gonzalez, N.S., Detheux, M., Brezillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., and Boeynaems, J.M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of biological chemistry* 276, 41479-41485.

Conlan, M.G., Folsom, A.R., Finch, A., Davis, C.E., Sorlie, P., Marcucci, G., and Wu, K.K. (1993). Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. In *Thrombosis and haemostasis*, pp. 380-385.

Cooke, J.P. (2003). NO and angiogenesis. *Atherosclerosis* 4, 53-60.

Costet, P., Krempf, M., and Cariou, B. (2008). PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends in biochemical sciences* 33, 426-434.

Craig, W.Y., Palomaki, G.E., and Haddow, J.E. (1989). Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *Bmj* 298, 784-788.

Darbon, J.M., Tournier, J.F., Tauber, J.P., and Bayard, F. (1986). Possible role of protein phosphorylation in the mitogenic effect of high density lipoproteins on cultured vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 261, 8002-8008.

Dattilo, A.M., and Kris-Etherton, P.M. (1992). Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 56, 320-328.

Davis, H.R., Jr., and Altmann, S.W. (2009). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 679-683.

Davis, H.R., Jr., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Zhu, L.J., Graziano, M.P., and Altmann, S.W. (2007). Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 prevents atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 841-849.

- Dawson, P.A., Haywood, J., Craddock, A.L., Wilson, M., Tietjen, M., Kluckman, K., Maeda, N., and Parks, J.S. (2003). Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *The Journal of biological chemistry* 278, 33920-33927.
- Dawson, P.A., Hubbert, M., Haywood, J., Craddock, A.L., Zerangue, N., Christian, W.V., and Ballatori, N. (2005). The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *The Journal of biological chemistry* 280, 6960-6968.
- de Grooth, G.J., Kuivenhoven, J.A., Stalenhoef, A.F., de Graaf, J., Zwinderman, A.H., Posma, J.L., van Tol, A., and Kastelein, J.J. (2002). Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study. *Circulation* 105, 2159-2165.
- de La Llera-Moya, M., Connelly, M.A., Drazul, D., Klein, S.M., Favari, E., Yancey, P.G., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. (2001). Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *Journal of lipid research* 42, 1969-1978.
- DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., Li, W.P., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Espenshade, P.J. (1999). Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99, 703-712.
- del Castillo-Olivares, A., and Gil, G. (2001). Suppression of sterol 12alpha-hydroxylase transcription by the short heterodimer partner: insights into the repression mechanism. *Nucleic Acids Res* 29, 4035-4042.
- Delerive, P., Galardi, C.M., Bisi, J.E., Nicodeme, E., and Goodwin, B. (2004). Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI gene transcription. *Mol Endocrinol* 18, 2378-2387.
- Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Karpen, S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121, 140-147.
- Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N.G., Bernier, L., and Prat, A. (2004). Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 1454-1459.
- Dugi, K.A., Amar, M.J., Haudenschild, C.C., Shamburek, R.D., Bensadoun, A., Hoyt, R.F., Jr., Fruchart-Najib, J., Madj, Z., Brewer, H.B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2000). In vivo evidence for both lipolytic and nonlipolytic function of hepatic lipase in the metabolism of HDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 793-800.
- Duval, C., Touche, V., Tailleux, A., Fruchart, J.C., Fievet, C., Clavey, V., Staels, B., and Lestavel, S. (2006). Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochemical and biophysical research communications* 340, 1259-1263.

Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839-848.

Edmondson, A.C., Brown, R.J., Kathiresan, S., Cupples, L.A., Demissie, S., Manning, A.K., Jensen, M.K., Rimm, E.B., Wang, J., Rodrigues, A., *et al.* (2009). Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated HDL cholesterol in humans. *The Journal of clinical investigation* 119, 1042-1050.

Ericsson, C.G., Hamsten, A., Nilsson, J., Grip, L., Svane, B., and de Faire, U. (1996). Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *Lancet* 347, 849-853.

Eriksson, M., Carlson, L.A., Miettinen, T.A., and Angelin, B. (1999). Stimulation of fecal steroid excretion after infusion of recombinant proapolipoprotein A-I. Potential reverse cholesterol transport in humans. *Circulation* 100, 594-598.

Falany, C.N., Johnson, M.R., Barnes, S., and Diasio, R.B. (1994). Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 269, 19375-19379.

Falk, E. (2006). Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 47, C7-12.

Favari, E., Gomaschi, M., Zanotti, I., Bernini, F., Lee-Rueckert, M., Kovanen, P.T., Sirtori, C.R., Franceschini, G., and Calabresi, L. (2007). A unique protease-sensitive high density lipoprotein particle containing the apolipoprotein A-I(Milano) dimer effectively promotes ATP-binding Cassette A1-mediated cell cholesterol efflux. *The Journal of biological chemistry* 282, 5125-5132.

Fielding, P.E., Kawano, M., Catapano, A.L., Zoppo, A., Marcovina, S., and Fielding, C.J. (1994). Unique epitope of apolipoprotein A-I expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol. *Biochemistry* 33, 6981-6985.

Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (2002). Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* 277, 17377-17380.

Fitzgerald, M.L., Morris, A.L., Rhee, J.S., Andersson, L.P., Mendez, A.J., and Freeman, M.W. (2002). Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *The Journal of biological chemistry* 277, 33178-33187.

Fleisher, L.N., Tall, A.R., Witte, L.D., Miller, R.W., and Cannon, P.J. (1982). Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* 257, 6653-6655.

Foger, B., Santamarina-Fojo, S., Shamburek, R.D., Parrot, C.L., Talley, G.D., and Brewer, H.B., Jr. (1997). Plasma phospholipid transfer protein. Adenovirus-mediated overexpression in mice leads to decreased plasma high density lipoprotein (HDL) and enhanced hepatic

uptake of phospholipids and cholesteryl esters from HDL. *The Journal of biological chemistry* 272, 27393-27400.

Forrest, M.J., Bloomfield, D., Briscoe, R.J., Brown, P.N., Cumiskey, A.M., Ehrhart, J., Hershey, J.C., Keller, W.J., Ma, X., McPherson, H.E., *et al.* (2008). Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *Br J Pharmacol* 154, 1465-1473.

Franceschini, G., Sirtori, C.R., Capurso, A., 2nd, Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. (1980). A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *The Journal of clinical investigation* 66, 892-900.

Francis, G.A., Knopp, R.H., and Oram, J.F. (1995). Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *The Journal of clinical investigation* 96, 78-87.

Fraser, R., Dobbs, B.R., and Rogers, G.W. (1995). Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* 21, 863-874.

Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B.G., Stene, M.C., Sethi, A.A., Remaley, A.T., Schnohr, P., Grande, P., and Tybjaerg-Hansen, A. (2008). Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease. *Jama* 299, 2524-2532.

Fuki, I.V., Blanchard, N., Jin, W., Marchadier, D.H., Millar, J.S., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2003). Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins via heparan sulfate proteoglycan-mediated pathway. *The Journal of biological chemistry* 278, 34331-34338.

Gachet, C. (2001). ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and haemostasis* 86, 222-232.

Ganji, S.H., Tavintharan, S., Zhu, D., Xing, Y., Kamanna, V.S., and Kashyap, M.L. (2004). Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *Journal of lipid research* 45, 1835-1845.

Garber, D.W., Datta, G., Chaddha, M., Palgunachari, M.N., Hama, S.Y., Navab, M., Fogelman, A.M., Segrest, J.P., and Anantharamaiah, G.M. (2001). A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet-induced atherosclerosis. *Journal of lipid research* 42, 545-552.

Garcia-Calvo, M., Lisnock, J., Bull, H.G., Hawes, B.E., Burnett, D.A., Braun, M.P., Crona, J.H., Davis, H.R., Jr., Dean, D.C., Detmers, P.A., *et al.* (2005). The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8132-8137.

Garcia, A., Barbaras, R., Collet, X., Bogyo, A., Chap, H., and Perret, B. (1996). High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry* 35, 13064-13071.

Garner, B., Waldeck, A.R., Witting, P.K., Rye, K.A., and Stocker, R. (1998). Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *The Journal of biological chemistry* 273, 6088-6095.

Gautier, T., Klein, A., Deckert, V., Desrumaux, C., Ogier, N., Sberna, A.L., Paul, C., Le Guern, N., Athias, A., Montange, T., *et al.* (2008). Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *The Journal of biological chemistry* 283, 18702-18710.

Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 534-540.

Gimbrone, M.A., Jr. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 155, 1-5.

Goldenberg, I., Benderly, M., Sidi, R., Boyko, V., Tenenbaum, A., Tanne, D., and Behar, S. (2009a). Relation of clinical benefit of raising high-density lipoprotein cholesterol to serum levels of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease (from the Bezafibrate Infarction Prevention Trial). *Am J Cardiol* 103, 41-45.

Goldenberg, I., Boyko, V., Tennenbaum, A., Tanne, D., Behar, S., and Guetta, V. (2009b). Long-term benefit of high-density lipoprotein cholesterol-raising therapy with bezafibrate: 16-year mortality follow-up of the bezafibrate infarction prevention trial. *Arch Intern Med* 169, 508-514.

Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 333-337.

Gomaschi, M., Baldassarre, D., Amato, M., Eligini, S., Conca, P., Sirtori, C.R., Franceschini, G., and Calabresi, L. (2007). Normal vascular function despite low levels of high-density lipoprotein cholesterol in carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant. *Circulation* 116, 2165-2172.

Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., *et al.* (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular cell* 6, 517-526.

Gordon, D.A., Jamil, H., Gregg, R.E., Olofsson, S.O., and Boren, J. (1996). Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein

assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *The Journal of biological chemistry* 271, 33047-33053.

Gordon, D.A., Jamil, H., Sharp, D., Mullaney, D., Yao, Z., Gregg, R.E., and Wetterau, J. (1994). Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7628-7632.

Gordon, D.J., Probstfield, J.L., Garrison, R.J., Neaton, J.D., Castelli, W.P., Knoke, J.D., Jacobs, D.R., Jr., Bangdiwala, S., and Tyroler, H.A. (1989). High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79, 8-15.

Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, W.B., and Dawber, T.R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 62, 707-714.

Greten, H., Raetzer, H., Stiehl, A., and Schettler, G. (1980). The effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on plasma lipids and fecal sterol excretion. *Atherosclerosis* 36, 81-88.

Griffin, J.H., Kojima, K., Banka, C.L., Curtiss, L.K., and Fernandez, J.A. (1999). High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *The Journal of clinical investigation* 103, 219-227.

Groot, P.H., Pearce, N.J., Yates, J.W., Stocker, C., Sauermelch, C., Doe, C.P., Willette, R.N., Olzinski, A., Peters, T., d'Epagnier, D., *et al.* (2005). Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *Journal of lipid research* 46, 2182-2191.

Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular cell* 2, 275-281.

Guendouzi, K., Collet, X., Perret, B., Chap, H., and Barbaras, R. (1998). Remnant high density lipoprotein2 particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG2). *Biochemistry* 37, 14974-14980.

Guendouzi, K., Jaspard, B., Barbaras, R., Motta, C., Vieu, C., Marcel, Y., Chap, H., Perret, B., and Collet, X. (1999). Biochemical and physical properties of remnant-HDL2 and of pre beta 1-HDL produced by hepatic lipase. *Biochemistry* 38, 2762-2768.

Guerin, M., Lassel, T.S., Le Goff, W., Farnier, M., and Chapman, M.J. (2000). Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia : preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 189-197.

Gusarova, V., Brodsky, J.L., and Fisher, E.A. (2003). Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER. *The Journal of biological chemistry* 278, 48051-48058.

Haghighpassand, M., Bourassa, P.A., Francone, O.L., and Aiello, R.J. (2001). Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *The Journal of clinical investigation* 108, 1315-1320.

Hansson, G.K. (2009). Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 7 *Suppl 1*, 328-331.

Hansson, G.K., Robertson, A.K., and Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 1, 297-329.

Hasham, S.N., and Pillarisetti, S. (2006). Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 372, 179-183.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2008). Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart* 94, 706-714.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2009). Enhancing cardiovascular disease risk reduction: raising high-density lipoprotein levels. *Curr Opin Cardiol* 24, 473-482.

Hayek, T., Masucci-Magoulas, L., Jiang, X., Walsh, A., Rubin, E., Breslow, J.L., and Tall, A.R. (1995). Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *The Journal of clinical investigation* 96, 2071-2074.

Hildebrand, R.B., Lammers, B., Meurs, I., Korpelaar, S.J., De Haan, W., Zhao, Y., Kruijt, J.K., Pratico, D., Schimmel, A.W., Holleboom, A.G., *et al.* Restoration of high-density lipoprotein levels by cholesteryl ester transfer protein expression in scavenger receptor class B type I (SR-BI) knockout mice does not normalize pathologies associated with SR-BI deficiency. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30, 1439-1445.

Hoppel, C., Kerner, J., Turkaly, P., Minkler, P., and Tandler, B. (2002). Isolation of hepatic mitochondrial contact sites: previously unrecognized inner membrane components. *Analytical biochemistry* 302, 60-69.

Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* 109, 1125-1131.

Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12027-12032.

Huang, Z.H., Gu, D., Lange, Y., and Mazzone, T. (2003). Expression of scavenger receptor BI facilitates sterol movement between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in macrophages. *Biochemistry* 42, 3949-3955.

Huby, T., Doucet, C., Dachet, C., Ouzilleau, B., Ueda, Y., Afzal, V., Rubin, E., Chapman, M.J., and Lesnik, P. (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an

atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *The Journal of clinical investigation* 116, 2767-2776.

Hussain, M.M., Fatma, S., Pan, X., and Iqbal, J. (2005). Intestinal lipoprotein assembly. *Current opinion in lipidology* 16, 281-285.

Hussain, M.M., Shi, J., and Dreizen, P. (2003). Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *Journal of lipid research* 44, 22-32.

Huuskonen, J., Olkkonen, V.M., Ehnholm, C., Metso, J., Julkunen, I., and Jauhiainen, M. (2000). Phospholipid transfer is a prerequisite for PLTP-mediated HDL conversion. *Biochemistry* 39, 16092-16098.

