

DIALA EL HUSSEINI

EFFET DES FIBRATES SUR LA SYNTHÈSE
PÉRIPHÉRIQUE ET LE MÉTABOLISME HÉPATIQUE
DE LA BILIRUBINE, UN ENDOBIOTIQUE AUX
PROPRIÉTÉS ANTI-OXYDANTES ET ATHERO-
PROTECTRICES

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en pharmacie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

La bilirubine, métabolite de l'hème, est un antioxydant puissant exerçant des fonctions athéro-protectrices à des concentrations modérées; cependant elle est neurotoxique à des concentrations élevées. Synthétisée lors du métabolisme de l'hème par l'action successive des enzymes, hème-oxygénase (HO-1) et biliverdine-réductase (BVR), la bilirubine est métabolisée par l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT1A1) dans le foie, afin d'être éliminée sous forme glucurono-conjuguée par le transporteur, Multidrug resistance Related Protein (MRP)2. Dans le cadre de la présente étude, nous avons validé une explication pharmacologique supplémentaire du mode d'action des fibrates, médication actuellement sur le marché dans le traitement de la dyslipidémie (prévenant l'athérosclérose *in vivo*). Les données obtenues démontrent que les fibrates modulent positivement les enzymes de la synthèse et du métabolisme de la bilirubine, favorisant ainsi ses propriétés antioxydantes et athéro-protectrice dans la paroi vasculaire et protègent l'organisme contre ses accumulations toxiques au niveau hépatique. Donc, un mode d'action additionnel des fibrates, pourrait être pris en considération, résultant en une élévation modérée de la concentration locale de la bilirubine et profitant de ses capacités antioxydantes et par la suite athéro-protectrices.

Abstract

Bilirubin is a heme degradation product which has potent anti-oxidative and athero-protective properties at moderated concentrations, but is neurotoxic at elevated concentrations. Synthesized during the heme's metabolism by the successive action of heme oxygenase (HO-1) and biliverdin reductase (BVR) enzymes, bilirubin is glucuronidated by UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) in the liver and eliminated from the body as a conjugated glucuronide by the transporter Multidrug resistance-Related Protein (MRP)-2. In this study, we validated a novel pharmacological effect of fibrates, which are currently used for the treatment of dyslipidemia. The results show that the fibrates can positively modulate the enzymes responsible for bilirubin synthesis and metabolism, favouring its antioxidant and athero-protective properties in vascular wall and protecting from its toxic accumulation in the liver. Thus, an additional mode of action of fibrates, could be considered, resulting in a moderate rise of local bilirubin concentration and taking advantage of bilirubin anti-oxidant capacities and of its athero-protector effects.

Avant-Propos

Ce mémoire comprend cinq grandes parties : le chapitre I constitue l'introduction, le chapitre II présente l'hypothèse et les objectifs étudiés, le chapitre III illustre les résultats par un article scientifique inséré, le chapitre IV constitue une discussion des résultats et met en jeu les perspectives, et enfin, le chapitre V achève ce travail par une conclusion.

L'article scientifique inséré, représentant la section résultats de ce document, s'intitule : « *coordinated regulation of bilirubin synthesis and metabolism by the hypolipidemic fibrates* », il est à noter que la contribution des participants est décrite avec précision avant cette publication (voir la page 73 de ce manuscrit). La section perspectives comporte également des résultats préliminaires, dont j'ai contribué à la grande partie du travail. Les manipulations ont été réalisées par Diala el Hussein (l'auteur de ce document) et par Jenny Keading; l'analyse des résultats a été effectuée par Diala el Hussein. L'interprétation et la description des résultats à été faites par Diala el Hussein sous la supervision d'Olivier Barbier. La préparation des figures a été accomplie par Diala el Hussein et révisée par Olivier Barbier.

En premier lieu, je fais ma part de reconnaissance à **l'université LAVAL** et notamment à la **direction de la faculté de pharmacie** de m'avoir accueilli tout au long de cette période de maîtrise.

C'est avec un grand plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

J'aimerais adresser tous mes remerciements vifs et sincères à mon superviseur de maîtrise, **Dr Olivier Barbier**, qui n'a cessé de me prodiguer ses conseils et ses suggestions pertinentes, ainsi que pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et pour son suivi scientifique tout au long de ma maîtrise. Sa rigueur et son dévouement pour le travail, ainsi que son sens critique m'ont beaucoup appris.

Je remercie plus particulièrement **Papa et Maman** pour leur soutien, leur amour, leur présence dans ma vie même de loin, toutes les pages du monde ne suffiraient pour vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Egalement, je remercie **mon conjoint** d'être à mes côtés et pour ses appuis tout au long de cette année. Merci de me soutenir, de m'encourager, de partager mes moments difficiles. Évidemment je te remercie de m'avoir aidé dans la mise en page de ce mémoire, qui grâce à toi il a pu voir le jour, et de m'avoir tenu la main jusqu'à les dernières lignes. Merci notamment, de m'avoir supporté dernièrement, de subir mon humeur de stress en phase de rédaction, et pourtant quelle présence indispensable! Merci d'être là tous les jours!

Toutefois, j'exprime aussi mes remerciements à des amies inoubliables **Maria et Isabelle**, pour leurs encouragements, leurs accompagnements, sans lesquels j'aurais eu du mal à garder l'équilibre, écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Ce mémoire est un peu le leur. Mes chères amies, je vous souhaite une très bonne continuation dans vos travaux.

Un gros merci à **Jenny Kaeding**, ancienne étudiante au doctorat, pour la supervision de mes travaux particulièrement au début de la maîtrise. Je tiens sincèrement à te remercier Jenny pour tous ce que tu m'avais appris, pour ces heures de travail, pour ta patience, pour tes conseils, répondant toujours à mes attentes, malgré la masse de travail surhumaine que t'avais à ce moment, je comprenais ton humeur, t'étais en pleine rédaction de thèse, d'ailleurs ce que j'ai vécu dernièrement. Bravo, pour ton nouveau boulot ! Très bonne continuation Jenny.

Enfin, j'adresse toute mon amitié et mes remerciements à mes collègues de laboratoire. **Martin**, l'humoriste de l'équipe, merci d'avoir joint l'équipe OB et de ramener cette ambiance agréable avec toi. Merci d'avoir embellir mes moments de pauses en phase de rédaction avec tes histoires de Joke, ça m'adoucissait la tâche! Très bonne continuation cher collègue, et comme tu le disais, en espérant de voir l'acquis simultanée de tes trois diplômes en 2010 marqué sur ton CV!! **Laurent**, bel effort pour cette quantité de travail et cet investissement pour tes affaires. Tu me feras montrer le fruit de ton travail! **Sarah** merci pour tes conseils. **Élise et Sophie**, bienvenue en maîtrise. **Jocelyn**, bonne chance pour ton début de rédaction. Egalement, je remercie tous les autres membres de l'équipe sans oublier les nouveaux que je n'ai pas eu encore la chance de les connaître.

Je tiens à remercier notamment toutes les personnes de l'équipe CG que j'ai pu côtoyées durant cette année. **Judith et Vincent**, merci pour vos encouragements. **Marie-Odile**, merci pour ce « partage moral » de rédaction et de séminaire dernièrement. Évidemment, je

n'oublie pas de remercier la **Dre Chantal Guillemette** de m'avoir fait l'honneur d'être l'une des rapporteurs et rapportrices de mes travaux à plusieurs reprises. J'éprouve un profond respect pour son travail et son parcours, ainsi que pour ses qualités humaines.

J'aimerais finir ces quelques lignes par un remerciement particulier, à **Chantal et Olivier** pour les savoirs faire du regard scientifique critique et avisé, qu'ils nous ont appris, porté sur nos travaux et qui ne peuvent que nous encourager à être encore plus perspicaces et engagés dans nos recherches. Très bonne continuation pour vous deux et pour que vos labo soient toujours en avancement.