Huuskonen, J., Olkkonen, V.M., Jauhiainen, M., and Ehnholm, C. (2001). The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 155, 269-281.

Ibanez, B., Vilahur, G., Cimmino, G., Speidl, W.S., Pinero, A., Choi, B.G., Zafar, M.U., Santos-Gallego, C.G., Krause, B., Badimon, L., *et al.* (2008). Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 51, 1104-1109.

Ikeda, I., Tanabe, Y., and Sugano, M. (1989). Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 35, 361-369.

Ikewaki, K., Nishiwaki, M., Sakamoto, T., Ishikawa, T., Fairwell, T., Zech, L.A., Nagano, M., Nakamura, H., Brewer, H.B., Jr., and Rader, D.J. (1995). Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *The Journal of clinical investigation* 96, 1573-1581.

Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., *et al.* (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell metabolism* 2, 217-225.

Inazu, A., Brown, M.L., Hesler, C.B., Agellon, L.B., Koizumi, J., Takata, K., Maruhama, Y., Mabuchi, H., and Tall, A.R. (1990). Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *The New England journal of medicine* 323, 1234-1238.

Iqbal, J., and Hussain, M.M. (2005). Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. *Journal of lipid research* 46, 1491-1501.

Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P.K., Herz, J., and Russell, D.W. (1996). Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *The Journal of biological chemistry* 271, 18017-18023.

Ishida, T., Choi, S.Y., Kundu, R.K., Spin, J., Yamashita, T., Hirata, K., Kojima, Y., Yokoyama, M., Cooper, A.D., and Quertermous, T. (2004). Endothelial lipase modulates

susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 279, 45085-45092.

Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L.O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., Nauze, M., Champagne, E., Terce, F., Gachet, C., *et al.* (2005). The nucleotide receptor P2Y<sub>13</sub> is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 62, 2508-2515.

Jiang, X.C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O.L., and Tall, A.R. (1999). Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *The Journal of clinical investigation* 103, 907-914.

Jiang, X.C., Qin, S., Qiao, C., Kawano, K., Lin, M., Skold, A., Xiao, X., and Tall, A.R. (2001). Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nat Med* 7, 847-852.

Jiang, X.C., Tall, A.R., Qin, S., Lin, M., Schneider, M., Lalanne, F., Deckert, V., Desrumaux, C., Athias, A., Witztum, J.L., *et al.* (2002). Phospholipid transfer protein deficiency protects circulating lipoproteins from oxidation due to the enhanced accumulation of vitamin E. *The Journal of biological chemistry* 277, 31850-31856.

Jin, F.Y., Kamanna, V.S., and Kashyap, M.L. (1999). Niacin accelerates intracellular ApoB degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 1051-1059.

Jin, W., Millar, J.S., Broedl, U., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2003). Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo. *The Journal of clinical investigation* 111, 357-362.

Jones, B., Jones, E.L., Bonney, S.A., Patel, H.N., Mensenkamp, A.R., Eichenbaum-Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., Annesi, G., Naik, S., *et al.* (2003). Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nature genetics* 34, 29-31.

Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., *et al.* (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7604-7609.

Jun, M., Foote, C., Lv, J., Neal, B., Patel, A., Nicholls, S.J., Grobbee, D.E., Cass, A., Chalmers, J., and Perkovic, V. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375, 1875-1884.

Jung, H.R., Turner, S.M., Neese, R.A., Young, S.G., and Hellerstein, M.K. (1999). Metabolic adaptations to dietary fat malabsorption in chylomicron-deficient mice. *The Biochemical journal* 343 Pt 2, 473-478.

Kamanna, V.S., and Kashyap, M.L. (2008). Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol* 101, 20B-26B.

- Kaufmann, A., Musset, B., Limberg, S.H., Renigunta, V., Sus, R., Dalpke, A.H., Heeg, K.M., Robaye, B., and Hanley, P.J. (2005). "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *The Journal of biological chemistry* 280, 32459-32467.
- Kawano, K., Qin, S.C., Lin, M., Tall, A.R., and Jiang, X.C. (2000). Cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein have nonoverlapping functions in vivo. *The Journal of biological chemistry* 275, 29477-29481.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell metabolism* 1, 121-131.
- Kerr, T.A., Saeki, S., Schneider, M., Schaefer, K., Berdy, S., Redder, T., Shan, B., Russell, D.W., and Schwarz, M. (2002). Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. *Dev Cell* 2, 713-720.
- Kim, B.W., Choo, H.J., Lee, J.W., Kim, J.H., and Ko, Y.G. (2004). Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts. *Exp Mol Med* 36, 476-485.
- Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Murakami, M., and Okajima, F. (2003). High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1283-1288.
- Kodama, S., Tanaka, S., Saito, K., Shu, M., Sone, Y., Onitake, F., Suzuki, E., Shimano, H., Yamamoto, S., Kondo, K., *et al.* (2007). Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 167, 999-1008.
- Komori, H., Arai, H., Kashima, T., Huby, T., Kita, T., and Ueda, Y. (2008). Coexpression of CLA-1 and human PDZK1 in murine liver modulates HDL cholesterol metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 1298-1303.
- Kontush, A., and Chapman, M.J. (2006a). Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nature clinical practice* 3, 144-153.
- Kontush, A., and Chapman, M.J. (2006b). Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacological reviews* 58, 342-374.
- Kozarsky, K.F., Donahee, M.H., Glick, J.M., Krieger, M., and Rader, D.J. (2000). Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 721-727.
- Kozarsky, K.F., Donahee, M.H., Rigotti, A., Iqbal, S.N., Edelman, E.R., and Krieger, M. (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 387, 414-417.

- Kratzer, A., Buchebner, M., Pfeifer, T., Becker, T.M., Uray, G., Miyazaki, M., Miyazaki-Anzai, S., Ebner, B., Chandak, P.G., Kadam, R.S., *et al.* (2009). Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE<sup>-/-</sup> mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *Journal of lipid research* 50, 312-326.
- Kraus, W.E., Houmard, J.A., Duscha, B.D., Knetzger, K.J., Wharton, M.B., McCartney, J.S., Bales, C.W., Henes, S., Samsa, G.P., Otvos, J.D., *et al.* (2002). Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *The New England journal of medicine* 347, 1483-1492.
- Krishna, R., Anderson, M.S., Bergman, A.J., Jin, B., Fallon, M., Cote, J., Rosko, K., Chavez-Eng, C., Lutz, R., Bloomfield, D.M., *et al.* (2007). Effect of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor, anacetrapib, on lipoproteins in patients with dyslipidaemia and on 24-h ambulatory blood pressure in healthy individuals: two double-blind, randomised placebo-controlled phase I studies. *Lancet* 370, 1907-1914.
- Kruit, J.K., Plosch, T., Havinga, R., Boverhof, R., Groot, P.H., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2005). Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 128, 147-156.
- Kuipers, F., Stroeve, J.H., Caron, S., and Staels, B. (2007). Bile acids, farnesoid X receptor, atherosclerosis and metabolic control. *Current opinion in lipidology* 18, 289-297.
- Lam, P., Wang, R., and Ling, V. (2005). Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry* 44, 12598-12605.
- Lammert, F., and Wang, D.Q. (2005). New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology* 129, 718-734.
- Landrier, J.F., Eloranta, J.J., Vavricka, S.R., and Kullak-Ublick, G.A. (2006). The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G476-485.
- Langheim, S., Yu, L., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Xu, F., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2005). ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *Journal of lipid research* 46, 1732-1738.
- Lee, M.H., Lu, K., and Patel, S.B. (2001). Genetic basis of sitosterolemia. *Current opinion in lipidology* 12, 141-149.
- Leiper, J.M., Bayliss, J.D., Pease, R.J., Brett, D.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1994). Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *The Journal of biological chemistry* 269, 21951-21954.
- Li-Hawkins, J., Gafvels, M., Olin, M., Lund, E.G., Andersson, U., Schuster, G., Bjorkhem, I., Russell, D.W., and Eggertsen, G. (2002). Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *The Journal of clinical investigation* 110, 1191-1200.

- Li, D., Weng, S., Yang, B., Zander, D.S., Saldeen, T., Nichols, W.W., Khan, S., and Mehta, J.L. (1999). Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *19*, 378-383.
- Libby, P. (2008). The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med* *263*, 517-527.
- Linton, M.F., Hasty, A.H., Babaev, V.R., and Fazio, S. (1998). Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *The Journal of clinical investigation* *101*, 1726-1736.
- Liu, B., and Krieger, M. (2002). Highly purified scavenger receptor class B, type I reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes mediates high affinity high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *The Journal of biological chemistry* *277*, 34125-34135.
- Lookene, A., Savonen, R., and Olivecrona, G. (1997). Interaction of lipoproteins with heparan sulfate proteoglycans and with lipoprotein lipase. Studies by surface plasmon resonance technique. *Biochemistry* *36*, 5267-5275.
- Lopez, D. (2008). PCSK9: an enigmatic protease. *Biochimica et biophysica acta* *1781*, 184-191.
- Lorenzi, I., von Eckardstein, A., Cavelier, C., Radosavljevic, S., and Rohrer, L. (2008a). Apolipoprotein A-I but not high-density lipoproteins are internalised by RAW macrophages: roles of ATP-binding cassette transporter A1 and scavenger receptor BI. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* *86*, 171-183.
- Lorenzi, I., von Eckardstein, A., Radosavljevic, S., and Rohrer, L. (2008b). Lipidation of apolipoprotein A-I by ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 generates an interaction partner for ABCG1 but not for scavenger receptor BI. *Biochimica et biophysica acta* *1781*, 306-313.
- Lund, E.G., Peterson, L.B., Adams, A.D., Lam, M.H., Burton, C.A., Chin, J., Guo, Q., Huang, S., Latham, M., Lopez, J.C., *et al.* (2006). Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem Pharmacol* *71*, 453-463.
- Lusa, S., Jauhiainen, M., Metso, J., Somerharju, P., and Ehnholm, C. (1996). The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *The Biochemical journal* *313 ( Pt 1)*, 275-282.
- Ma, K., Cilingiroglu, M., Otvos, J.D., Ballantyne, C.M., Marian, A.J., and Chan, L. (2003). Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2748-2753.

- Mackness, B., Hine, D., Liu, Y., Mastorikou, M., and Mackness, M. (2004). Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 318, 680-683.
- Maeda, K., Noguchi, Y., and Fukui, T. (2003). The effects of cessation from cigarette smoking on the lipid and lipoprotein profiles: a meta-analysis. *Prev Med* 37, 283-290.
- Malaval, C., Laffargue, M., Barbaras, R., Rolland, C., Peres, C., Champagne, E., Perret, B., Terce, F., Collet, X., and Martinez, L.O. (2009). RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cell Signal* 21, 120-127.
- Malerod, L., Sporstol, M., Juvet, L.K., Mousavi, S.A., Gjoen, T., Berg, T., Roos, N., and Eskild, W. (2005). Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. *Biochemical and biophysical research communications* 336, 1096-1105.
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., Fradelizi, D., and Tedgui, A. (2001). Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89, 930-934.
- Mander, E.L., Dean, R.T., Stanley, K.K., and Jessup, W. (1994). Apolipoprotein B of oxidized LDL accumulates in the lysosomes of macrophages. *Biochimica et biophysica acta* 1212, 80-92.
- Manninen, V., Elo, M.O., Frick, M.H., Haapa, K., Heinonen, O.P., Heinsalmi, P., Helo, P., Huttunen, J.K., Kaitaniemi, P., Koskinen, P., *et al.* (1988). Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Jama* 260, 641-651.
- Mansbach, C.M., and Siddiqi, S.A. The biogenesis of chylomicrons. *Annual review of physiology* 72, 315-333.
- Manttari, M., Huttunen, J.K., Koskinen, P., Manninen, V., Tenkanen, L., Heinonen, O.P., and Frick, M.H. (1990). Lipoproteins and coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *European heart journal* 11 Suppl H, 26-31.
- Mardones, P., Quinones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J.F., Schwarz, M., Miettinen, H.E., Trigatti, B., Krieger, M., VanPatten, S., *et al.* (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research* 42, 170-180.
- Martin, G., Duez, H., Blanquart, C., Berezowski, V., Poulain, P., Fruchart, J.C., Najib-Fruchart, J., Glineur, C., and Staels, B. (2001). Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *The Journal of clinical investigation* 107, 1423-1432.
- Martinez, L.O., Jacquet, S., Esteve, J.P., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J.E., Terce, F., *et al.* (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421, 75-79.

- Masson, D., Jiang, X.C., Lagrost, L., and Tall, A.R. (2009). The role of plasma lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of lipid research* 50 *Suppl*, S201-206.
- Maugeais, C., Tietge, U.J., Broedl, U.C., Marchadier, D., Cain, W., McCoy, M.G., Lund-Katz, S., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2003). Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation* 108, 2121-2126.
- Maxwell, K.N., and Breslow, J.L. (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7100-7105.
- Maxwell, K.N., Fisher, E.A., and Breslow, J.L. (2005). Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2069-2074.
- Maxwell, K.N., Soccio, R.E., Duncan, E.M., Sehayek, E., and Breslow, J.L. (2003). Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *Journal of lipid research* 44, 2109-2119.
- McCoy, M.G., Sun, G.S., Marchadier, D., Maugeais, C., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2002). Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *Journal of lipid research* 43, 921-929.
- McNeill, E. RVX-208, a stimulator of apolipoprotein AI gene expression for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 357-364.
- McNeish, J., Aiello, R.J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K.L., Roach, M.L., Royer, L.J., de Wet, J., *et al.* (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4245-4250.
- Meng, Q.H., Calabresi, L., Fruchart, J.C., and Marcel, Y.L. (1993). Apolipoprotein A-I domains involved in the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. Importance of the central domain. *The Journal of biological chemistry* 268, 16966-16973.
- Mezdour, H., Jones, R., Dengremont, C., Castro, G., and Maeda, N. (1997). Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 272, 13570-13575.
- Millar, J.S., Duffy, D., Gadi, R., Bloedon, L.T., Dunbar, R.L., Wolfe, M.L., Movva, R., Shah, A., Fuki, I.V., McCoy, M., *et al.* (2009). Potent and selective PPAR-alpha agonist LY518674 upregulates both ApoA-I production and catabolism in human subjects with the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 140-146.
- Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J.H., and Shaul, P.W. (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 98, 1352-1364.