*A mon père, A ma mère
à votre accompagnement, à votre soutien*

je dédis ce travail

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Avant-Propos	iii
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Abréviations	xiii
Chapitre I : Introduction	1
1. Athérosclérose	2
1.1. Définition	2
1.2. Découverte et historique	2
1.3. Epidémiologie	3
1.3.1. Maladie à répercussions multiples	3
1.3.2. Mortalité et Prévalence	3
1.3.2.1. Mondial.....	3
1.3.2.2. USA	4
1.3.2.3. Canada	4
1.3.2.4. Québec	4
1.4. Description anatomopathologique de l'athérosclérose	5
1.4.1. Rappel sur l'anatomie et la fonction de l'artère saine	5
1.4.1.1. L'intima	5
1.4.1.2. La media	6
1.4.1.3. L'adventice	7
1.4.2. Naissance et évolution des athéromes	7
1.4.3. Rappel sur les lipoprotéines	9
1.4.4. Infiltration des LDL dans l'intima	10
1.4.5. Rétention et accumulation des LDL dans l'intima	11
1.4.6. Oxydation des LDL	11
1.4.6.1. Les différentes LDL oxydées et leurs propriétés	14
1.4.7. Transformation des monocytes-macrophages en cellules spumeuses	15

1.4.8.	Transformation progressive des stries lipidiques en plaque et balance inflammatoire.....	17
1.4.9.	Formation du centre athéromateux et de la chape fibreuse	17
1.4.10.	Complication de la plaque : rupture ou érosion.....	17
1.4.11.	Thrombose artérielle.....	18
2.	Facteurs de risques.....	20
2.1.	Facteurs de risque non modifiables.....	20
2.1.1.	L'âge.....	20
2.1.2.	Le sexe.....	20
2.1.3.	Les antécédents familiaux de MCV.....	20
2.2.	Facteurs de risque modifiables	21
2.2.1.	Hypertension artérielle.....	21
2.2.2.	Le diabète de types 1 et 2.....	21
2.2.3.	L'obésité	21
2.2.4.	Tabac.....	21
2.2.5.	La sédentarité.....	22
2.2.6.	Surconsommation d'alcool	22
2.2.7.	L'alimentation riche en graisses saturées	22
2.2.8.	Stress et profil psychologique.....	22
2.2.9.	Facteur de risque majeur : Dyslipidémies.....	22
2.2.9.1.	Différents types d'hyperlipidémies.....	23
2.2.9.1.1.	L'hypercholestérolémie pure (type IIb)	25
2.2.9.1.2.	L'hyperlipidémie de type IIb	25
2.2.9.1.3.	L'hyperlipidémie de type III	26
2.3.	Nouveaux facteurs et marqueurs de risque.....	26
2.3.1.	Caractéristiques lipidiques.....	26
2.3.2.	Marqueurs biologiques	26
2.3.2.1.	Lipoprotéine (a) (Lp (a)).....	26
2.3.2.2.	Protéine C réactive.....	27
2.3.2.3.	Homocystéine	27
2.3.2.4.	Épaisseur intima-media.....	27
3.	Effet athéro-protecteur de la bilirubine.....	28
3.1.	Bilirubine : généralités	28
3.1.1.	Structure et définition de la bilirubine	28
3.2.	Synthèse de la bilirubine.....	29
3.2.1.	Hème oxygénase	30
3.2.2.	Biliverdine réductase	32
3.3.	Métabolisme de la bilirubine et niveaux normaux	33
3.3.1.	Métabolisme de la bilirubine sous conditions normales.....	33
3.3.2.	Niveaux normaux.....	34
3.3.3.	Réaction de glucuronidation	35

3.3.3.1.	L'enzyme uridine 5'-diphosphate-glucuronosyl-transférase (UGT)1A1	36
3.3.3.1.1.	Généralités sur les UDP-Glucuronosyltransférase (UGTs)	36
3.3.3.1.2.	La famille UGT1A et l'isoforme UGT1A1	38
3.3.3.2.	MRP-2	39
3.4.	Récapitulatif du métabolisme de la bilirubine	40
3.5.	Pathologies liées à la bilirubine	41
3.5.1.	Hyperbilirubinémies à prédominance non conjuguée	41
3.5.1.1.	L'ictère néonatal	41
3.5.1.2.	Syndrome de Gilbert et athérosclérose	43
3.5.1.3.	Maladie de Crigler-Najjar I et II	44
3.5.2.	Hyperbilirubinémies à prédominance conjuguée	45
3.5.2.1.	Syndrome de Dubin-Johnson	45
3.5.2.2.	Syndrome de Rotor	46
3.6.	Effets protecteurs de la bilirubine	47
3.6.1.	Bilirubine : Antioxydant puissant	47
3.6.1.1.	Biliverdine réductase : antioxydant indirect	48
3.6.1.2.	HO-1 : antioxydant indirect	48
3.6.2.	Bilirubine : protection cardiovasculaire	49
3.6.2.1.	Propriétés athéroprotectrices de HO-1	50
4.	Hypolipémiants : traitement des dyslipidémies	52
4.1.	Statines	52
4.2.	Acide nicotinique ou niacine	53
4.3.	Ézétimibe	53
4.4.	Séquestrants des acides biliaires ou résines	54
4.5.	Fibrates	54
4.5.1.	Définition, Découverte et Structure	54
4.5.2.	Effet pharmacologique des fibrates	56
4.5.3.	Mode d'action des fibrates : Activation de PPAR α	59
4.5.3.1.	PPAR α	60
4.5.3.1.1.	Rappel sur les récepteurs nucléaires	60
4.5.3.1.2.	La famille des PPARs : PPAR α , PPAR γ , PPAR δ	62
4.5.3.1.3.	Ligands des 3 isoformes	63
4.5.3.2.	Peroxisome Proliferation Response Element, PPRE	64
4.5.3.3.	Gènes cibles	65
Chapitre II :	Hypothèse et objectifs du projet	67
Chapitre III :	Résultats	70
Contributions		71
Résumé		72

Coordinated regulation of bilirubin synthesis and metabolism by the hypolipidemic fibrates	73
Abstract.....	74
Abbreviations.....	75
Introduction.....	76
Materials and Methods	79
Results	82
Discussion.....	85
Conclusion	88
Acknowledgements	89
References.....	90
Legends.....	93
Tableau	95
Figures	96
Chapitre IV : DISCUSSION & PERSPECTIVES	101
5. Discussion	102
6. Perspectives	107
Chapitre V : CONCLUSION	114
Bibliographie.....	116

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des lésions de l'athérosclérose (Stary et al., 1995).	8
Tableau 2 : Les classifications des taux du cholestérol et des triglycérides (NCEP, 2001). 23	
Tableau 3 : Classification des hyperlipidémies selon Fredrickson.....	24
Tableau 4 : Comparaison des niveaux de la bilirubine et de l'activité d'UGT1A1 (Bosma, 2003).	46
Tableau 5 : Posologies et propriétés pharmacocinétiques communes des fibrates (Turpin and Bruckert, 1999).	56
Tableau 6 : Activité transactivatrice des agonistes PPAR(s) (Kemp et al., 2002).	64

Liste des figures

Figure 1 : Structure artérielle (Kahle et al., 1990).	6
Figure 2 : Les étapes de formation de la plaque athéroscléreuse (Cohen, 1997).	13
Figure 3 : Oxydation des LDL (James, 1993).	14
Figure 4 : Étapes clés de la formation des stries lipidiques, précurseurs des plaques d'athérome (Toussaint, 2003).	15
Figure 5 : Structure chimique naturelle de la bilirubine non conjuguée IX α 4Z, 15 Z (Fevery, 2008).	29
Figure 6 : Métabolisme de la bilirubine.	32
Figure 7 : Réaction de glucuronidation.	35
Figure 8 : Structure générale des UGTs localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique.	37
Figure 9 : Arbre phylogénique de la superfamille des UGTs humaine.	39
Figure 10 : Synthèse et métabolisme de la bilirubine.	41
Figure 11 : Relation inverse entre le niveau sérique de la bilirubine et l'athérosclérose (Novotny and Vitek, 2003).	51
Figure 12 : Structures chimiques des fibrates (Etgen and Mantlo, 2003).	55
Figure 13 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires.	61
Figure 14 : Homologies entre les trois sous-types de PPARs.	62
Figure 15 : L'activation de PPAR α par un ligand naturel (eicosanoïdes) ou synthétique (fibrates).	65
Figure 16 : Hypothèse générale du projet de recherche.	69
Figure 17 : Mode d'action de LXR α	108
Figure 18 : Les agonistes de LXR α induisent l'expression de HO-1 dans les cellules de la paroi vasculaires.	111
Figure 19 : Les agonistes de LXR α induisent l'expression d'UGT1A1 et légèrement celle de MRP-2 dans les cellules hepG2.	112
Figure 20 : Les agonistes de LXR α induisent l'expression d'UGT1A1 et faiblement celle de MRP-2 dans les hépatocytes humaines en culture primaire.	113