Morehouse, L.A., Sugarman, E.D., Bourassa, P.A., Sand, T.M., Zimetti, F., Gao, F., Rothblat, G.H., and Milici, A.J. (2007). Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *Journal of lipid research* 48, 1263-1272.

Murphy, A.J., Woollard, K.J., Hoang, A., Mukhamedova, N., Stirzaker, R.A., McCormick, S.P., Remaley, A.T., Sviridov, D., and Chin-Dusting, J. (2008). High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 2071-2077.

Murugesan, G., Sa, G., and Fox, P.L. (1994). High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 74, 1149-1156.

Naik, S.U., Wang, X., Da Silva, J.S., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 113, 90-97.

Nanjee, M.N., Doran, J.E., Lerch, P.G., and Miller, N.E. (1999). Acute effects of intravenous infusion of ApoA1/phosphatidylcholine discs on plasma lipoproteins in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 979-989.

Nassoury, N., Blasiolo, D.A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P.S., Attie, A.D., Prat, A., and Seidah, N.G. (2007). The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8, 718-732.

Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Hama, S., Garber, D.W., Chaddha, M., Hough, G., Lallone, R., and Fogelman, A.M. (2002). Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation* 105, 290-292.

Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Hama, S., Hough, G., Reddy, S.T., Frank, J.S., Garber, D.W., Handattu, S., and Fogelman, A.M. (2005). D-4F and statins synergize to render HDL antiinflammatory in mice and monkeys and cause lesion regression in old apolipoprotein E-null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1426-1432.

Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Reddy, S.T., Hama, S., Hough, G., Grijalva, V.R., Wagner, A.C., Frank, J.S., Datta, G., Garber, D., *et al.* (2004). Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 109, 3215-3220.

Navab, M., Hama-Levy, S., Van Lenten, B.J., Fonarow, G.C., Cardinez, C.J., Castellani, L.W., Brennan, M.L., Lusic, A.J., Fogelman, A.M., and La Du, B.N. (1997). Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *The Journal of clinical investigation* 99, 2005-2019.

Navab, M., Hama, S.Y., Cooke, C.J., Anantharamaiah, G.M., Chaddha, M., Jin, L., Subbanagounder, G., Faull, K.F., Reddy, S.T., Miller, N.E., *et al.* (2000). Normal high density

lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of lipid research* 41, 1481-1494.

Navab, M., Imes, S.S., Hama, S.Y., Hough, G.P., Ross, L.A., Bork, R.W., Valente, A.J., Berliner, J.A., Drinkwater, D.C., Laks, H., *et al.* (1991). Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *The Journal of clinical investigation* 88, 2039-2046.

Neimark, E., Chen, F., Li, X., and Shneider, B.L. (2004). Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 40, 149-156.

Neuspiel, M., Schauss, A.C., Braschi, E., Zunino, R., Rippstein, P., Rachubinski, R.A., Andrade-Navarro, M.A., and McBride, H.M. (2008). Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* 18, 102-108.

Newby, A.C. (2006). Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 69, 614-624.

Nicholls, S.J., Brandrup-Wognsen, G., Palmer, M., and Barter, P.J. Meta-analysis of comparative efficacy of increasing dose of Atorvastatin versus Rosuvastatin versus Simvastatin on lowering levels of atherogenic lipids (from VOYAGER). *Am J Cardiol* 105, 69-76.

Nicholls, S.J., Cutri, B., Worthley, S.G., Kee, P., Rye, K.A., Bao, S., and Barter, P.J. (2005). Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 2416-2421.

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

Nicholls, S.J., Tuzcu, E.M., Sipahi, I., Grasso, A.W., Schoenhagen, P., Hu, T., Wolski, K., Crowe, T., Desai, M.Y., Hazen, S.L., *et al.* (2007). Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *Jama* 297, 499-508.

Nieland, T.J., Ehrlich, M., Krieger, M., and Kirchhausen, T. (2005). Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI. *Biochimica et biophysica acta* 1734, 44-51.

Niki, I., Nicks, J.L., and Ashcroft, S.J. (1990). The beta-cell glibenclamide receptor is an ADP-binding protein. *The Biochemical journal* 268, 713-718.

Nissen, S.E., Nicholls, S.J., Wolski, K., Howey, D.C., McErlean, E., Wang, M.D., Gomez, E.V., and Russo, J.M. (2007a). Effects of a potent and selective PPAR-alpha agonist in patients with atherogenic dyslipidemia or hypercholesterolemia: two randomized controlled trials. *Jama* 297, 1362-1373.

- Nissen, S.E., Tardif, J.C., Nicholls, S.J., Revkin, J.H., Shear, C.L., Duggan, W.T., Ruzyllo, W., Bachinsky, W.B., Lasala, G.P., and Tuzcu, E.M. (2007b). Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *The New England journal of medicine* *356*, 1304-1316.
- Nissen, S.E., Tsunoda, T., Tuzcu, E.M., Schoenhagen, P., Cooper, C.J., Yasin, M., Eaton, G.M., Lauer, M.A., Sheldon, W.S., Grines, C.L., *et al.* (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *Jama* *290*, 2292-2300.
- Nofer, J.R., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., von Eckardstein, A., Seedorf, U., and Assmann, G. (2001). Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *The Journal of biological chemistry* *276*, 34480-34485.
- Nofer, J.R., van der Giet, M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H.A., Tietge, U.J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., *et al.* (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *The Journal of clinical investigation* *113*, 569-581.
- Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Espenshade, P.J. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* *102*, 315-323.
- Noma, T. (2005). Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J Med Invest* *52*, 127-136.
- Norata, G.D., Callegari, E., Marchesi, M., Chiesa, G., Eriksson, P., and Catapano, A.L. (2005). High-density lipoproteins induce transforming growth factor-beta2 expression in endothelial cells. *Circulation* *111*, 2805-2811.
- O'Connell, B.J., and Genest, J., Jr. (2001). High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* *104*, 1978-1983.
- Okamoto, H., Yonemori, F., Wakitani, K., Minowa, T., Maeda, K., and Shinkai, H. (2000). A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature* *406*, 203-207.
- Out, R., Hoekstra, M., de Jager, S.C., de Vos, P., van der Westhuyzen, D.R., Webb, N.R., Van Eck, M., Biessen, E.A., and Van Berkel, T.J. (2005). Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice. *Journal of lipid research* *46*, 1172-1181.
- Pagler, T.A., Rhode, S., Neuhofer, A., Laggner, H., Strobl, W., Hinterdorfer, C., Volf, I., Pavelka, M., Eckhardt, E.R., van der Westhuyzen, D.R., *et al.* (2006). SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. *The Journal of biological chemistry* *281*, 11193-11204.
- Pan, M., Liang Js, J.S., Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (2002). The late addition of core lipids to nascent apolipoprotein B100, resulting in the assembly and secretion of triglyceride-

rich lipoproteins, is independent of both microsomal triglyceride transfer protein activity and new triglyceride synthesis. *The Journal of biological chemistry* 277, 4413-4421.

Pandak, W.M., Ren, S., Marques, D., Hall, E., Redford, K., Mallonee, D., Bohdan, P., Heuman, D., Gil, G., and Hylemon, P. (2002). Transport of cholesterol into mitochondria is rate-limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 277, 48158-48164.

Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693-704.

Plosch, T., van der Veen, J.N., Havinga, R., Huijkman, N.C., Bloks, V.W., and Kuipers, F. (2006). Abcg5/Abcg8-independent pathways contribute to hepatobiliary cholesterol secretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G414-423.

Plump, A.S., Masucci-Magoulas, L., Bruce, C., Bisgaier, C.L., Breslow, J.L., and Tall, A.R. (1999). Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 1105-1110.

Plump, A.S., Scott, C.J., and Breslow, J.L. (1994). Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9607-9611.

Qin, S., Kawano, K., Bruce, C., Lin, M., Bisgaier, C., Tall, A.R., and Jiang, X. (2000). Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low high density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apoA-IV-rich lamellar lipoproteins. *Journal of lipid research* 41, 269-276.

Quinet, E.M., Savio, D.A., Halpern, A.R., Chen, L., Miller, C.P., and Nambi, P. (2004). Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *Journal of lipid research* 45, 1929-1942.

Radojkovic, C., Genoux, A., Pons, V., Combes, G., de Jonge, H., Champagne, E., Rolland, C., Perret, B., Collet, X., Terce, F., *et al.* (2009). Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1125-1130.

Ramet, M.E., Ramet, M., Lu, Q., Nickerson, M., Savolainen, M.J., Malzone, A., and Karas, R.H. (2003). High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 41, 2288-2297.

Ramjeesingh, M., Ugwu, F., Stratford, F.L., Huan, L.J., Li, C., and Bear, C.E. (2008). The intact CFTR protein mediates ATPase rather than adenylate kinase activity. *The Biochemical journal* 412, 315-321.

Randak, C., and Welsh, M.J. (2003). An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR. *Cell* 115, 837-850.

- Rashid, S., Curtis, D.E., Garuti, R., Anderson, N.N., Bashmakov, Y., Ho, Y.K., Hammer, R.E., Moon, Y.A., and Horton, J.D. (2005). Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 5374-5379.
- Reichert, A.S., and Neupert, W. (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochimica et biophysica acta* *1592*, 41-49.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & development* *14*, 2819-2830.
- Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 459-481.
- Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., and Mangelsdorf, D.J. (2000b). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science (New York, NY)* *289*, 1524-1529.
- Rhoads, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstrault, L., and Brissette, L. (2003). The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* *42*, 7527-7538.
- Ridlon, J.M., Kang, D.J., and Hylemon, P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research* *47*, 241-259.
- Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., and Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 12610-12615.
- Rimm, E.B., Klatsky, A., Grobbee, D., and Stampfer, M.J. (1996). Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *Bmj* *312*, 731-736.
- Rimm, E.B., Williams, P., Fosher, K., Criqui, M., and Stampfer, M.J. (1999). Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Bmj* *319*, 1523-1528.
- Rittershaus, C.W., Miller, D.P., Thomas, L.J., Picard, M.D., Honan, C.M., Emmett, C.D., Pettey, C.L., Adari, H., Hammond, R.A., Beattie, D.T., *et al.* (2000). Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *20*, 2106-2112.
- Robins, S.J., Collins, D., Wittes, J.T., Papademetriou, V., Deedwania, P.C., Schaefer, E.J., McNamara, J.R., Kashyap, M.L., Hershman, J.M., Wexler, L.F., *et al.* (2001). Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *Jama* *285*, 1585-1591.

- Rodrigueza, W.V., Thuahnai, S.T., Temel, R.E., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., and Williams, D.L. (1999). Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 20344-20350.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R.E., and Herz, J. (1998). Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *The Journal of clinical investigation* 101, 689-695.
- Roma, P., Gregg, R.E., Meng, M.S., Ronan, R., Zech, L.A., Franceschini, G., Sirtori, C.R., and Brewer, H.B., Jr. (1993). In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-IMilano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *The Journal of clinical investigation* 91, 1445-1452.
- Ruan, Q., Chen, Y., Gratton, E., Glaser, M., and Mantulin, W.W. (2002). Cellular characterization of adenylate kinase and its isoform: two-photon excitation fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal* 83, 3177-3187.
- Rubins, H.B., Robins, S.J., Collins, D., Fye, C.L., Anderson, J.W., Elam, M.B., Faas, F.H., Linares, E., Schaefer, E.J., Schectman, G., *et al.* (1999). Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *The New England journal of medicine* 341, 410-418.
- Rudijanto, A. (2007). The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta medica Indonesiana* 39, 86-93.
- Ruotolo, G., Ericsson, C.G., Tettamanti, C., Karpe, F., Grip, L., Svane, B., Nilsson, J., de Faire, U., and Hamsten, A. (1998). Treatment effects on serum lipoprotein lipids, apolipoproteins and low density lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (BECAIT). *J Am Coll Cardiol* 32, 1648-1656.
- Rye, K.A., and Barter, P.J. (2004). Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 421-428.
- Sabesin, S.M., and Frase, S. (1977). Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *Journal of lipid research* 18, 496-511.
- Sabol, S.L., Brewer, H.B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2005). The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *Journal of lipid research* 46, 2151-2167.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *The Journal of biological chemistry* 273, 5785-5793.

- Santamarina-Fojo, S., Gonzalez-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., and Nong, Z. (2004). Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 1750-1754.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Vaillant, N., Gadeau, A.P., Desgranges, C., Scalbert, E., Chardin, P., Pacaud, P., and Loirand, G. (2000). P2Y(1), P2Y(2), P2Y(4), and P2Y(6) receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes. *American journal of physiology* 278, H1751-1761.
- Schoonjans, K., Staels, B., and Auwerx, J. (1996). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *Journal of lipid research* 37, 907-925.
- Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Herman, A.G., and Martinet, W. (2007). Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 73, 470-480.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., *et al.* (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & development* 14, 2831-2838.
- Scotet, E., Martinez, L.O., Grant, E., Barbaras, R., Jeno, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillet, S., Esteve, J.P., *et al.* (2005). Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22, 71-80.
- Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A.K., Gibson, L.L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K.L., Hahner, L.D., Cummings, M.L., Kitchens, R.L., Marcel, Y.L., *et al.* (2006). High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res* 98, 63-72.
- Seimon, T., and Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *Journal of lipid research* 50 *Suppl*, S382-387.
- Selzman, C.H., Miller, S.A., Zimmerman, M.A., Gamboni-Robertson, F., Harken, A.H., and Banerjee, A. (2002). Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. *American journal of physiology* 283, H1455-1461.
- Sever, N., Song, B.L., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and DeBose-Boyd, R.A. (2003). Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *The Journal of biological chemistry* 278, 52479-52490.
- Shah, P.K. (2007). Molecular mechanisms of plaque instability. *Current opinion in lipidology* 18, 492-499.
- Shah, P.K., Nilsson, J., Kaul, S., Fishbein, M.C., Ageland, H., Hamsten, A., Johansson, J., Karpe, F., and Cercek, B. (1998). Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 97, 780-785.

Shah, P.K., Yano, J., Reyes, O., Chyu, K.Y., Kaul, S., Bisgaier, C.L., Drake, S., and Cercek, B. (2001). High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation* 103, 3047-3050.

Sheikine, Y., and Hansson, G.K. (2004). Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med* 36, 98-118.

Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Li, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., *et al.* (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394, 284-287.

Shih, P.T., Brennan, M.L., Vora, D.K., Territo, M.C., Strahl, D., Elices, M.J., Lusis, A.J., and Berliner, J.A. (1999). Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res* 84, 345-351.

Siddiqi, S.A., Gorelick, F.S., Mahan, J.T., and Mansbach, C.M., 2nd (2003). COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 116, 415-427.

Silver, D.L., Wang, N., Xiao, X., and Tall, A.R. (2001). High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *The Journal of biological chemistry* 276, 25287-25293.

Simmonds, W.J., Hofmann, A.F., and Theodor, E. (1967). Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *The Journal of clinical investigation* 46, 874-890.

Singh, J.P., Kauffman, R., Bensch, W., Wang, G., McClelland, P., Bean, J., Montrose, C., Mantlo, N., and Wagle, A. (2005). Identification of a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, 2-methyl-2-(4-{3-[1-(4-methylbenzyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-yl]propyl}phenoxy)propanoic acid (LY518674), that produces marked changes in serum lipids and apolipoprotein A-1 expression. *Molecular pharmacology* 68, 763-768.

Sirtori, C.R., Calabresi, L., Franceschini, G., Baldassarre, D., Amato, M., Johansson, J., Salvetti, M., Monteduro, C., Zulli, R., Muiesan, M.L., *et al.* (2001). Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation* 103, 1949-1954.

Sirvent, A., Verhoeven, A.J., Jansen, H., Kosykh, V., Darteil, R.J., Hum, D.W., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2004). Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *Journal of lipid research* 45, 2110-2115.

Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., and Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8264-8268.

Spagnuolo, M.S., Cigliano, L., D'Andrea, L.D., Pedone, C., and Abrescia, P. (2005). Assignment of the binding site for haptoglobin on apolipoprotein A-I. *The Journal of biological chemistry* 280, 1193-1198.

Spinetti, G., Wang, M., Monticone, R., Zhang, J., Zhao, D., and Lakatta, E.G. (2004). Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 1397-1402.

Staels, B., Vu-Dac, N., Kosykh, V.A., Saladin, R., Fruchart, J.C., Dallongeville, J., and Auwerx, J. (1995). Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *The Journal of clinical investigation* 95, 705-712.

Stegemann, J.P., Hong, H., and Nerem, R.M. (2005). Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J Appl Physiol* 98, 2321-2327.

Storey, R.F., Oldroyd, K.G., and Wilcox, R.G. (2001). Open multicentre study of the P2T receptor antagonist AR-C69931MX assessing safety, tolerability and activity in patients with acute coronary syndromes. *Thrombosis and haemostasis* 85, 401-407.

Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1997). HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 2158-2166.

Suchy, F.J., and Ananthanarayanan, M. (2006). Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 Suppl 1, S10-16.

Sugano, M., Makino, N., Sawada, S., Otsuka, S., Watanabe, M., Okamoto, H., Kamada, M., and Mizushima, A. (1998). Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *The Journal of biological chemistry* 273, 5033-5036.

Sugano, M., Tsuchida, K., and Makino, N. (2000). High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 272, 872-876.

Sugatani, J., Miwa, M., Komiyama, Y., and Ito, S. (1996). High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal* 13, 73-88.

Sun, B., Eckhardt, E.R., Shetty, S., van der Westhuyzen, D.R., and Webb, N.R. (2006). Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts. *Journal of lipid research* 47, 1700-1713.

Sundaram, M., Zhong, S., Khalil, M.B., Links, P.H., Zhao, Y., Iqbal, J., Hussain, M.M., Parks, R.J., Wang, Y., and Yao, Z. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *Journal of lipid research* 51, 150-161.

- Tamagaki, T., Sawada, S., Imamura, H., Tada, Y., Yamasaki, S., Toratani, A., Sato, T., Komatsu, S., Akamatsu, N., Yamagami, M., *et al.* (1996). Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* *123*, 73-82.
- Tamminen, M., Mottino, G., Qiao, J.H., Breslow, J.L., and Frank, J.S. (1999). Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *19*, 847-853.
- Tangirala, R.K., Tsukamoto, K., Chun, S.H., Usher, D., Pure, E., and Rader, D.J. (1999). Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* *100*, 1816-1822.
- Tanigawa, H., Billheimer, J.T., Tohyama, J., Fuki, I.V., Ng, D.S., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2009). Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* *120*, 160-169.
- Tardif, J.C., Gregoire, J., L'Allier, P.L., Ibrahim, R., Lesperance, J., Heinonen, T.M., Kouz, S., Berry, C., Bassar, R., Lavoie, M.A., *et al.* (2007). Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *Jama* *297*, 1675-1682.
- Taylor, A.J., Lee, H.J., and Sullenberger, L.E. (2006). The effect of 24 months of combination statin and extended-release niacin on carotid intima-media thickness: ARBITER 3. *Curr Med Res Opin* *22*, 2243-2250.
- Temel, R.E., Sawyer, J.K., Yu, L., Lord, C., Degirolamo, C., McDaniel, A., Marshall, S., Wang, N., Shah, R., Rudel, L.L., *et al.* Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell metabolism* *12*, 96-102.
- Temel, R.E., Tang, W., Ma, Y., Rudel, L.L., Willingham, M.C., Ioannou, Y.A., Davies, J.P., Nilsson, L.M., and Yu, L. (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1968-1978.
- Terasaka, N., Hiroshima, A., Koieyama, T., Ubukata, N., Morikawa, Y., Nakai, D., and Inaba, T. (2003). T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett* *536*, 6-11.
- Terra, S.G., Francone, O.L., Contant, C.F., Gao, X., Lewin, A.J., and Nguyen, T.T. (2008). Efficacy and safety of a potent and selective peroxisome proliferator activated receptor alpha agonist in subjects with dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* *102*, 434-439.
- Theilmeyer, G., De Geest, B., Van Veldhoven, P.P., Stengel, D., Michiels, C., Lox, M., Landeloos, M., Chapman, M.J., Ninio, E., Collen, D., *et al.* (2000). HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE<sup>-/-</sup> mice. *Faseb J* *14*, 2032-2039.
- Thim, T., Hagensen, M.K., Bentzon, J.F., and Falk, E. (2008). From vulnerable plaque to atherothrombosis. *J Intern Med* *263*, 506-516.

Thompson, A., Di Angelantonio, E., Sarwar, N., Erqou, S., Saleheen, D., Dullaart, R.P., Keavney, B., Ye, Z., and Danesh, J. (2008). Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *Jama* 299, 2777-2788.

Thurnhofer, H., and Hauser, H. (1990). Uptake of cholesterol by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry* 29, 2142-2148.

Timmins, J.M., Lee, J.Y., Boudyguina, E., Kluckman, K.D., Brunham, L.R., Mulya, A., Gebre, A.K., Coutinho, J.M., Colvin, P.L., Smith, T.L., *et al.* (2005). Targeted inactivation of hepatic *Abca1* causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *The Journal of clinical investigation* 115, 1333-1342.

Trigatti, B., Rayburn, H., Vinals, M., Braun, A., Miettinen, H., Penman, M., Hertz, M., Schrenzel, M., Amigo, L., Rigotti, A., *et al.* (1999). Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9322-9327.

Tso, C., Martinic, G., Fan, W.H., Rogers, C., Rye, K.A., and Barter, P.J. (2006). High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1144-1149.

Tu, A.Y., Nishida, H.I., and Nishida, T. (1993). High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *The Journal of biological chemistry* 268, 23098-23105.

Tunaru, S., Kero, J., Schaub, A., Wufka, C., Blaukat, A., Pfeffer, K., and Offermanns, S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med* 9, 352-355.

Uittenbogaard, A., Shaul, P.W., Yuhanna, I.S., Blair, A., and Smart, E.J. (2000). High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *The Journal of biological chemistry* 275, 11278-11283.

Urizar, N.L., Dowhan, D.H., and Moore, D.D. (2000). The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *The Journal of biological chemistry* 275, 39313-39317.

Valenta, D.T., Ogier, N., Bradshaw, G., Black, A.S., Bonnet, D.J., Lagrost, L., Curtiss, L.K., and Desrumaux, C.M. (2006). Atheroprotective potential of macrophage-derived phospholipid transfer protein in low-density lipoprotein receptor-deficient mice is overcome by apolipoprotein AI overexpression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1572-1578.

van der Gaag, M.S., van Tol, A., Vermunt, S.H., Scheek, L.M., Schaafsma, G., and Hendriks, H.F. (2001). Alcohol consumption stimulates early steps in reverse cholesterol transport. *Journal of lipid research* 42, 2077-2083.

van der Hoorn, J.W., de Haan, W., Berbee, J.F., Havekes, L.M., Jukema, J.W., Rensen, P.C., and Princen, H.M. (2008). Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma

levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE\*3Leiden.CETP mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 2016-2022.

van der Veen, J.N., Kruit, J.K., Havinga, R., Baller, J.F., Chimini, G., Lestavel, S., Staels, B., Groot, P.H., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2005). Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *Journal of lipid research* 46, 526-534.

van der Veen, J.N., van Dijk, T.H., Vrans, C.L., van Meer, H., Havinga, R., Bijsterveld, K., Tietge, U.J., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2009). Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *The Journal of biological chemistry* 284, 19211-19219.

van der Velde, A.E., Vrans, C.L., van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R.P., Kuipers, F., and Groen, A.K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 133, 967-975.

van der Velde, A.E., Vrans, C.L., van den Oever, K., Seemann, I., Oude Elferink, R.P., van Eck, M., Kuipers, F., and Groen, A.K. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G203-G208.

Van Lenten, B.J., Hama, S.Y., de Beer, F.C., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., La Du, B.N., Fogelman, A.M., and Navab, M. (1995). Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *The Journal of clinical investigation* 96, 2758-2767.

Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Jung, C.L., Ruchala, P., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Watson, A.D., Hama, S., Navab, M., Anantharamaiah, G.M., *et al.* (2008). Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *Journal of lipid research* 49, 2302-2311.

Vantourout, P., Martinez, L.O., Fabre, A., Collet, X., and Champagne, E. (2008). Ecto-F1-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes. *Mol Immunol* 45, 485-492.  
Varki, A. (1994). Selectin ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7390-7397.

Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2005). ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *The Journal of biological chemistry* 280, 30150-30157.

Vedhachalam, C., Duong, P.T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *The Journal of biological chemistry* 282, 25123-25130.

Vinals, M., Xu, S., Vasile, E., and Krieger, M. (2003). Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *The Journal of biological chemistry* 278, 5325-5332.

- Viswambharan, H., Ming, X.F., Zhu, S., Hubsch, A., Lerch, P., Vergeres, G., Rusconi, S., and Yang, Z. (2004). Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* *94*, 918-925.
- von Kugelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* *110*, 415-432.
- Voshol, P.J., Schwarz, M., Rigotti, A., Krieger, M., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2001). Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. *The Biochemical journal* *356*, 317-325.
- Vrins, C., Vink, E., Vandenberghe, K.E., Frijters, R., Seppen, J., and Groen, A.K. (2007). The sterol transporting heterodimer ABCG5/ABCG8 requires bile salts to mediate cholesterol efflux. *FEBS Lett* *581*, 4616-4620.
- Vrins, C.L., Van der Velde, A.E., Van den Oever, K., Levels, J.H., Huet, S., Oude Elferink, R.P., Kuipers, F., and Groen, A.K. (2009). PPAR $\delta$  activation leads to increased trans intestinal cholesterol efflux. *Journal of lipid research*.
- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.C., Staels, B., and Auwerx, J. (1995). Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *The Journal of clinical investigation* *96*, 741-750.
- Wadham, C., Albanese, N., Roberts, J., Wang, L., Bagley, C.J., Gamble, J.R., Rye, K.A., Barter, P.J., Vadas, M.A., and Xia, P. (2004). High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation* *109*, 2116-2122.
- Wang, L., Jacobsen, S.E., Bengtsson, A., and Erlinge, D. (2004). P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34<sup>+</sup> stem and progenitor cells. *BMC immunology* *5*, 16.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., and Tall, A.R. (1998). Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* *273*, 32920-32926.
- Wang, R., Salem, M., Yousef, I.M., Tuchweber, B., Lam, P., Childs, S.J., Helgason, C.D., Ackerley, C., Phillips, M.J., and Ling, V. (2001). Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 2011-2016.
- Wang, X., Collins, H.L., Ranalletta, M., Fuki, I.V., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., Tall, A.R., and Rader, D.J. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *The Journal of clinical investigation* *117*, 2216-2224.

Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X., and Goldstein, J.L. (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77, 53-62.

Wang, Y., Tran, K., and Yao, Z. (1999). The activity of microsomal triglyceride transfer protein is essential for accumulation of triglyceride within microsomes in McA-RH7777 cells. A unified model for the assembly of very low density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* 274, 27793-27800.

Watson, A.D., Navab, M., Hama, S.Y., Sevanian, A., Prescott, S.M., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Du, B.N., Fogelman, A.M., and Berliner, J.A. (1995). Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *The Journal of clinical investigation* 95, 774-782.

Weibel, G.L., Alexander, E.T., Joshi, M.R., Rader, D.J., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (2007). Wild-type ApoA-I and the Milano variant have similar abilities to stimulate cellular lipid mobilization and efflux. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2022-2029.