Abréviations

ABC-C1	Adénosine Triphosphate-Binding Cassette 1
ABC-C2	Adénosine Triphosphate-Binding Cassette 2
AHA	American Heart Association
AP	Activator Protein (Protéine Activatrice)
apo	Apolipoprotéine
ATP	Adénosine Triphosphate
AVC	Accidents Vasculaires Cérébraux
BVR	Biliverdine Réductase
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
CML	Cellules Musculaires Lisses
CN	Crigler-Najjar
CO	Monoxyde de Carbone
CSPG	Protéoglycane à Sulfates de Chondroïtines
C-Ter	Domaine Carboxy-Terminal
CVD	Cardiovascular Disease (Maladies Cardiovasculaires)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGM	Endothelial Cell Growth Medium
FBS	Foetal Bovin Serum
FR	Facteur de Risque
GAG	Glycosaminoglycannes
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoprotéine de Densité élevée)
HF	Hypercholestérolémie Familiale
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-Coenzyme A
HO-1	Hème Oxygenase-1
HTA	Hypertension Artérielle
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Cellules Endothéliales de la Veine Ombilicale Humaine)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule
IDL	Intermediate Density Lipoprotein (Lipoprotéine de Densité Intermédiaire)
IL	Interleukin
IM	Infarctus de Myocarde
INF	Interféron
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotéine de Faible Densité)
LDL-ox	LDL oxydés

LP(a)	Lipoprotéine (a)
LPL	Lipoprotéine lipase
LXR α	Liver-X-Receptor (Récepteur nucléaire aux oxystérols)
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MM-LDL	Minimally oxidized LDL (LDL faiblement oxydé)
MRP-2	Multidrug Resistance-related Protein 2
MRP-1	Multidrug Resistance-related Protein 1
N-Ter	Domaine Amino-Terminal
OATP1	Protéines de Transport d'Anions Organiques
Ox-LDL	High Oxydized LDL
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	Protéoglycane
PLTP	Protéine de Transfert des Phospholipides
PPAR	Peroxisome Proliferators-Activated Receptor (Récepteur activé par les proliférateurs de péroxisome)
PPRE	Peroxisome Proliferation Response Element
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species (Espèces réactives de l'oxygène)
RXR	Retinoid-X-Receptor (Récepteur X aux rétinoïdes)
SG	Syndrome de Gilbert
SRA	Scavenger Receptor (Récepteur aux éboueurs)
UDP	Uridine 5'-Diphosphate
TNF	Tumor Necrosis Factor
TG	Triglycérides
UDPGA	Uridine Diphosphate Acide Glucuronique
UGT	UDP-Glucuronosyl-Transférase
UGT1A1	UDP-Glucuronosyl-Transférase 1A1
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Lipoprotéine de très faible densité)

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. Athérosclérose

1.1. Définition

Les maladies cardiovasculaires sont encore à ce jour un problème majeur de santé publique et occupent le premier rang parmi les causes de morbidité et de mortalité prématurée dans le monde industrialisé (Ounpuu et al., 2000). L'athérosclérose en est une composante principale. C'est une maladie silencieuse de la paroi artérielle susceptible d'affecter des sites majeurs des conduits artériels. Elle est initiée par une rétention, une oxydation et une modification lipidique de la paroi, qui provoque une inflammation chronique à l'origine d'une thrombose ou d'une sténose. La définition descriptive de l'OMS, datant de 1958, reste valable bien qu'elle ne corresponde qu'à la description des lésions de fibro-athérome : *«L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires; le tout s'accompagnant de modifications de la media»* (Who, 1958).

1.2. Découverte et historique

L'athérosclérose n'est pas une maladie des temps modernes, elle est dévoilée depuis les époques anciennes; des plaques d'athérome incontestables sur le plan histologique ont été identifiées chez des corps momifiés égyptiens par Sir Marc Amand Ruffer qui a publié ses observations en 1911 (Ruffer, 1911).

Les recherches médicales ont commencé à regarder de plus près l'altération vasculaire au début du 19^{ième} siècle. En 1829, le chirurgien-pathologiste allemand Jean Lobstein introduit le terme d'«athériosclérose» dans le cadre de son traité d'Anatomie Pathologique, considérant que les altérations artérielles ne sont pas d'origine inflammatoire et sont dues à une mauvaise irrigation des vaisseaux (Lobstein, 1833). Au milieu du 19^{ième} siècle, 2 écoles de pathologie se confrontaient et mettaient en jeu des descriptions des changements cellulaires inflammatoires dans les conduits artériels, l'école de Rudolf Virchow à Berlin, en Allemagne et celle de Carl Von Rokitansky à Vienne en Autriche (Rokitansky, 1855). Bien que Von Rokitansky ait considéré ces

changements comme des effets secondaires et comme une sorte de pathologie humorale, Virchow se concentre sur les causes de la maladie et les modifications cellulaires et emploi ainsi, le terme de «*pathologie cellulaire*».

En 1906, Ashoff est le premier à entamer des études concernant le niveau élevé du cholestérol au niveau des plaques athéromateuses (Ashoff, 1906). En 1910, le chimiste allemand Windaus démontre que les plaques d'athérosclérose comprennent des tissus connectifs calcifiés et du cholestérol (Windaus, 1910). Trois ans plus tard, Anitschkow et Chaltow réussissent à développer une situation sévère d'athérosclérose chez le lapin à l'aide d'une alimentation chargée de cholestérol pure (Anitschkow and Chaltow, 1913) permettant l'identification des facteurs de risques classiques responsables de la progression de la maladie. Cependant, les premiers événements patho-génétiques de la maladie sont demeurés peu clairs. C'est finalement Marchand, en 1904, qui invente le terme d'athérosclérose qui reflète la dualité lésionnelle, athéromateuse et scléreuse, de la maladie.

1.3. Epidémiologie

1.3.1. Maladie à répercussions multiples

La traduction clinique de la maladie athéromateuse se manifeste à différents niveaux, et les conséquences sont à l'origine d'affections aiguës (Giral, 1998) : cardiopathies ischémiques (l'athérosclérose des artères coronaires); accidents vasculaires cérébraux (AVC) (athérosclérose des artères au niveau cérébral); artérites (90 % des cas dus à l'athérosclérose des artères des membres inférieurs) et ischémies aiguës des membres (Bouvenot et al., 1995). En outre, ces conséquences, sont à l'origine de nombreuses séquelles fonctionnelles sévères, tels que : les troubles sensitifs et de troubles du langage dans le cas des AVC et l'insuffisance cardiaque, et des troubles du rythme dans le cas d'infarctus du myocarde (IM).

1.3.2. Mortalité et Prévalence

1.3.2.1. Mondial

Les maladies cardiovasculaires occupent une place prépondérante en terme d'hospitalisation dans les pays industrialisés. Dans le monde, 17 millions de décès sont annuellement attribuables aux maladies cardiovasculaires (MCV), soit le tiers de tous les décès (OMS, 2004). Les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux sont parmi les premières causes de mortalité dans le monde (respectivement 7,4 et 5,1 millions de décès en 1998 selon le rapport sur la santé dans le monde (OMS) de 1999). Ces deux causes représentent à elles seules plus de 20% des décès. L'OMS affirme même que le fardeau des cardiopathies ischémiques devrait continuer à s'alourdir d'ici les 20 prochaines années (Murray et al., 1996).

1.3.2.2. USA

Aux États-Unis, environ 64 millions d'Américains (presque un quart de la population) présente une certaine forme de MCV et chaque année, plus de 930 000 décès (soit 40 % de tous les décès) sont recensés suite à un infarctus de myocarde ou à un accident vasculaire cérébral etc. (CDC, 2004).

1.3.2.3. Canada

A l'échelle canadienne, un bilan semblable s'impose, les maladies cardiovasculaires sont responsables d'un plus grand nombre de décès que toute autre maladie. En 1999, 78 942 personnes en ont été victimes, soit un peu plus d'un décès sur trois chez les Canadiens (Fdmcd, 2003). Chez les hommes et chez les femmes, 35 % et 37 %, respectivement, de tous les décès survenus en 1999 ont été attribuables aux maladies du cœur. Toujours avec le plus fort pourcentage de décès associé à l'infarctus du myocarde, aux cardiopathies ischémiques et aux accidents vasculaires cérébraux, soit 27 % des décès. La maladie de l'appareil circulatoire est la principale cause d'hospitalisation (excluant l'accouchement) et demeure la catégorie de maladie la plus coûteuse (18,5 milliards de dollars par année) (SantéCanada, 2002).