Weinstein, M.M., Yin, L., Beigneux, A.P., Davies, B.S., Gin, P., Estrada, K., Melford, K., Bishop, J.R., Esko, J.D., Dallinga-Thie, G.M., *et al.* (2008). Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 283, 34511-34518.

Weisgraber, K.H., Bersot, T.P., Mahley, R.W., Franceschini, G., and Sirtori, C.R. (1980). A-Milano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *The Journal of clinical investigation* 66, 901-907.

Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Oude Elferink, R.P., Kuipers, F., and Tietge, U.J. (2009). Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice. *Hepatology* 50, 1263-1272.

Williamson, R., Lee, D., Hagaman, J., and Maeda, N. (1992). Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7134-7138.

Wittenburg, H., and Carey, M.C. (2002). Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *The Journal of clinical investigation* 110, 605-609.

Wood, P.D., Stefanick, M.L., Dreon, D.M., Frey-Hewitt, B., Garay, S.C., Williams, P.T., Superko, H.R., Fortmann, S.P., Albers, J.J., Vranizan, K.M., *et al.* (1988). Changes in plasma lipids and lipoproteins in overweight men during weight loss through dieting as compared with exercise. *The New England journal of medicine* 319, 1173-1179.

Wool, G.D., Reardon, C.A., and Getz, G.S. (2008). Apolipoprotein A-I mimetic peptide helix number and helix linker influence potentially anti-atherogenic properties. *Journal of lipid research* 49, 1268-1283.

Wustner, D. (2006). Quantification of polarized trafficking of transferrin and comparison with bulk membrane transport in hepatic cells. *The Biochemical journal* 400, 267-280.

Xia, P., Vadas, M.A., Rye, K.A., Barter, P.J., and Gamble, J.R. (1999). High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *The Journal of biological chemistry* 274, 33143-33147.

Yabe, D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12753-12758.

Yancey, P.G., and Jerome, W.G. (1998). Lysosomal sequestration of free and esterified cholesterol from oxidized low density lipoprotein in macrophages of different species. *Journal of lipid research* 39, 1349-1361.

Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Abersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489-500.

Yang, X.P., Yan, D., Qiao, C., Liu, R.J., Chen, J.G., Li, J., Schneider, M., Lagrost, L., Xiao, X., and Jiang, X.C. (2003). Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1601-1607.

Yegutkin, G.G., Henttinen, T., and Jalkanen, S. (2001). Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *Faseb J* 15, 251-260.

Yu, K.C., Jiang, Y., Chen, W., and Cooper, A.D. (1999). Evaluation of the components of the chylomicron remnant removal mechanism by use of the isolated perfused mouse liver. *Journal of lipid research* 40, 1899-1910.

Yu, L., Hammer, R.E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2002a). Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16237-16242.

Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R.E., Berge, K.E., Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2002b). Overexpression of *ABCG5* and *ABCG8* promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *The Journal of clinical investigation* 110, 671-680.

Yu, L., York, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2003). Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *The Journal of biological chemistry* 278, 15565-15570.

Yuhanna, I.S., Zhu, Y., Cox, B.E., Hahner, L.D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., Marcel, Y.L., Anderson, R.G., Mendelsohn, M.E., Hobbs, H.H., *et al.* (2001). High-density lipoprotein

binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 7, 853-857.

Yvan-Charvet, L., Matsuura, F., Wang, N., Bamberger, M.J., Nguyen, T., Rinninger, F., Jiang, X.C., Shear, C.L., and Tall, A.R. (2007). Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1132-1138.

Zannis, V.I., Chroni, A., and Krieger, M. (2006). Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 84, 276-294.

Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009). LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science (New York, NY)* 325, 100-104.

Zhang, F.L., Luo, L., Gustafson, E., Palmer, K., Qiao, X., Fan, X., Yang, S., Laz, T.M., Bayne, M., and Monsma, F., Jr. (2002a). P2Y(13): identification and characterization of a novel Galphai-coupled ADP receptor from human and mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 301, 705-713.

Zhang, L.H., Kamanna, V.S., Zhang, M.C., and Kashyap, M.L. (2008). Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *Journal of lipid research* 49, 1195-1201.

Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, NY)* 258, 468-471.

Zhang, W.J., Stocker, R., McCall, M.R., Forte, T.M., and Frei, B. (2002b). Lack of inhibitory effect of HDL on TNFalpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 165, 241-249.

Zhang, Y., Da Silva, J.R., Reilly, M., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2005a). Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *The Journal of clinical investigation* 115, 2870-2874.

Zhang, Y., Schmidt, R.J., Foxworthy, P., Emkey, R., Oler, J.K., Large, T.H., Wang, H., Su, E.W., Mosior, M.K., Eacho, P.I., *et al.* (2005b). Niacin mediates lipolysis in adipose tissue through its G-protein coupled receptor HM74A. *Biochemical and biophysical research communications* 334, 729-732.

Zhang, Y., Zanotti, I., Reilly, M.P., Glick, J.M., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2003). Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 108, 661-663.

Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M.L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M., Schmitt, D., Fu, X., Thomson, L., Fox, P.L., *et al.* (2004). Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *The Journal of clinical investigation* 114, 529-541.

Zhou, X., Nicoletti, A., Elhage, R., and Hansson, G.K. (2000). Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* *102*, 2919-2922.





# **ANNEXES**



## ANNEXE 1: ARTICLE 3

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Molecular Immunology 45 (2008) 485–492

**Molecular  
Immunology**
[www.elsevier.com/locate/molimm](http://www.elsevier.com/locate/molimm)

## Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes

Pierre Vantourout<sup>a,b</sup>, Laurent O. Martinez<sup>a,b</sup>, Aurélie Fabre<sup>a,b</sup>,  
Xavier Collet<sup>a,b</sup>, Eric Champagne<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, U563, Toulouse, France<sup>b</sup> Université Toulouse III Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Département Lipoprotéines et Médiateurs Lipidiques, Institut Claude de Prével (IFR30), Toulouse, France

Received 26 March 2007; accepted 21 May 2007

Available online 23 July 2007

### Abstract

Subunits of the mitochondrial ATP synthase complex are expressed on the surface of tumors, bind the TCR of human V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 lymphocytes and promote their cytotoxicity. Present experiments demonstrate that MHC-class I antigen expression correlates with low MHC-class I antigen expression. MHC-class I antigen precipitates from immunofluorescence-negative cells by mild acid treatment so that most surface MHC-I molecules are precipitated. MHC-I molecules detected by immunofluorescence on primary fibroblasts and T cells following IFN- $\gamma$  and/or TNF- $\alpha$  treatment induce co-immunoprecipitation of surface components co-immunoprecipitate with MHC-I. Confocal microscopy analysis of MHC-I and ecto-F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  chain domains. This demonstrates that the TCR target activity through binding to natural killer inhibitor-1 (NKG2C) on MHC-I antigens. © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANN  
EXES

complex (called ecto-F<sub>1</sub>-ATPase) at the cell surface by immunofluorescence. Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase are detected in membrane protein precipitates. Removal of  $\beta$ 2-microglobulin by mild acid treatment so that most surface MHC-I molecules are precipitated. Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase is detected by immunofluorescence on primary fibroblasts and T cells following IFN- $\gamma$  and/or TNF- $\alpha$  treatment induce co-immunoprecipitation of surface components co-immunoprecipitate with MHC-I. Confocal microscopy analysis of MHC-I and ecto-F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  chain domains. This demonstrates that the TCR target activity through binding to natural killer inhibitor-1 (NKG2C) on MHC-I antigens which are known to control V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell

**Keywords:** Innate immunity; Gamma-delta lymphocytes; ATP synthase; MHC-class I antigens

### 1. Introduction

T lymphocytes expressing an antigen receptor (TCR) of the  $\gamma\delta$  type represent a small fraction (1–5%) of T cells in human blood and lymph nodes although they may be more abundant in mucosae-associated lymphoid tissues. Striking

features of these lymphocytes include an activated cell phenotype and a biased TCR V gene repertoire varying with their tissue distribution, so that the vast majority of human peripheral  $\gamma\delta$  cells express a V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 TCR variable region gene combination (for reviews, see Hayday, 2000; Pennington et al., 2005). These V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cells proliferate *in vivo* and *in vitro* in response to bacterial non-peptidic phosphorylated antigens termed phosphoantigens (PAg) in a TCR-dependent manner. To date the most powerful natural phosphoantigen is hydroxy-dimethylallyl pyrophosphate (HDMAPP), a metabolite of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) pathway of isoprenoid biosynthesis in plants and bacteria (Bukowski et al., 1998; Morita et al., 2007; Poupot and Fournie, 2004). How the bacterial PAgS produced by infected cells are presented to T cells is poorly understood although evidence exist that this requires a cell–cell contact which can be between sister V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cells

**Abbreviations:** ApoA1, apolipoprotein A-I;  $\beta$ 2m, beta-2-microglobulin;  $\alpha$ -F<sub>1</sub>,  $\beta$ -F<sub>1</sub>, alpha and beta subunits of F<sub>1</sub> domain of ATP synthase; EBV-B, Epstein–Barr virus-immortalized B cell line; TAP, transporter associated with antigen processing; MHC-I, MHC-class I antigens; iNKR, inhibitory natural killer cell receptor for MHC-class I antigens

\* Corresponding author at: INSERM U563, Bâtiment C, CHU Purpan BP3028, Toulouse F-31024, France. Tel.: +33 5 62 74 86 69; fax: +33 5 62 74 86 66.

E-mail address: [Eric.Champagne@toulouse.inserm.fr](mailto:Eric.Champagne@toulouse.inserm.fr) (E. Champagne).

0161-5890/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.molimm.2007.05.026

(Bonneville and Fournie, 2005; Green et al., 2004; Lang et al., 1995; Morita et al., 1995).

V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cells are also activated by several tumoral cell lines including hematopoietic tumors Daudi (Burkitt's lymphoma), RPMI8226 (myeloma) and K562 (erythroleukemia), and solid tumors such as renal cell carcinomas which are frequently found to be associated with V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell infiltrates in vivo (Zocchi and Poggi, 2004). Recent findings implicate ubiquitous endogenous phosphoantigens (isopentenyl pyrophosphate and dimethylallyl-pyrophosphate) in V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell activation by tumors. Indeed, their accumulation or depletion following modulation of the mevalonate pathway by aminobisphosphonates or statins leads to an increase or decrease of the stimulatory activity, respectively (Gober et al., 2003). Again, activation by these metabolites is likely to require some form of antigen presentation by unknown structures.

We recently described the presence of components of the mitochondrial ATP synthase on the surface of tumor cells with stimulatory activity for V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 lymphocytes (Scotet et al., 2005). This structure, referred to as ecto-F<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>) binds a soluble form of apolipoprotein A-I (ApoA1) so that an F<sub>1</sub>-ApoA1 complex is frequently detected on the surface of stimulatory tumors. Moreover, purified soluble forms of F<sub>1</sub> and ApoA1 both specifically bind to a recombinant soluble V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 TCR and the F<sub>1</sub>-ApoA1 complex is stimulatory for V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cells when immobilized on polystyrene beads. These components could be involved in endogenous phosphoantigen presentation although there is still no direct evidence for this.

Cell surface expression of F<sub>1</sub> is not confined to tumor cells as several studies have shown the presence and enzymatic activity of F<sub>1</sub> on hepatocytes, keratinocytes or endothelial cells (Burrell et al., 2005; Champagne et al., 2006; Martinez et al., 2003; Moser et al., 1999). In the present paper, we provide evidence that F<sub>1</sub> is more frequently expressed on the surface of tumoral and non-tumoral cells than previously thought on the basis of immunofluorescence analyses and that a close association exists between F<sub>1</sub> and Major Histocompatibility Complex class I antigens (MHC-I). Indeed, when these antigens are highly expressed, they can prevent F<sub>1</sub> detection. Knowing that V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell activation is strictly controlled by activatory and inhibitory receptors for MHC-I antigens (Fisch et al., 1997; Halary et al., 1997; Poccia et al., 1997; Trichet et al., 2006), this has important functional implications regarding the regulation of their anti-tumoral and inherent anti-self reactivity.

## 2. Material and methods

### 2.1. Tumor cell lines, cultures and antibodies

Cell lines are from the ATCC except the human  $\beta$ 2m Daudi transfectant (Anne Quillet, Toulouse, France) and RCC7 (Anne Caignard, Villejuif, France). 721.221 (MHC-I deficient; Shimizu and De Mars, 1989) and Awells (IHW#9090) are EBV-B cell lines. ST-EMO (BBV-B) and ST-F1 (primary fibroblast) are derived from a TAP-deficient patient (provided by Henry de la Salle, Strasbourg, France). HD-F1 are normal primary foreskin fibroblasts obtained from Purpan Hospital pediatric surgery

department (Toulouse, France). RMA is a murine T lymphoma and RMA-S is its TAP-deficient variant (Ljunggren and Karre, 1985). Cell lines were cultivated in RPMI 1640 medium except for HepG2, primary fibroblasts and RCC7 (DMEM), supplemented with FCS, glutamine and antibiotics.

The monoclonal anti- $\alpha$  (clone 7H10, IgG<sub>2b</sub>) and anti- $\beta$  (clone 3D5, IgG<sub>1</sub>) F<sub>1</sub>-ATPase antibodies used for immunofluorescence were from Molecular Probes. For immunoblotting studies, anti- $\alpha$ -F<sub>1</sub> (clone 51, IgG<sub>2a</sub>) and anti- $\beta$ -F<sub>1</sub> (clone 10, IgG<sub>1</sub>) were from BD Biosciences. The anti-cytochrome *c* antibody (clone 7H8.2C12, IgG<sub>2b</sub>) was from R&D Systems. The anti-HLA-DR FITC antibody (Immu-257, IgG<sub>1</sub>) and isotype controls were from Beckman-Coulter. The anti-CD19 antibody (clone LT19, IgG<sub>1</sub>) was from Exbio (Prague, Czech Republic). The HC10 (anti-MHC-I free heavy chain) antibody (Stam et al., 1990) was kindly provided by Dr. H.L. Ploegh (Cambridge, MA). The W6/32 hybridoma (anti-HLA-class I) was obtained from ATCC. The anti-H-2K<sup>b</sup>D<sup>b</sup> was from Cedarlane Laboratories.