1.3.2.4. Québec

En termes de prévalence de MCV, Statistique Canada en 2003 révèle que cette dernière affecte 6,4% de la population québécoise âgée de plus de 25 ans et même atteint 19,4% des 65 ans et plus. En termes de mortalité, 29,1% des décès sont dus au MCV au Québec

en 2003, avec le plus grand pourcentage attribué aux cardiopathies ischémiques (16,5 % des tous les décès). Cependant, une étude réalisée sur le plan international, portant sur 19 pays de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) dévoile que le Québec se classe parmi les pays affichant les plus faibles taux de mortalité par maladies de l'appareil circulatoire, tant chez les hommes que chez les femmes (Choinière, 2003).

En revanche, au cours des 30 dernières années, une baisse de la mortalité de 56 % pour l'ensemble des MCV a été constatée et plus spécifiquement une baisse de 62 % pour les cardiopathies ischémiques et les maladies vasculaires cérébrales et une réduction de 70 % pour l'infarctus du myocarde (Fdmdcd, 2003). De plus, certains auteurs (Murray and Lopez, 1997) ont réalisé des projections jusqu'en 2020 : les cardiopathies ischémiques et les AVC devraient conserver les deux premières places de cause de mortalité dans le monde et même leur prévalence devrait croître dans les prochaines années.

1.4. Description anatomopathologique de l'athérosclérose

1.4.1. Rappel sur l'anatomie et la fonction de l'artère saine

L'athérosclérose est une pathologie qui touche l'intima des artères de gros et moyens calibres (l'aorte, le système carotidien, les artères coronaires, etc.) de structures différentes, élastiques et musculaires, mais toutes caractérisées par une structure commune d'organisation. La paroi artérielle est formée de trois tuniques successives, l'intima, la média et l'adventice, délimitées entre elles par des limitantes élastiques internes et externes (Figure 1).

1.4.1.1. L'intima

C'est la tunique la plus interne et la plus fine de la paroi, c'est à ce niveau que se développe l'athérosclérose. Elle comprend l'endothélium et l'espace sous-endothélial. L'endothélium est constitué d'une fine couche continue de cellules endothéliales aplaties, jointives (grâce à des jonctions serrées et des jonctions communicantes) qui est

en contact direct avec le sang. Cet endothélium sécrète de nombreuses substances : vasoconstrictrices (endothéline, angiotensine, etc.), vasodilatatrices (prostacycline, bradykinine, etc.), antiagrégants (prostacycline) et fibrinolytiques (activateur du plasminogène), ainsi que des facteurs de croissance. L'espace sous endothéliale est épais et composé principalement de matrice extracellulaire (collagènes, fibres élastiques, microfibrilles qui produisent des protéoglycanes (PG), des glycosaminoglycanes (GAG), des héparane-sulfates, du glycogène, etc.) et son épaisseur croît avec l'âge du fait d'une accumulation de matrice extracellulaire et de prolifération de cellules musculaires lisses (CML).

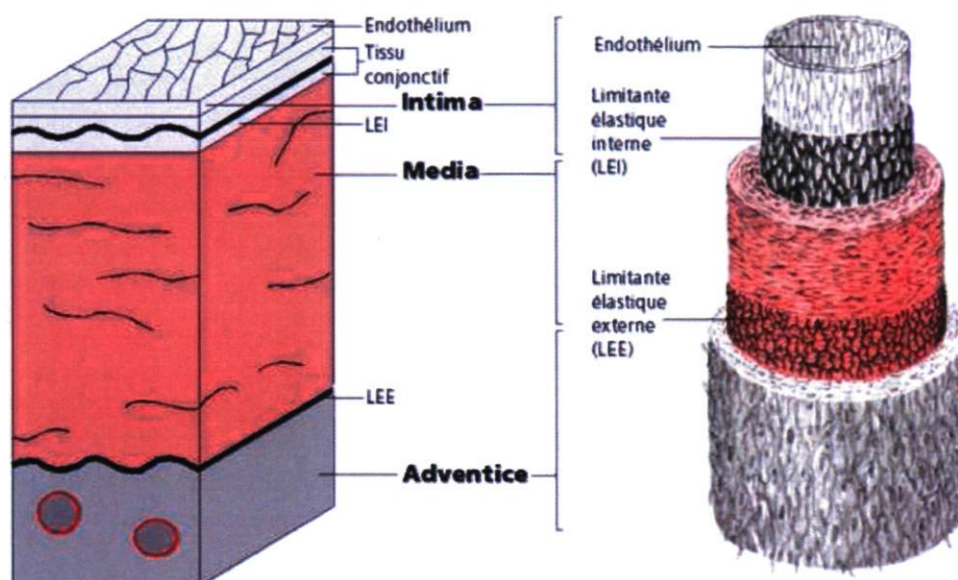


Figure 1 : Structure artérielle (Kahle et al., 1990).

LEE : Limitante élastique externe; LEI : Limitante élastique interne.

1.4.1.2. La media

C'est la tunique moyenne, elle est séparée de l'intima par la limitante élastique interne. C'est la partie la plus épaisse de la paroi artérielle. Elle est constituée principalement de CML, ordonnées, empilées en couches appelées unités lamellaires (décrite par (Wolinsky and Glagov, 1967)), de fibres élastiques (élastine) et de collagène. L'organisation de ces éléments et l'architecture pariétale diffèrent selon qu'il s'agit d'artères élastiques dites de conduction (artères de gros calibre riches en fibres élastiques dont la média est épaisse, telles que l'aorte et l'artère pulmonaire) ou

d'artères musculaires dites aussi distributrices (artères de moyen calibre riches en cellules musculaires). Ces artères musculaires, sont sièges de la vasomotricité : sont capables de se dilater (vasodilatation) ou de se contracter (vasoconstriction) afin d'ajuster le débit sanguin et distribuer le sang aux différentes parties du corps.

1.4.1.3. L'adventice

C'est la tunique la plus externe, séparée de la media par la limitante élastique externe. Elle est composée de tissus conjonctifs (riche en collagène et en fibres élastiques), de fibroblastes, et de rares myocytes. Elle est irriguée par des *vasa vasorum* assurant un rôle nourricier vers les couches les plus externes de la média. Elle permet l'ancrage des artères aux structures avoisinantes.

1.4.2. Naissance et évolution des athéromes

Bien que de nombreuses notions restent inconnues, plusieurs études expérimentales, essais thérapeutiques, études de cas témoins, etc. ont décrit les mécanismes conduisant à la formation de la plaque d'athérome. En effet, les plaques se développent préférentiellement aux endroits soumis à un stress mécanique important comme les ostiums, les branches de bifurcation, les embranchements ou les courbures.

La description moderne de l'athérosclérose fait intervenir trois stades évolutifs successifs : la strie lipidique, la lésion fibro-lipidique et la plaque compliquée. Sous l'égide de la société américaine de cardiologie, l'AHA (American Heart Association), en 1994, dans le cadre du « Committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis », une classification plus détaillée des lésions artérielles d'athérosclérose en 6 stades de grade croissant a été suggérée (Stary et al., 1994; Stary et al., 1995). Cette classification tient compte du caractère évolutif des lésions athéroscléroseuses mis en évidence par des études anatomopathologiques et épidémiologiques. La plaque d'athérosclérose apparaît comme une lente métamorphose de l'intima artérielle associée à des lésions qui évoluent avec l'âge (Tableau 1). Les lésions précoces (type I, II et III) sont des lésions cliniquement silencieuses.

À partir des données présentées dans le tableau 1, plusieurs mécanismes s'associent pour aboutir à la formation de la plaque : la pénétration des lipoprotéines dans l'intima, le

recrutement des monocytes et leur transformation en macrophages puis en cellules spumeuses, la réaction inflammatoire et enfin la formation de la chape fibreuse (Figure 2).

Tableau 1 : Classification des lésions de l'athérosclérose (Stary et al., 1995).