### 2.2. Induction of MHC-I expression by cytokines and flow cytometry analysis

Fibroblast cells and other adherent cell lines were plated the day before treatment on six-well dishes. Control Daudi cells were grown in suspension. For MHC-class I induction experiments, IFN- $\gamma$  and/or TNF- $\alpha$  (Biosource) were added to cell cultures (48 h). Adherent cells were harvested using ice-cold PBS containing 10 mM EDTA. Cells were then washed with PBS 5% FCS (FACS medium). Staining and washing were performed in FACS medium using a standard indirect immunofluorescence procedure. Primary mAbs and isotypic controls were used at the concentration of 5–10  $\mu$ g/ml. Secondary staining was performed using polyclonal goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG-FITC (Dako Cytomation). Data were acquired on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences).

### 2.3. Disruption of cell surface MHC-I by acid treatment

The procedure described by Dong et al. (2003) was used with minor modifications. Briefly, cells were harvested, washed once in PBS and incubated for 1 min on ice in 1 ml of citrate-phosphate buffer (66 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 131 mM citric acid, 1% BSA, pH 3) or PBS as a control. pH was neutralized by the addition of 9 ml of PBS (pH 13), and cells were pelleted, washed once with FACS medium, and stained immediately for flow cytometry analysis or put back in culture.

### 2.4. Streptavidin pull-down and co-immunoprecipitation experiments

Biotinylation and precipitation of cell surface proteins was performed according to Altin and Pagler (1995) with few modifications using the membrane-impermeant NHS-LC-biotin reagent (Pierce, 0.25 mg/ml). Co-precipitation of F<sub>1</sub> components with MHC did not require cross-linking. After cell lysis (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, Tris 20 mM, pH 7.6, anti-proteases) and centrifugation (10,000 g, 15 min, 4 °C)

to remove insoluble material, lysates were pre-cleared with CL4B-sepharose beads and incubated for 3 h at 4 °C with streptavidin-sepharose beads (GE Healthcare) or with protein G-sepharose beads previously incubated with mAbs (1 µg). Proteins were eluted at 100 °C in Laemmli buffer (5% 2-ME) and loaded for standard 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. Immunodetection was performed using primary antibodies at 1 µg/ml followed by a secondary goat anti-mouse IgG-Horse Radish Peroxidase-conjugated Ab (Mouse Trueblot, eBioscience, San Diego, CA) or streptavidin-HRP (GE Healthcare) and chemiluminescence (Sigma Co.).

### 2.5. Confocal microscopy

HepG2 cells were seeded ( $10^6$  cells/well, 48 h) on collagen-I-coated round coverslips (Biocoat, BD Biosciences) in six-wells culture plates. Cells were then washed and fixed (4%

paraformaldehyde, 15 min, 4 °C) and coverslips were saturated (PBS plus 0.2% gelatin, 1 h, room temperature). After addition of primary mAb (3D5, anti-βF<sub>1</sub>, IgG<sub>1</sub>, 10 µg/ml, 1 h, 4 °C), samples were washed and stained with Alexa 568-conjugated anti-IgG<sub>1</sub> (Molecular Probes) and FITC-conjugated W6/32 mAb (IgG<sub>2a</sub>). After washing, coverslips were dried, mounted on slides (PBS, 90% glycerol, 2.5% DABCO) and examined using a LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss). The absence of cross-reactivity of anti-IgG<sub>1</sub> antibodies towards IgG<sub>2a</sub> was checked.

## 3. Results

### 3.1. Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase and MHC-I expression by cytometry

We previously documented the expression of components of F<sub>1</sub> on the surface of cell lines sensitive to lysis by Vγ9/Vδ2

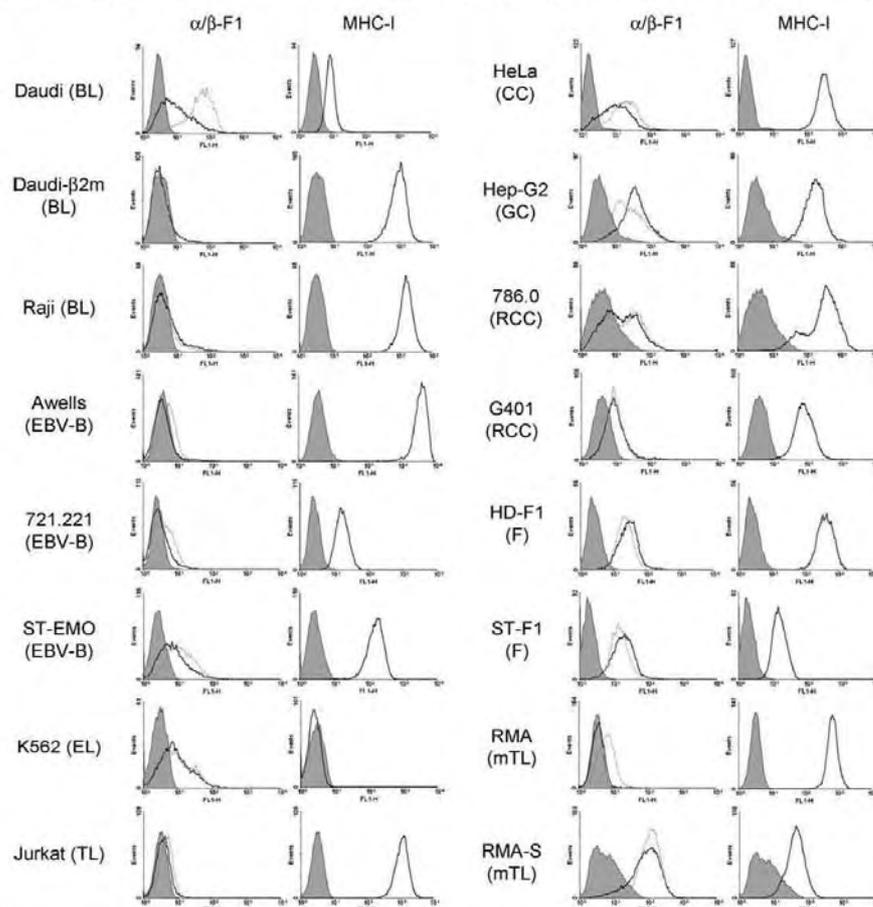


Fig. 1. MHC-I and ecto-F<sub>1</sub> expression on cell lines. Cells were analyzed by standard indirect immunofluorescence for MHC-I (W6/32 for human cell lines, anti-H-2K<sup>b</sup>D<sup>b</sup> for RMA and RMA-S) and ecto-F<sub>1</sub>-ATPase expression (α and β chains) after gating on viable cells on the forward scatter/side scatter dot plot. Cell lines are described in Section 2. BL: Burkitt's lymphomas; EBV-B: Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cell lines; TL: T-cell leukaemia; HC: hepatocarcinoma; F: fibroblasts; mTL: murine T cell lymphoma; W6/32 is an antibody against native MHC-I antigens. Solid lines: anti-α-F<sub>1</sub> or W6/32; dashed lines: anti-β-F<sub>1</sub>; shadowed histograms: irrelevant IgG<sub>1</sub> control.

lymphocytes. Other studies have independently reported the presence of the same components on hepatocytes (Martinez et al., 2003), endothelial cells (Chang et al., 2002; Moser et al., 1999), adipocytes (Kim et al., 2004) or keratinocytes (Burrell et al., 2005). We have now extended these findings by the cytofluorometry analysis of several other tumoral and non-tumoral cell lines (Fig. 1). In addition to Daudi and K562, renal carcinomas and HepG2 tumors, the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of  $F_1$  are readily detected on the surface of HeLa cells and primary fibroblasts. As previously reported, these components are very weakly or not detected on Raji cells, Jurkat cells, and most EBV-transformed B-lymphoblastoid cells lines such as Awells, LG2, RPMI-8866 (Fig. 1 and data not shown). Daudi cells barely express MHC-class I antigens due to the lack of the MHC-I light chain  $\beta 2$ -microglobulin ( $\beta 2m$ ). Strikingly  $F_1$  is undetectable on  $\beta 2m$ -transfected Daudi cells which express high levels of MHC-I.  $F_1$  is also detected on the TAP-deficient B-lymphoblastoid line ST-EMO which has a strongly reduced expression of MHC-I antigens due to abnormal peptide loading. Similar observations can be made with the murine T cell lymphoma RMA ( $F_1^+$ ) and its TAP-deficient counterpart RMA-S ( $F_1^-$ ). This suggests that surface staining of  $F_1$  components correlates with a lower level of MHC-I expression. The correlation is however not absolute since the MHC-I-deficient 721.221 B-EBV cell line does not stain for  $F_1$ .

### 3.2. Biochemical detection of ecto- $F_1$ -ATPase

In order to examine the presence of ecto- $F_1$  components using a biochemical approach, cell surface proteins from  $F_1^+$  and  $F_1^-$  lines were biotinylated and solubilized membrane proteins were

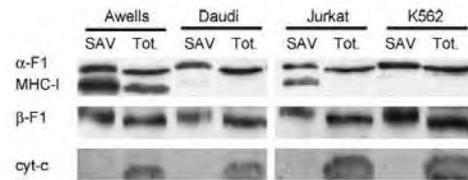


Fig. 2. Immunoprecipitation of ecto- $F_1$  components. Daudi, Awells, K562 and Jurkat cells were surface-biotinylated. Membrane proteins were precipitated with streptavidin-coated beads and separated by denaturing PAGE. Identical membranes were immunoblotted with anti- $\alpha$ - $F_1$  and HC10 (anti-MHC-I free heavy chains) antibodies or with anti- $\beta$ - $F_1$  and anti-cytochrome  $c$  antibodies. Note that  $\sim 100$  times more cells are used for streptavidin pull-downs than for total lysates (used as size controls for  $F_1$  components). This explains why MHC bands are not detected in total lysates from Jurkat cells. Slight shifts in migration are due to the biotinylation of the surface proteins in streptavidin pull-downs.

precipitated with streptavidin, separated on a polyacrylamide gel and immunoblotted with anti- $\alpha$  and anti- $\beta$ - $F_1$  antibodies (Fig. 2). This confirmed the presence of the  $\alpha$  and  $\beta$ - $F_1$  chains on the surface of Daudi and K562 cells. Strikingly, the same components were also present in the precipitates of surface proteins from cell lines staining negatively, Awells and Jurkat. As a control for a possible mitochondrial contamination of streptavidin precipitates, membranes were also immunoblotted with an anti-cytochrome  $c$  antibody. The absence of detection of cytochrome  $c$  in streptavidin precipitates indicates that mitochondrial contamination is unlikely to account for the detection of  $F_1$  components. More likely, this suggests that  $F_1$  is present on Jurkat and Awells cells but was not detected by flow cytometry.

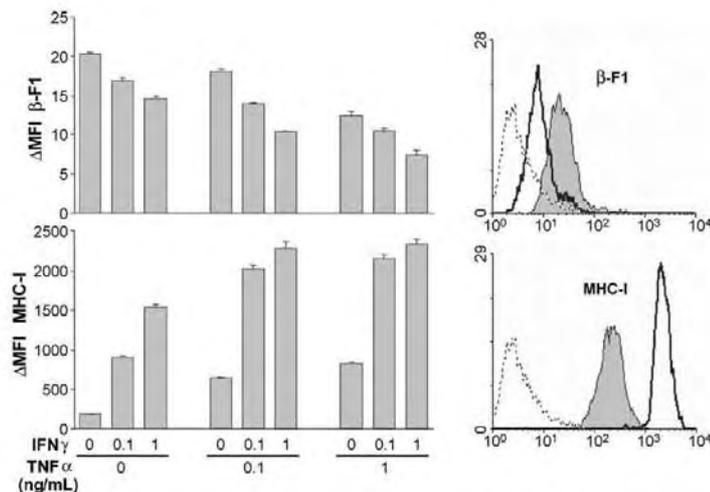


Fig. 3. Induction of MHC-class I antigens by cytokine treatment. Normal primary fibroblasts were grown for 48 h in the presence of the indicated concentration of IFN- $\gamma$  and/or TNF- $\alpha$  to induce the expression of MHC-class I antigens in a dose-dependent fashion. At the end of the culture, cells were recovered and analyzed by flow cytometry for the expression of  $\beta$ - $F_1$  and MHC-class I antigens (W6/32) as described in Fig. 1 and in Section 2.  $\Delta$ MFI: mean fluorescence intensity after subtraction of isotype control fluorescence ( $3.53 \pm 0.45$ ). Each bar is the mean result from triplicate cultures ( $\pm$ S.E.M.). Right panels: representative histograms of fibroblast staining with anti- $\beta$ - $F_1$  (top) and W6/32 (bottom) antibodies after culture with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (both 1 ng/ml; solid lines) or control cultures (shaded histograms). Dashed lines represent the isotype control staining. Similar results were obtained with the HepG2 cell line.