<i>Type de lésions</i>	<i>Description</i>
Lésion I : Cellules spumeuses isolées	L'épaississement fibro-musculaire de l'intima, commence dès la vie fœtale, se charge durant l'enfance et l'adolescence de cellules spumeuses d'origine macrophagique. L'accumulation de ces cellules dans l'intima induit l'adhésion de monocytes à l'endothélium et favorise l'évolution vers le stade II.
Lésion II : Stries lipidiques	Les lésions de type II se caractérisent par une accumulation, dans la couche sous-endothéliale de l'intima, des macrophages spumeux, des CML remplis de lipides et des lymphocytes T. Les cellules chargées de lipides induisent une réaction inflammatoire et finissent par devenir des stries lipidiques. Deux types de lésions de type II sont identifiés. Les lésions de type IIa, les plus rares, caractérisées par la présence de plusieurs couches superposées de CML et vont donner naissance aux lésions de type III. Les lésions de type IIb contiennent peu de CML, qui ne progressent pas ou progressent seulement chez des sujets avec une concentration plasmatique très élevée de lipoprotéines athérogènes (Berenson et al., 1998).
Lésion III : Pré-athéromateuse	Les lésions III apparaissent entre 10 et 20 ans chez l'homme, histologiquement, elles sont caractérisées par des gouttelettes lipidiques extracellulaires accumulées sur l'épaississement déjà décrit, formant des agrégats, visibles au microscope.
Lésion IV : Athéromateuse	Ces lésions sont présentes chez l'homme de 20 à 30 ans, sont caractérisées par une augmentation des pools de vésicules lipidiques extracellulaires qui deviennent confluentes et fusionnent pour former le core lipidique (centre athéromateux). Des dépôts de calcium apparaissent et des capillaires bordent le noyau.
Lésion V : Plaque fibro- Athéromateuse	C'est la lésion typique d'athérosclérose, elle apparaît après 40 ans. Elle est caractérisée par la production de tissu fibreux dans l'intima, riche en collagène et en CML. Ce tissu fibreux borde le centre nécrotique et forme la chape fibreuse. Cette lésion peut être de type Va : plusieurs centres lipidiques recouverts par une épaisse chape fibreuse; ou de type Vb : la chape recouverte par des calcifications; ou de type Vc : la lésion est essentiellement fibreuse et constituée de CML et de matrice extracellulaire. Le centre nécrotique et les cellules inflammatoires disparaissent de ce type de lésion.

<i>Type de lésions</i>	<i>Description</i>
Lésion VI : Plaque athéroscléreuse compliquée	La survenue de la plaque compliquée est responsable de la majorité des événements aigus. Elle survient généralement après 40 ans. On distingue les lésions de type VIa, caractérisées par la rupture de la chape fibreuse. Les lésions de type VIb se caractérisent par l'apparition d'une hémorragie intraplaque sous l'effet de contraintes hémodynamiques. Enfin, les lésions de type VIc se caractérisent par l'apparition d'une thrombose, qui peut être occlusive dans les artères de moyen calibre et contribue à un rétrécissement de la lumière artérielle (et à l'évolution de la plaque) dans les artères de gros calibre.
Lésion VII : Autres types de complications	La survenue d'un thrombus à la surface d'une plaque compliquée est parfois accompagnée d'une embolie périphérique (embolie de cholestérol). L'anévrisme est un autre type de complication, défini par un élargissement du calibre artériel associé à un amincissement de la paroi (quasi-disparition de la média) (Bonser et al., 2000; Xu et al., 2001).

1.4.3. Rappel sur les lipoprotéines

Les lipoprotéines plasmatiques sont des sphérules composées d'un noyau apolaire (hydrophobe, de triglycérides et de cholestérol estérifié) et d'une enveloppe polaire (de phospholipides, de cholestérol libre) et d'une partie protéique, l'apolipoprotéine (apo). Ces dernières interviennent dans différentes étapes du métabolisme des lipoprotéines telles que la synthèse, la sécrétion, la maturation, les transformations plasmatiques et le catabolisme. Elles jouent aussi le rôle d'un ligand permettant aux lipoprotéines de se fixer sur les récepteurs cellulaires en vue de leur internalisation. Selon leurs propriétés physico-chimiques, les lipoprotéines sont classées par ordre croissant de densité :

- Les chylomicrons, synthétisés par les cellules intestinales, servent à véhiculer les triglycérides (TG) provenant des lipides alimentaires des intestins aux tissus périphériques (Larifla, 2002).
- Les lipoprotéines de très basse densité ou VLDL (Very Low Density Lipoprotein Cholesterol) sont principalement synthétisées par les hépatocytes, sont responsables du transport lipidique du foie vers les tissus périphériques (Pownall and Gotto, 1999). Les VLDL sont riches en TG et pauvres en cholestérol.

- Les lipoprotéines de densité intermédiaire ou IDL (Intermediate Density Lipoprotein) ou remnants de VLDL, sont issues de l'hydrolyse des VLDL par les lipases, leur densité est comprise entre celle des VLDL et des LDL. Les IDL sont athérogènes, mais elles sont présentes en très faible quantité dans les conditions normales.
- Les lipoprotéines de basse densité ou LDL (Low Density Lipoprotein Cholesterol) sont synthétisés par le foie, soit directement, soit par l'intermédiaire des IDL (les LDL sont le produit final du catabolisme des VLDL). Elles sont riches en cholestérol et de l'apo B₁₀₀ et assurent la distribution du cholestérol aux tissus périphériques. Les LDL constituent des particules athérogènes et sont internalisées à l'aide des récepteurs aux LDL (B et E)
- Les lipoprotéines de haute densité ou HDL (High Density Lipoprotein Cholesterol) sont formées dans le foie et excrétées par exocytose dans la circulation sanguine. Elles sont riches en cholestérol et en apo (A et E) et pauvres en TG. Les HDL captent le cholestérol au niveau des cellules périphériques et permettent son retour au niveau du foie, elles assurent ainsi l'épuration du cholestérol sanguin, d'où leurs propriétés anti-athérogènes (Larifla, 2002).

1.4.4. Infiltration des LDL dans l'intima

Dès les premières années de la vie, la concentration des LDL natives pourrait s'élever, ils quittent, en conséquence, la lumière artérielle en franchissant les cellules endothéliales et pénètrent dans l'intima. Cette traversée de l'endothélium vasculaire par les LDL initie le processus d'athérogénèse. Les facteurs exacts qui favorisent ce passage sont mal connus. Cependant, il existe une relation nette entre la concentration du cholestérol sanguin et le développement de cette infiltration lipidique (Williams and Tabas, 1995). De nombreuses études récentes ont démontré la présence d'une dysfonction endothéliale chez des enfants asymptomatiques et des adultes jeunes, qui favorisent cette infiltration lipidique (Bonetti et al., 2003). Elle se caractérise par une diminution de la biodisponibilité des vasodilatateurs, en particulier du monoxyde d'azote et par une augmentation des facteurs de constriction, tels que l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Ross, 1993). Ces substances et ces mécanismes sont susceptibles d'augmenter la perméabilité de l'endothélium aux LDL natives.

C'est au cours de cette étape que le profil sanguin des LDL a le plus d'impact. La pénétration des LDL dans le sous-endothélium est en effet, inversement proportionnel à leur taille, ce qui fait jouer aux LDL petites et denses, un rôle prépondérant (Dejager and Turpin, 1998). En outre, de multiples études épidémio-cliniques ont mis en évidence une corrélation positive : ce profil de prépondérance de petites LDL denses est significativement associé à un risque accru de développer une maladie cardiovasculaire (Austin et al., 1988; Krauss, 1991).

1.4.5. Rétention et accumulation des LDL dans l'intima

La matrice intimale normale contient des héparanes de sulfates produits par les cellules endothéliales et les CML de la media (Praillet et al., 1998a). Ces PG sont des molécules constituées d'une protéine appelée «*core protein* » sur laquelle sont attachées des GAG. On peut identifier les PG en fonction du type de GAG qu'ils portent : PG à sulfates de chondroïtines (CSPG) et PG à sulfates de chondroïtines (CSPG).

Au sein du processus d'athérosclérose (Praillet et al., 1998b), s'effectue une modification de la synthèse des PG par les CML ainsi que par les cellules endothéliales. On note :

- Une **diminution** de la synthèse des **HSPG** qui sont des inhibiteurs de la prolifération des CML (Galis et al., 1993), contribuerait à la prolifération de ces deniers au cours de l'athérogénèse.
- Une **augmentation** de la synthèse des **CSPG** qui ont plus d'affinité aux LDL (Praillet et al., 1998b), ceci contribue donc à amplifier encore plus cette affinité.

Ces modifications sécrétoires sont liées à la sécrétion, par les plaquettes, de PDGF (Platelet Derived Growth Factor) qui est chimiotactique et mitogène pour les CML. Suite à tous ces mécanismes, les LDL s'accumulent tant que le flux d'entrée dans l'intima est supérieur au flux de sortie à travers la média (Nordestgaard and Nielsen, 1994).

1.4.6. Oxydation des LDL

L'oxydation des LDL est une étape déterminante pour la poursuite du processus d'athérogénèse. Elle se procède en quatre étapes, dont les 2 premières font partie de la

phase (I), phase d'oxydation légère et la troisième et la quatrième étape appartiennent à la phase (II), la phase d'oxydation avancée (Figure 3) (James, 1993) :

- 1) **Phase d'initiation** : les radicaux libres s'attaquent aux lipides, surtout aux acides gras polyinsaturés qui sont particulièrement vulnérables du fait de leurs doubles liaisons. Ceci entraîne des modifications lipidiques se matérialisant par une perte en acide gras polyinsaturés et en anti-oxydants (vitamine E, ubiquinol, ...) (Esterbauer et al., 1990). Cette étape est déclenchée par certaines cellules de la paroi artérielle (cellules endothéliales, CML, monocytes-macrophages).
- 2) Dans une seconde étape, il y a **propagation de ces modifications chimiques aux autres lipides**. Cette propagation s'effectue dans un ordre aléatoire.
- 3) Ceci entraîne dans une troisième étape, la **dégradation et la libération de fragments lipidiques**, tel que les peroxydes lipidiques dont l'accumulation est cytotoxique et particulièrement les aldéhydes (comme le malondialdéhyde), qui sont des produits de dégradation de ces lipides.
- 4) Les **aldéhydes formés, se lient à la partie protéinique des LDL (l'apo-B₁₀₀)**, modifiant dans un premier temps son activité physiologique (modification covalente et augmentation de sa charge négative) puis sa dégradation (Haberland et al., 1990).

À l'état normal, les LDL sont éliminées par l'intermédiaire des récepteurs B/E aux LDL auxquels elles se lient à l'aide d'un site de liaison situé au niveau de l'apo B. Il s'agit d'un processus anti-athérogène parce qu'il diminue la synthèse intracellulaire de cholestérol; limite l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules, protégeant ainsi les cellules d'une absorption excessive de cholestérol et favorisant l'élimination du cholestérol hépatique par les voies biliaires (James, 1993).

Quand elles sont oxydées, les LDL sont reconnues par d'autres types de récepteurs, les récepteurs « *éboueurs* » (ou scavenger receptors) des macrophages (Dejager et al., 1993). Ces récepteurs « *scavenger* » entraînent les LDL dans un processus athérogène, surtout si cette voie est non rétro-réglée : la synthèse intracellulaire du cholestérol est non diminuée. Ce processus engendre une absorption excessive de cholestérol dans les macrophages, d'où la formation de cellules spumeuses (ou *foam cells*) (Dejager et al., 1993).

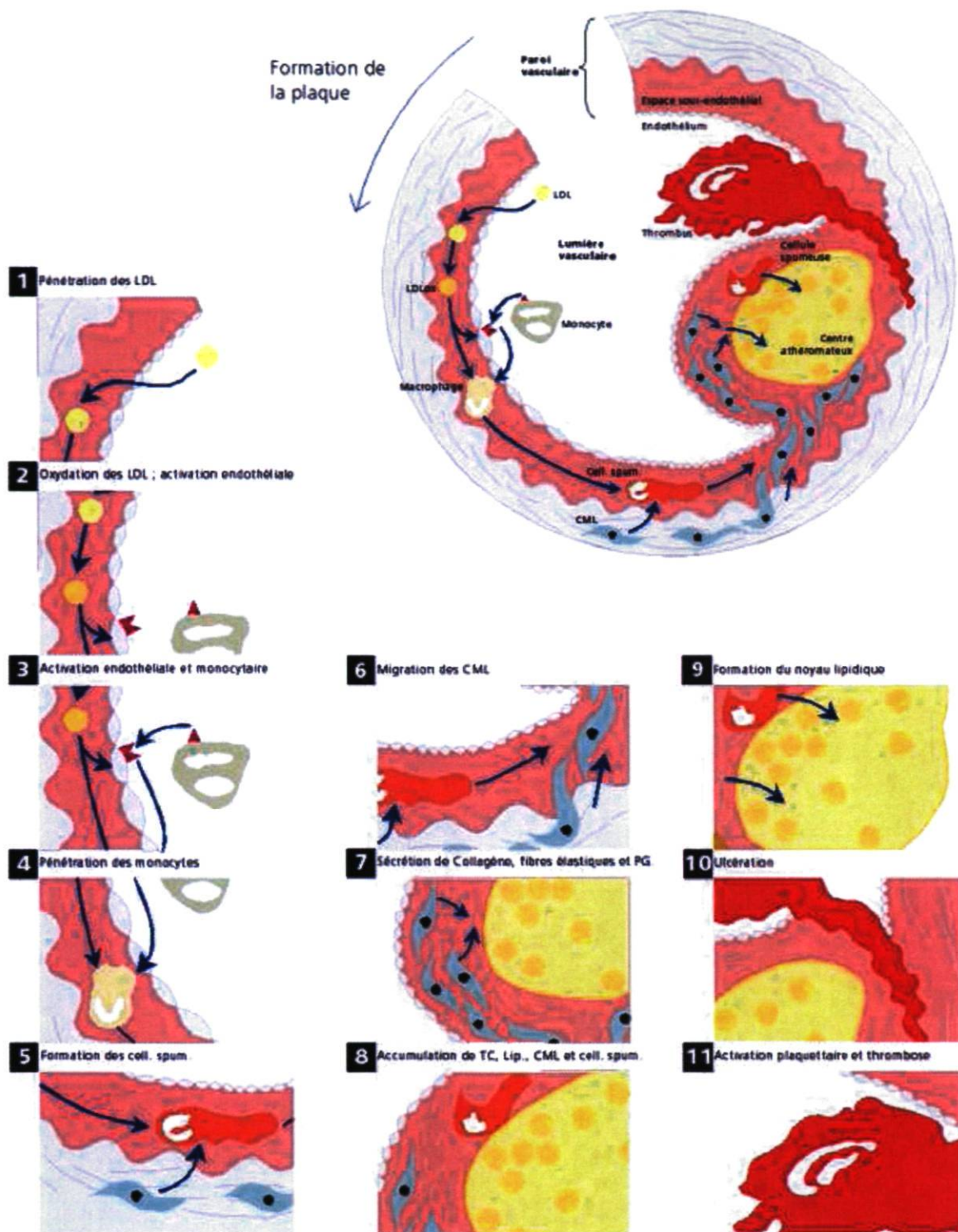


Figure 2 : Les étapes de formation de la plaque athéroscléreuse (Cohen, 1997).

Les mécanismes responsables de la formation des plaques d'athérosclérose se divisent en différentes étapes : (1) Pénétration des LDL dans l'intima; (2) où ils subissent une oxydation; (3) les monocytes circulants s'adhèrent à l'endothélium et pénètrent dans l'intima où ils s'évoquent en macrophages; (4) il y aura formation de cellules spumeuses

à partir des macrophages et des CML; (5 et 6) les CML prolifèrent, migrent de la média vers l'intima et sécrètent du collagène, des fibres élastiques ainsi que des protéoglycanes; (7 et 8) l'accumulation de tissu conjonctif, de lipides, de CML et de cellules spumeuses amènent à la formation de la plaque athéromateuse; (9 et 10) après rupture de la plaque, l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire entraînent la formation d'un thrombus. (CS : cellules spumeuses; CML : cellules musculaires lisses; LDL : Low Density Lipoprotein; LDL-ox : LDL oxydées; Lip. : lipides; PG : protéoglycane; TC : tissu conjonctif).

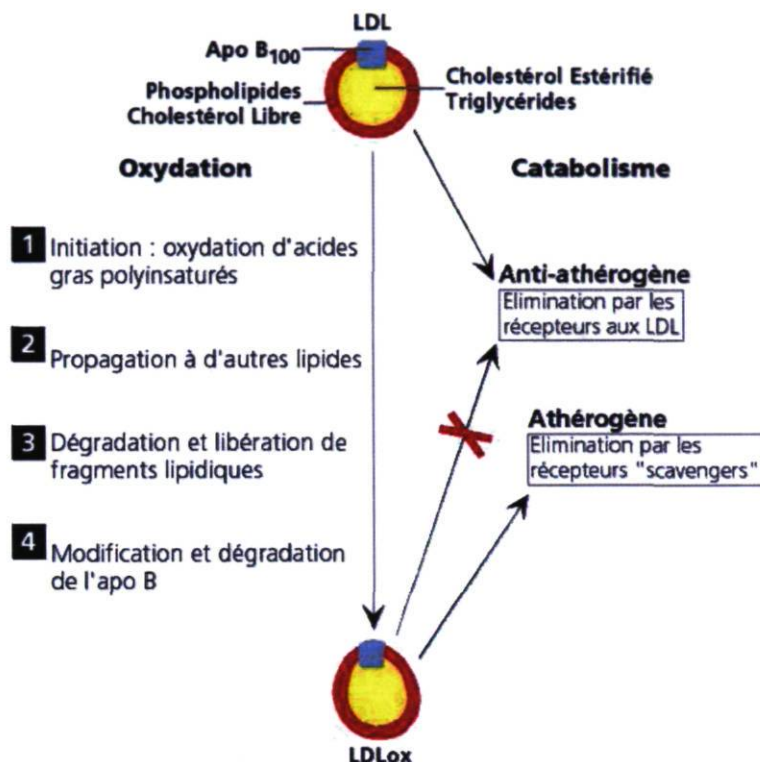


Figure 3 : Oxydation des LDL (James, 1993).