### 3.3. MHC-I antigens mask ecto-F<sub>1</sub>-ATPase epitopes

The inverse correlation between F<sub>1</sub> and MHC-I detection suggests that MHC-I expression might interfere with F<sub>1</sub> detection. In order to confirm this hypothesis, we took advantage of the HD-F1 primary fibroblasts which stain strongly for  $\alpha$  and  $\beta$ -F<sub>1</sub>. On this line, MHC-I antigens are expressed to a moderate level and can be strongly up-regulated in a dose-dependent manner following culture in the presence of varying doses of interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Cytokine-treated cells were thus monitored for F<sub>1</sub> and MHC-I expression by FACS. The experiment depicted in Fig. 3 shows that the  $\beta$ -F<sub>1</sub> chain staining progressively declines while MHC-I antigens are up-regulated on the HD-F1 cell surface. Optimal treatment with the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  cytokine combination leads to an about 65% reduction of  $\beta$ -F<sub>1</sub> staining while MHC-I expression is stimulated  $\sim$ 11-folds. Interestingly, the modulation of  $\beta$ -F<sub>1</sub> staining is more sensitive to TNF- $\alpha$  treatment than to IFN- $\gamma$  treatment. Conversely, overall MHC-I antigens are up-regulated more strongly with IFN- $\gamma$  than with TNF- $\alpha$ , in accordance with published observations (Johnson, 2003). Similar results have been obtained using the HepG2 hepatocarcinoma line. When this cytokine treatment is applied to the MHC-I deficient lines Daudi and K562, this does not lead to significant variations of F<sub>1</sub> staining, indicating that the decrease in F<sub>1</sub> staining on fibroblasts or HepG2 cells is not due to a down modulation of  $\beta$ -F<sub>1</sub> on the cell surface following cytokine treatment (data not shown). However, these experiments do not formally

exclude a coordinated inverse regulation of ecto-F<sub>1</sub> and MHC-I antigens.

Polakova et al. (1993) have previously shown that short acid treatment of mammalian cells at low pH promotes the dissociation of MHC-I antigens leading to the loss of antigenicity (Sugawara et al., 1987) and release of  $\beta$ 2m so that acid-treated cells display essentially free MHC-I heavy chains. In an attempt to reveal ecto-F<sub>1</sub>-ATPase on the surface of MHC-I-high cells, we used this approach to disrupt MHC antigens. This treatment was applied to Raji cells, which support this treatment with no visible change in morphology as evaluated by the forward and side scatter analysis by FACS, without significant cell death monitored by trypan blue incorporation, and no cell permeabilization monitored by propidium iodide staining (data not shown). MHC-I conformation was evaluated by cell staining with W6/32 antibody which detects native MHC-I antigens and HC10 which reacts selectively with free heavy chains. Acid treatment of Raji cells leads to an  $\sim$ 80% decrease of native MHC-I expression whereas the presence of free heavy chains is increased  $\sim$ 10-folds. Concomitantly, the  $\alpha$  and  $\beta$ -F<sub>1</sub> chains are revealed on the surface of acid-treated cells whereas the staining for MHC-II or CD19 antigens, used as controls, are unchanged (Fig. 4A and B). Acid-treated cells are still viable and can be re-cultured. This leads to a fast re-expression of native MHC-I antigens with a full recovery at  $\sim$ 6h. This is accompanied by a concomitant decrease of  $\beta$ -F<sub>1</sub> staining (Fig. 4C). The same acid treatment performed on MHC-deficient K562 (F<sub>1</sub><sup>+</sup>) and 721.221 (F<sub>1</sub><sup>-</sup>) cells does not induce any significant change in F<sub>1</sub> subunits detection,

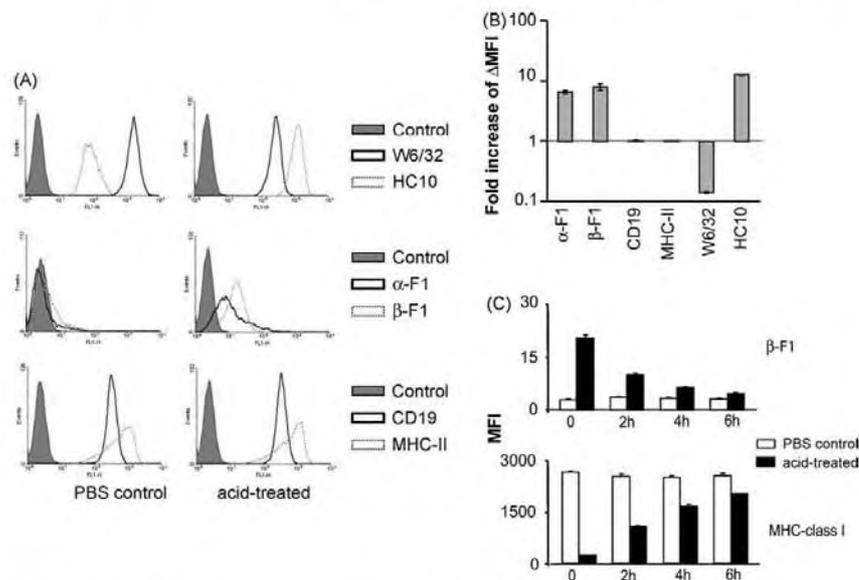


Fig. 4. Disruption of surface MHC class I by acid treatment reveals F<sub>1</sub> components. (A) Raji cells were submitted to brief acid treatment (1 min, pH 3) and stained for  $\alpha$ -F<sub>1</sub>,  $\beta$ -F<sub>1</sub>, MHC-I and control antigens. CD19: B-cell marker; MHC-II: MHC-class II antigens. W6/32 recognizes native MHC-class I antigens. HC10 is specific for  $\beta$ 2-microglobulin-free MHC-class I heavy chains. (B) Quantitative analysis of surface markers on acid-treated Raji cells. Results are expressed as fold increase of the specific fluorescence  $\Delta$ MFI.  $\Delta$ MFI: mean fluorescence intensity (MFI) after subtraction of isotype control fluorescence (mean of triplicate similarly-treated cell samples  $\pm$  S.E.M.). (C) Acid-treated cells or control (PBS-treated) Raji cells were put back in culture and monitored for  $\beta$ -F<sub>1</sub> and MHC-class I expression at the indicated time (mean of triplicate culture experiments  $\pm$  S.E.M.).

indicating that this is not a staining artifact due to acid treatment (data not shown). As metabolic modulation of antigen expression is not possible in this experimental setting, we conclude that MHC-I dissociation reveals F<sub>1</sub>  $\alpha$  and  $\beta$  epitopes on the surface of MHC-I-high cells. This is an indication of the close proximity of these structures on the cell surface.

#### 3.4. Close association between ecto-F<sub>1</sub>-ATPase components and MHC-I

In order to obtain direct evidence for an interaction between ecto-F<sub>1</sub> and MHC-I, we attempted to co-precipitate the complexes from lysates of MHC-I-high cells. Cells were surface-biotinylated and lysed. MHC-I antigens were immunoprecipitated using the W6/32 antibody, putative complexes were dissociated on a denaturing polyacrylamide gel and immunoblotted for the detection of F<sub>1</sub> components (Fig. 5). Immunoprecipitation of MHC-I brings down several membrane proteins revealed by blotting with streptavidin among which proteins at ~50 kDa membrane proteins. Immunoblotting of the membrane with an anti- $\alpha$ -F<sub>1</sub> antibody allows detection of a protein which migrates as the mitochondrial  $\alpha$ -F<sub>1</sub> (55 kDa) detected in total cell lysates. Similarly, immunoblotting with an anti- $\beta$ -F<sub>1</sub> antibody reveals that the  $\beta$  subunit (52 kDa) is also present in the MHC-I precipitate. This is a strong indication that ecto-F<sub>1</sub> and MHC-I antigens can be closely associated.

Finally, the co-localization of MHC-I and ecto-F<sub>1</sub> was analyzed by confocal microscopy using HepG2 cells on which the moderate MHC-I expression allows the detection of both complexes (Fig. 6). On these cells,  $\beta$ -F<sub>1</sub> staining reveals patch-like

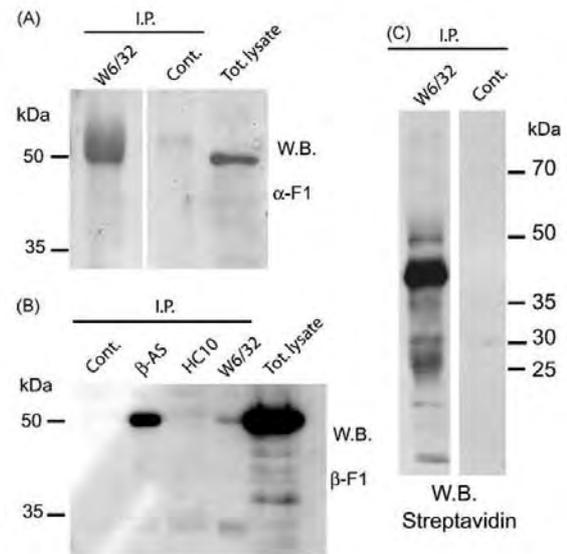


Fig. 5. Co-immunoprecipitation of MHC-class I and F<sub>1</sub> subunits. Raji cells were surface-biotinylated, lysed, and solubilized proteins were immunoprecipitated with the antibody indicated on top of each lane. Immunoprecipitated proteins ( $2 \times 10^7$  cells) and total lysates ( $2 \times 10^5$  cells) were separated on a 12% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose and blotted with anti- $\alpha$ -F<sub>1</sub> (A), anti- $\beta$ -F<sub>1</sub> (B) or with streptavidin (C) to detect MHC-I-associated membrane proteins. The antibodies used for immunoprecipitations and immunoblotting are described in Section 2. Note that  $\beta$ -F<sub>1</sub> components (B) are present in W6/32 precipitates (native MHC-I antigens) but not in HC10 precipitates (free MHC-I heavy chains).

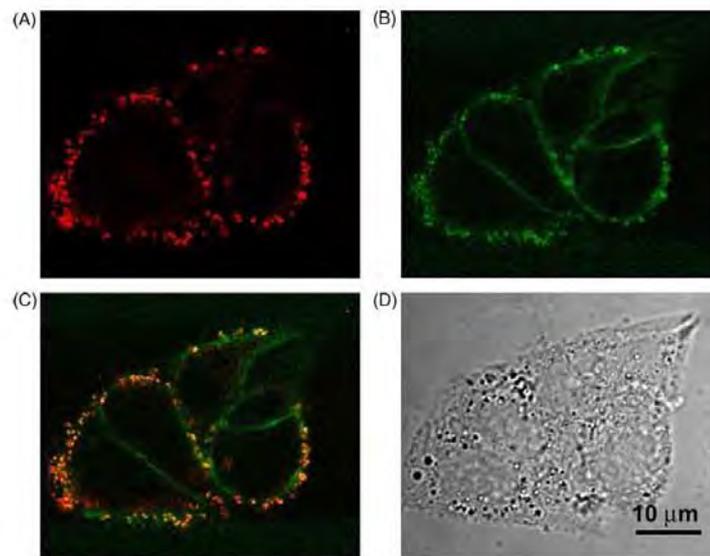


Fig. 6. Confocal analysis of MHC-I and  $\beta$ -F<sub>1</sub> on the membrane of HepG2 cells. Non-permeabilized HepG2 cells were stained simultaneously for native MHC-class I antigens (A; red) and  $\beta$ -F<sub>1</sub> (B; green) as described in Section 2. Panel C shows the merge of green and red images so that structures which co-localize appear yellow. (D) Differential interference contrast (DIC) image. Control experiments (not shown) were performed to control the isotype specificity of secondary antibody used (see Section 2).

structures on the cell surface as already reported on other cell types (Bae et al., 2004; Kim et al., 2004). Similar patches are also revealed with the anti-MHC-I although these antigens are also present on the remaining of the plasma membrane where they are more evenly distributed. Superimposition of MHC-I and  $F_1$  images indicates that  $F_1$  and MHC-I antibodies effectively co-localize on the plasma membrane but, unlike MHC antigens,  $F_1$  seems to be present selectively in the patch-like structures.

#### 4. Discussion

In this work, we provide evidence that ecto- $F_1$ -ATPase components are present on the cell surface of several cell lines in close proximity to MHC-I antigens. This proximity is such that it prevents antibody detection of  $F_1$  epitopes when MHC-I expression is sufficiently high. Moreover, MHC-I antigens coprecipitate with  $\alpha$  and  $\beta$ - $F_1$  subunits. This reveals a direct contact between these structures. The first question which comes to mind is whether the size of the two complexes is compatible with these observations. Assuming that ecto- $F_1$  has a structural arrangement similar to that of mitochondrial  $F_1$ -ATPase, the height of the ecto-domain above the membrane would be 83 Å for the  $\alpha_3\beta_3$  domain plus 50 Å for the central stalk of the complex connecting the  $\alpha_3\beta_3$  domain to the intra-membrane  $F_0$  domain (Stock et al., 2000). The height of the extra-membrane domain of MHC-I molecules is 70 Å as determined by crystallographic analysis (Bjorkman et al., 1987). There is thus a possible 20 Å overlap between the bottom part of the  $\alpha_3\beta_3$  domain and the top part of the MHC-I molecule. This putative overlapping region would then correspond to the C-terminal ends of  $\alpha$  and  $\beta$ - $F_1$ . The epitopes recognized by the antibodies used in immunofluorescence studies are not known but it is quite possible that the putative overlapping region contains multiple antibody epitopes which can be masked by the interaction. The  $(\alpha\beta)_3$  stoichiometry of the  $F_1$  complex is compatible with the observation that the density of MHC-I molecules on the cell surface influences the number of available epitopes for antibody binding.

The tissue distribution of ecto- $F_1$ -ATPase is not known, essentially due to the lack of antibodies able to label this structure on paraffin-embedded tissues. Many cell types have now been found to express ecto- $F_1$ -ATPase and this raises the possibility that this complex could have a ubiquitous distribution at the surface of mammalian cells. Indeed the ecto- $F_1$ -ATPase is detected on hepatocarcinoma cells, renal cell carcinomas, myeloma cells and Burkitt's lymphoma cells. This is not limited to tumor cells as we and others have found it expressed on primary fibroblasts (Fig. 1), on primary hepatocyte cultures (Martinez et al., 2003) and HUVEC cells (Chang et al., 2002; Moser et al., 1999). All these cell types display a low or moderate level of MHC-I antigens. On Raji and Jurkat cells, the presence of  $F_1$  is revealed by MHC-I disruption.