1.4.6.1. Les différentes LDL oxydées et leurs propriétés

Les processus d'oxydation des LDL sont des phénomènes très complexes (Steinberg, 1997). De nombreuses variétés de LDL oxydées (LDL-ox) ont été identifiées. En plus de leur diversité structurale, les LDL-ox sont caractérisées par des différences fonctionnelles (Berliner et al., 1995). On distingue :

- 1) *Les MM-LDL (Minimally oxidized LDL ou LDL faiblement oxydifiées)*, produites lors de la phase d'oxydation légère, entraînent la sécrétion de plusieurs facteurs pro-inflammatoires, par les cellules endothéliales, telles que : les protéines activatrices M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et MCP-1 (Monocyte Chemotactic

Protein-1) qui facilitent l'entrée des monocytes dans l'intima (Liao et al., 1991) et favorisent leur évolution en macrophages (Berliner et al., 1995).

- 2) *Les Ox-LDL (highly Oxidized LDL)*, produites lors de la phase d'oxydation avancée, sont cytotoxiques et favorisent la formation de cellules spumeuses.

1.4.7. Transformation des monocytes-macrophages en cellules spumeuses

Les MM-LDL ainsi formées stimulent la sécrétion par les cellules endothéliales de protéines activatrices, MCP-1 et MCSF. Ces protéines favorisent, successivement, l'adhésion des monocytes circulants aux cellules endothéliales, leur migration à travers la paroi, leur différenciation en macrophages (au contact de la matrice extracellulaire) ainsi que leur séquestration au niveau intimal (Figure 4).

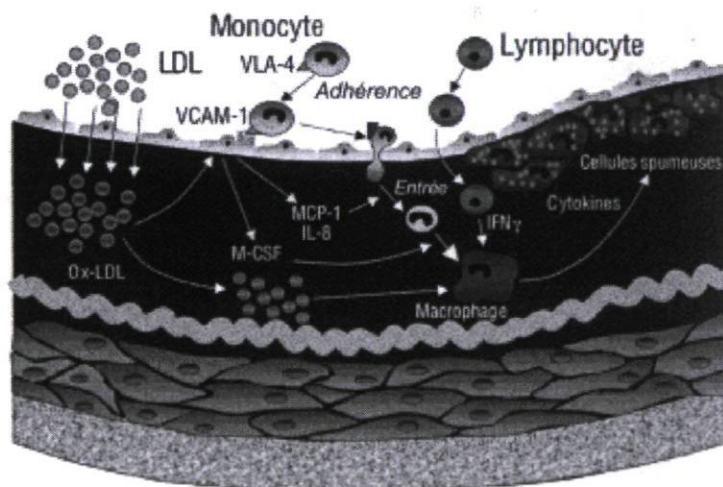


Figure 4 : Étapes clés de la formation des stries lipidiques, précurseurs des plaques d'athérome (Toussaint, 2003).

L'augmentation de la perméabilité endothéliale favorise l'infiltration et l'accumulation des LDL dans l'intima artérielle, où elles subissent des lésions oxydatives. Plusieurs types de LDL-ox pro-inflammatoires sont ainsi formés. Parallèlement, les cellules endothéliales activées sécrètent des protéines d'adhésion (M-CSF et MCP-1) qui favorisent le recrutement des monocytes dans l'intima et leur transformation en macrophages. Ces macrophages expriment des récepteurs *scavengers* qui reconnaissent les LDL-ox favorisant une accumulation intracellulaire de cholestérol et la formation de cellules spumeuses. Ces dernières produisent des facteurs pro-inflammatoires et pro-thrombogènes qui favorisent la progression de la plaque.

L'adhérence des monocytes à l'endothélium implique la liaison de molécules exprimées à la surface endothéliale, les molécules d'adhérence VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), à des ligands de la famille des intégrines (intégrine CD-18) ainsi que de la famille des sélectines (E et P), présents sur la membrane des leucocytes. Les molécules d'adhérence sont peu ou pas exprimées à la surface d'un endothélium normal, mais leur expression peut être induite par les LDL-ox (Berliner et al., 1995) ou par des molécules pro-inflammatoires comme les cytokines (TNF α , IL1, INF- γ et des CSFs) ou la lipoprotéine (a) (Lpa) (Figure 4). En effet, ces multiples cytokines sont sécrétées par les macrophages également en réponse à une stimulation exercée par les LDL-ox. Les cytokines favorisent la pénétration d'autres monocytes et la pérennisation de l'inflammation, ainsi que l'activation endothéliale. (Witztum and Steinberg, 1991).

Une fois dans la paroi, le rôle théorique des macrophages est le rassemblement et l'élimination des corps anormaux, or la sortie de ces macrophages est fortement inhibée par les LDL-ox qui sont donc capables de les garder en séquestration *in situ*. Ainsi, il y a une accumulation, à l'intérieur de la paroi artérielle, d'une quantité importante de macrophages remplis de lipides et capables d'oxyder d'autres LDL pénétrant dans l'intima. Cette accumulation de macrophage est à l'origine d'une oxydation plus importante des LDL, donnant naissance à la forme oxydée avancée (highly Oxidized LDL) qui n'est plus reconnue par les récepteurs B/E mais par les récepteurs scavengers (SR-A, CD36, CD68) des macrophages (à l'aide d'un mécanisme d'endocytose) et puis internalisée. Les récepteurs scavengers, à l'inverse des récepteurs classiques des LDL normales, ne sont pas régulés négativement par le contenu intracellulaire en cholestérol (de Winther et al., 2000). Comme cette voie métabolique n'est pas rétrocontrôlée, les macrophages deviennent excessivement remplis en lipides et surchargés d'esters de cholestérol et se transforment ainsi en cellules spumeuses. C'est le premier stade de la formation de la plaque d'athérome (Suzuki et al., 1997).

1.4.8. Transformation progressive des stries lipidiques en plaque et balance inflammatoire

Les cellules spumeuses, lorsque leur nombre s'élève, se rassemblent dans des stries lipidiques (protrusion de couleur jaune) avec des monocytes, des macrophages, des lymphocytes T, des cytokines, dans un état d'inflammation chronique. C'est le point de départ d'une lésion athéroscléreuse. En outre, les macrophages s'y multiplient et entretiennent cette inflammation chronique, à laquelle participent des cytokines pro-inflammatoires : TNF α (tumor necrosis factor), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ . Ces cytokines concourent à la formation et à la progression de la plaque, par une modulation de la prolifération fibreuse, par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes; elles stimulent (Opal and DePalo, 2000) :

- Une production de collagènes I et III, de fibres élastiques et PG, par les CML. Ces CML sont fortement stimulées par l'IL-1 et le TNF α .
- Une production par les CML, de métalloprotéinases (MMP) (Matrix Metalloproteinases) capables de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire.

1.4.9. Formation du centre athéromateux et de la chape fibreuse

Les lipides de la plaque sont d'abord essentiellement intracellulaires puis extracellulaires. A ce stade, ils se regroupent pour former un amas appelé cœur lipidique ou centre athéromateux. La plaque d'athérosclérose adulte se caractérise par la formation d'une chape fibro-musculaire qui isole le centre lipidique de la lumière artérielle. La chape fibreuse, de type cicatriciel, est composée de CML et de protéines de matrice extracellulaire (collagène, élastine, PG). Parallèlement, les CML migrent de la média vers l'intima, elles s'accumulent de façon progressive et encapsulent graduellement le centre athéromateux (O'Brien et al., 1993).