On most EBV-transformed lymphoblastoid cell lines,  $F_1$  expression is undetectable by cytometry. Until now, the only exception is the TAP-deficient ST-EMO lymphoblastoid B cell line which was derived from an immunodeficient patient and clearly expresses ecto- $F_1$ . One should notice that MHC-I expression on most EBV lines is so high that knock-down of  $\beta_2m$  using

the small interfering RNA method keep MHC-I levels above that of cells which are spontaneously  $F_1^+$  (data not shown). However MHC-I disruption by acid treatment of Awells cells can reveal  $F_1$  expression (not shown) and  $\alpha$  and  $\beta$ - $F_1$  chains can be labeled by surface-biotinylation of these cells (Fig. 2). This indicates that  $F_1$  is indeed present on the surface of at least some EBV-B cells. 721.221 may represent an exception as all attempts to detect  $F_1$  have failed in spite of extremely low MHC-I expression.

Results from Daudi ( $\beta_2m$ -deficient), ST-EMO and RMA-S (TAP-deficient) and their  $\beta_2m^+$  or TAP<sup>+</sup> counterparts, in conjunction with the effect of  $\beta_2m$  disruption by acid treatment suggest that MHC-I structures masking  $F_1$  epitopes are  $\beta_2m$ - and TAP-dependent. Immunoprecipitation experiments suggest that they are also reactive with W6/32 and thus conventional MHC-Ia antigens (HLA-A, B, C) as well as MHC-Ib HLA-G, E are good candidates. They must be weakly or not expressed on fibroblasts and more readily induced by TNF- $\alpha$  than by IFN- $\gamma$  on these cells as opposed to overall MHC-I antigens. They most probably have a murine counterpart as deduced from  $F_1$ -masking on RMA cells. Previous studies have reported a differential IFN- $\gamma$  inducibility for MHC-I loci. This is the case for HLA-B as compared to HLA-A and C (Hakem et al., 1989; Johnson, 2003) and for HLA-G as compared to HLA-B and C (Yang et al., 1996) whereas HLA-C is poorly inducible (Tibensky and Delovitch, 1990). We are currently investigating whether specific isotypes preferentially interact with  $F_1$  and whether non-conventional MHC-Ib antigens can also be part of complexes.

The nature of MHC-class I (or MHC-Ib) antigens interacting with  $F_1$  is particularly relevant to V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell activation mechanisms. There is multiple evidence that V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cells monitor MHC-class I and MHC-class Ib levels on the surface of tumors and cells presenting phosphoantigens. This is through their expression of HLA-class I-specific inhibitory receptors (iNKR) which bind conventional MHC-I molecules as well as HLA-E and G. They also express activatory receptors (such as NKG2D) which bind stress-induced MHC-like proteins MICA/B and proteins of the RAET1 family (Bacon et al., 2004). However, as the latter are not associated to  $\beta_2m$ , they probably do not play a role in  $F_1$  epitope masking.

We have previously shown that the V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 TCR binds to an  $F_1$ -ATPase/ApoA1 complex and that this recognition leads to V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell activation. The close association between the TCR ligand and the inhibitory ligand which regulates its activity may represent an important way to efficiently control TCR activity. Moreover, the TCR ligand ApoA1 is detected on tumor cells and its presence correlates with the detection of  $\beta$ - $F_1$  and low MHC-class I expression (Scotet et al., 2005). It is thus possible that soluble ApoA1 somehow competes with MHC-class I on  $F_1$  and favors TCR binding when the MHC density is low. This may represent an important mechanism controlling V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell activation.

#### Acknowledgements

We thank Dr. H. Ploegh for generously providing the HC10 monoclonal antibody, Dr. H. de la Salle for TAP-deficient lines and Pr. A. Hovnanian for normal fibroblasts. We are grateful to F.

L'Faqihi and S. Allart (IFR30) for their assistance in cytometry and confocal microscopy analyses. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, grants # 3495 and #3711) and the Ligue Nationale Contre le Cancer (#RAB07002BBA).

## References

- Altin, J.G., Pagler, E.B., 1995. A one-step procedure for biotinylation and chemical cross-linking of lymphocyte surface and intracellular membrane-associated molecules. *Anal. Biochem.* 224, 382–389.
- Bacon, L., Eagle, R.A., Meyer, M., Easom, N., Young, N.T., Trowsdale, J., 2004. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J. Immunol.* 173, 1078–1084.
- Bae, T.J., Kim, M.S., Kim, J.W., Kim, B.W., Choo, H.J., Lee, J.W., Kim, K.B., Lee, C.S., Kim, J.H., Chang, S.Y., Kang, C.Y., Lee, S.W., Ko, Y.G., 2004. Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics* 4, 3536–3548.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506–512.
- Bonneville, M., Fournie, J.J., 2005. Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect.* 7, 503–509.
- Bukowski, J.F., Morita, C.T., Band, H., Brenner, M.B., 1998. Crucial role of TCR gamma chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by gamma delta T cells. *J. Immunol.* 161, 286–293.
- Burrell, H.E., Wlodarski, B., Foster, B.J., Buckley, K.A., Sharpe, G.R., Quayle, J.M., Simpson, A.W., Gallagher, J.A., 2005. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 280, 29667–29676.
- Champagne, E., Martinez, L.O., Collet, X., Barbaras, R., 2006. Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 279–284.
- Chang, S.Y., Park, S.G., Kim, S., Kang, C.-Y., 2002. Interaction of the C-terminal domain of p43 and the alpha subunit of ATP Synthase. Its functional implication in endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 277, 8388–8394.
- Dong, Y., Lieskovska, J., Kedrin, D., Porcelli, S., Mandelboim, O., Bushkin, Y., 2003. Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. *Hum. Immunol.* 64, 802–810.
- Fisch, P., Meuer, E., Pende, D., Rothenfusser, S., Viale, O., Kock, S., Ferrone, S., Fradelizi, D., Klein, G., Moretta, L., Rammensee, H.G., Boon, T., Coulie, P., van der Bruggen, P., 1997. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* 27, 3368–3379.
- Gober, H.J., Kistowska, M., Angman, L., Jeno, P., Mori, L., De Libero, G., 2003. Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* 197, 163–168.
- Green, A.E., Lissina, A., Hutchinson, S.L., Hewitt, R.E., Temple, B., James, D., Boulter, J.M., Price, D.A., Sewell, A.K., 2004. Recognition of nonpeptide antigens by human V gamma 9V delta 2 T cells requires contact with cells of human origin. *Clin. Exp. Immunol.* 136, 472–482.
- Hakem, R., Le Bouteiller, P., Barad, M., Trujillo, M., Mercier, P., Wietzerbin, J., Lemonnier, F.A., 1989. IFN-mediated differential regulation of the expression of HLA-B7 and HLA-A3 class I genes. *J. Immunol.* 142, 297–305.
- Halary, F., Peyrat, M.A., Champagne, E., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Vie, H., Fournie, J.J., Bonneville, M., 1997. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur. J. Immunol.* 27, 2812–2821.
- Hayday, A.C., 2000. [gamma][delta] Cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 975–1026.
- Johnson, D.R., 2003. Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. *J. Immunol.* 170, 1894–1902.
- Kim, B.W., Choo, H.J., Lee, J.W., Kim, J.H., Ko, Y.G., 2004. Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts. *Exp. Mol. Med.* 36, 476–485.
- Lang, F., Peyrat, M.A., Constant, P., Davodeau, F., David-Ameline, J., Poquet, Y., Vie, H., Fournie, J.J., Bonneville, M., 1995. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J. Immunol.* 154, 5986–5994.
- Ljunggren, H.G., Karre, K., 1985. Host resistance directed selectively against H-2 deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162, 1745–1759.
- Martinez, L.O., Jacquet, S., Esteve, J.P., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeand, V., Walker, J.E., Terce, F., Collet, X., Perret, B., Barbaras, R., 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421, 75–79.
- Morita, C.T., Beckman, E.M., Bukowski, J.F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B.R., Golan, D.E., Brenner, M.B., 1995. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* 3, 495–507.
- Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., Wang, H., 2007. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol. Rev.* 215, 59–76.
- Moser, T.L., Stack, M.S., Asplin, I., Englund, J.J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubelak, S., Schnaper, H.W., Pizzo, S.V., 1999. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2811–2816.
- Pennington, D.J., Vermijlen, D., Wise, E.L., Clarke, S.L., Tigelaar, R.E., Hayday, A.C., 2005. The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell-mediated responses. *Adv. Immunol.* 87, 27–59.
- Poccia, F., Cipriani, B., Vendetti, S., Colizzi, V., Poquet, Y., Battistini, L., Lopez-Botet, M., Fournie, J.J., Gougeon, M.L., 1997. CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. *J. Immunol.* 159, 6009–6017.
- Polakova, K., Karpatova, M., Russ, G., 1993. Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells. *Mol. Immunol.* 30, 1223–1230.
- Poupot, M., Fournie, J.J., 2004. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol. Lett.* 95, 129–138.
- Scotet, E., Martinez, L.O., Grant, E., Barbaras, R., Jeno, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillet, S., Esteve, J.P., Lopez, F., Perret, B., Collet, X., Bonneville, M., Champagne, E., 2005. Tumor RECOGNITION following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22, 71–80.
- Shimizu, Y., De Mars, R., 1989. Production of human cells expressing individual transferred HLA-A, -B, -C genes using an HLA-A, -B, -C null human cell line. *J. Immunol.* 142, 3320–3328.
- Stam, N.J., Vroom, T.M., Peters, P.J., Pastoors, E.B., Ploegh, H.L., 1990. HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy. *Int. Immunol.* 2, 113–125.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G., Walker, J.E., 2000. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 672–679.
- Sugawara, S., Abo, T., Kumagai, K., 1987. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J. Immunol. Methods* 100, 83–90.
- Tibensky, D., Delovitch, T.L., 1990. Promoter region of HLA-C genes: regulatory elements common to and different from those of HLA-A and HLA-B genes. *Immunogenetics* 32, 210–213.
- Trichet, V., Benezech, C., Doussset, C., Gesnel, M.C., Bonneville, M., Breathnach, R., 2006. Complex interplay of activating and inhibitory signals received by V{gamma}9V{delta}2 T cells revealed by target cell beta2-microglobulin knockdown. *J. Immunol.* 177, 6129–6136.
- Yang, Y., Chu, W., Geraghty, D.E., Hunt, J.S., 1996. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J. Immunol.* 156, 4224–4231.
- Zocchi, M.R., Poggi, A., 2004. Role of gamma delta T lymphocytes in tumor defense. *Front Biosci.* 9, 2588–2604.

## ANNEXE 2

### Régime hypercholestérolémiant (HCD)

Fournisseur: SAFE (Scientific Animal Food and Engeneering)

Composition:

Caséine	20.7%
Cystine	0.3%
Amidon de maïs	26.7%
Maltodextrine	12.0%
Saccharose	20.0%
Huile de maïs	6.0%
Cholestérol	1.25%
Cellulose	5.0%
Mineral SAFE	7.0%
Vitamine SAFE	1.0%



## ABSTRACT

### REGULATION AND PHYSIOLOGICAL IMPLICATION OF ECTO-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> PATHWAY IN REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT

The protective effect of HDL (High Density Lipoprotein) against atherosclerosis is mainly attributed to its role in Reverse Cholesterol Transport (RCT) by removing cholesterol from peripheral tissues and by delivering cholesterol to the liver for metabolism and bile excretion. In our research team, a new pathway for holo-HDL particle uptake (protein + lipid) has been recently identified in human hepatocytes. This pathway strictly depends on extracellular ADP level and involves different cell surface partners: ADP generated by the cell surface ecto-F<sub>1</sub>-ATPase (which activity is stimulated by apoA-I, the main HDL apolipoprotein) activates the P2Y<sub>13</sub> ADP-receptor and subsequent holo-HDL endocytosis.

In this work, we have shown the presence of an adenylate kinase activity (AK :  $2\text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ) at the cell surface of human hepatocytes that appeared to naturally downregulate the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> mediated HDL endocytosis pathway by consuming the ADP generated by the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase.

Furthermore, we have demonstrated the physiological implication of P2Y<sub>13</sub> in reverse cholesterol transport *in vivo*. Preliminaries results suggest a protective role of P2Y<sub>13</sub> in atherosclerosis development.

Thus, ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> pathway could be an attractive therapeutic target to fight against the development of atherosclerosis.

**Key-words: HDL; reverse cholesterol transport; P2Y<sub>13</sub>; atherosclerosis**

**Aurélie FABRE**

**Directeurs de thèse: Dr. Laurent MARTINEZ, Dr. Xavier COLLET**

UNIVERSITE PAUL SABATIER, LE 28 OCTOBRE 2010

**REGULATION ET IMPLICATION PHYSIOLOGIQUE  
DE LA VOIE ECTO-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>  
DANS LE TRANSPORT RETOUR DU CHOLESTEROL**

Le rôle athéroprotecteur des lipoprotéines de haute densité (HDL) est principalement attribué à leur participation essentielle à la voie de transport retour du cholestérol (RCT) dans laquelle les HDL transportent le cholestérol des tissus périphériques au foie, où il sera éliminé *via* les voies biliaires. Notre équipe a décrit à la surface d'hépatocytes humains une nouvelle voie de captation des holoparticules HDL (protéines + lipides) stimulée par l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> par l'ADP produit suite à la liaison de l'apoA-1 (protéine majoritaire des HDL) sur une ecto-F<sub>1</sub>-ATPase de surface.

Ces travaux mettent en évidence à la surface des hépatocytes humains une activité adénylate kinase qui régule cette voie d'endocytose des HDL. De plus, ces travaux démontrent l'implication physiologique de cette voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> dans le RCT *in vivo* chez la souris.

La voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> pourrait donc constituer une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose.

**Mots clés: HDL; transport retour du cholestérol; P2Y<sub>13</sub>; athérosclérose**

**Discipline:** Physiopathologie Moléculaire, Cellulaire et Intégrée

**Ecole doctorale:** Biologie - Santé - Biotechnologie

**Unité de recherche:**

INSERM U563, CPTP, Département Lipoprotéines et Médiateurs Lipidiques,  
CHU Purpan, Toulouse, France