1.4.10. Complication de la plaque : rupture ou érosion

L'athérosclérose devient vraiment une maladie au stade des lésions compliquées. L'évolution de la plaque d'athérosclérose se déroule sur de nombreuses années, elle

atteint un stade où son expression clinique est révélée par des manifestations ischémiques chroniques fréquentes. Dans ce cas, la plaque est responsable d'une sténose rétrécissant la lumière artérielle de plus de 50 % en diamètre. Dans d'autres situations, elle s'évolue vers la formation d'anévrisme, engendrée suite à une destruction des éléments structuraux de la matrice extracellulaire. La gravité de l'athérosclérose tient essentiellement au risque permanent d'accident aigu qui fait intervenir un processus thrombotique (la formation d'un caillot de sang au sein d'une veine ou d'une artère, bloquant la circulation sanguine). À titre d'exemple, au niveau coronaire, la thrombose est à l'origine des incidents d'angor instable et des infarctus. Le déclencheur de ces accidents est toujours un phénomène mécanique : rupture ou érosion de la plaque. Les plaques les plus sensibles à la rupture sont les peu serrées, molles, riches en lipides, de coloration jaunâtre et ont un centre lipidique important avec une chape fibreuse fine, au contraire des plaques moins vulnérables qui sont plus stables, sont les plus serrées, grises, dures et ont un centre lipidique de petite taille isolé avec une chape fibreuse épaisse et solide. L'érosion de la plaque sans rupture de la chape fibreuse peut être aussi un mécanisme déterminant dans la survenue d'une thrombose artérielle (Virmani et al., 2000). L'érosion est responsable des 40% des cas de thrombose et plus de 40% des morts subites. Quant à la rupture de la plaque, c'est l'évènement le mieux caractérisé pouvant conduire aux accidents thrombotiques aigus. Cette rupture est liée à trois mécanismes : l'évolution en taille et en volume du centre athéromateux (Davies et al., 1993); l'inflammation et la dégradation matricielle de la chape fibreuse (Falk, 1999) et le défaut de réparation de la chape par les CML (Kockx and Herman, 2000). En effet, le centre athéromateux est une zone avasculaire, pauvre en cellules, riche en lipides, dépourvue de support collagénique. Il joue un rôle à la fois dans l'induction de la rupture de plaque à partir de l'évolution de sa taille ainsi que dans l'initiation de la thrombose par sa forte rétention de facteurs prothrombogènes (comme le facteur tissulaire).

1.4.11. Thrombose artérielle

Les plaques ont d'importantes potentialités thrombogéniques. La coexistence de lipides extracellulaires, de cellules spumeuses et de cellules inflammatoires est un facteur essentiel de thrombogénicité. La rupture ou l'érosion de plaque est le point de départ

d'un processus thrombogénique qui repose théoriquement sur plusieurs étapes : l'adhésion et l'activation plaquettaire suivie de l'agrégation plaquettaire.

Les plaquettes, cellules circulantes, anucléées présentent à leur surface plusieurs types de récepteurs (intégrines, thrombine, etc...) activés par des ligands glycoprotéiniques. L'activation coordonnée de plusieurs couples récepteurs-ligands glycoprotéiniques est indispensable à l'adhésion de plaquettes au sous-endothélium. Cette adhésion s'accompagne d'une activation qui induit un changement de conformation plaquettaire. Dans la suite, se forment des ponts moléculaires fixant les plaquettes circulantes aux plaquettes déjà déposées et c'est par ce mécanisme que se construit (« brique par brique »), le thrombus plaquettaire (Kieffer and Phillips, 1990). Un processus de coagulation succède à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Le contact entre le sang circulant et le centre nécrotique où le facteur tissulaire (un récepteur cellulaire initiateur de la coagulation physiologique) est synthétisé et sécrété par les CML et les macrophages, constitue une étape clef de la thrombose (Tedgui and Mallat, 2000). Le facteur tissulaire qui un est facteur déterminant de la thrombogénicité est fortement induit par les éléments de l'inflammation ainsi que par les LDL-ox. C'est le contact du facteur tissulaire avec le sang circulant qui permettra, par son association avec un autre facteur (facteur VIIa), l'activation de la cascade enzymatique qui conduit à la formation de thrombine et au dépôt de fibrine, à l'origine de thromboses. Finalement, la survenue d'un processus thrombotique au niveau de la lésion coronarienne n'implique pas forcément l'occlusion totale du vaisseau. Le thrombus peut rester pariétal et s'associer le plus souvent à un épisode d'angor instable.

Comme indiqué et expliqué dans ce chapitre, les niveaux plasmatiques élevés de LDL-ox jouent un rôle majeur dans le processus athérosclérotique; donc, la réduction de ces lipoprotéines athérogènes est une cible prioritaire dans la prévention des MCV.

2. Facteurs de risques

D'une façon générale, le risque de développer une MCV donnée peut varier en fonction de la présence ou de l'absence de caractéristiques individuelles (âge, sexe, profil lipidique et génétique, etc.) et socio-économiques ou environnementales. Les facteurs de risque (FR) sont variés et leur contrôle est devenu primordial dans prise en charge de ces maladies qui se traduit par une prévention primaire dans la population générale et une secondaire chez les patients à risque subissant des manifestations cliniques. Parmi les FR, on distingue : les facteurs modifiables et les facteurs non modifiables.

2.1. Facteurs de risque non modifiables

2.1.1. L'âge

L'incidence et la mortalité des MCV augmentent avec l'âge de façon quasi exponentielle. Le vieillissement naturel de l'organisme en est la principale cause. Ce vieillissement s'accompagne également de la modification d'autres FR (élévation de la tension artérielle, du taux de cholestérol, etc.), et évidemment, la dégénérescence « *naturelle* » de la paroi artérielle. L'âge d'apparition de ces manifestations se situe entre 55 et 75 ans.

2.1.2. Le sexe

Toutes les études aboutissent aux mêmes conclusions : les affections liées aux MCV sont plus fréquentes pour le sexe masculin et augmentent progressivement avec l'âge. En combinant âge et sexe, le risque de faire un accident cardiovasculaire augmente à partir de 55 ans chez l'homme et à partir de 65 ans chez la femme.

2.1.3. Les antécédents familiaux de MCV

Les sujets ayant des antécédents familiaux de maladies coronaires prématurées, avant 55 ans chez un homme et avant 65 ans chez une femme, ont un risque d'infarctus de deux à cinq fois plus élevé que ceux qui n'ont pas de tels antécédents. Ces relations parentales

peuvent refléter le partage d'un environnement commun (habitudes alimentaires) et/ou des caractères génétiques de prédisposition.

2.2. Facteurs de risque modifiables

2.2.1. Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est définie comme étant une tension systolique ≥ 140 mmHg ou une tension diastolique ≥ 90 mmHg. La mortalité cardiovasculaire est multipliée par 3 lorsque la pression artérielle systolique est ≥ 160 mm Hg (Berenson et al., 1998).

2.2.2. Le diabète de types 1 et 2

Qu'il s'agit du diabète non insulino-dépendant (type 2) ou du diabète insulino-dépendant (type 1), le diabète multiplie par 2 chez l'homme, et par 3 à 4 chez la femme, le risque relatif de maladie coronaire (Barrett-Connor et al., 1991; Knowler et al., 1991).

2.2.3. L'obésité

Une surcharge pondérale (index de masse corporelle ou IMC >30 kg/m²) est un paramètre prédisposant aux MCV, particulièrement si une obésité abdominale (rapport tour de taille/tour de hanches ≥ 1 chez l'homme, ou $\geq 0,85$ chez la femme) est présente (Dagenais et al., 2005). Les obèses sont le plus souvent hypertendus, sédentaires, diabétiques, hyperlipidémiques, etc. L'association régulière de l'obésité à de tels FR essentiels fait douter de son caractère génétique lié à un régime alimentaire inadéquat ainsi qu'à un mode de vie sédentaire.

2.2.4. Tabac

Le risque cardiovasculaire est corrélé de façon linéaire à la consommation de tabac et à la durée de l'intoxication. Chez les hommes de moins de 65 ans, 45% des décès résultant d'une MCV sont dus à la consommation tabagique, alors que chez les femmes ce pourcentage est de 40% (English et al., 1995).

2.2.5. La sédentarité

Les MCV sont 2 à 3 fois plus importants chez les sujets sédentaires que chez ceux qui pratiquent une activité physique régulière (Marcus et al., 1998).

2.2.6. Surconsommation d'alcool

Il existe une corrélation curviligne entre les niveaux de consommation d'alcool et le risque de décès par MCV. Une consommation modérée d'alcool (environ 2 verres standards par jour pour homme et 1,2 verre standard pour femme) a un effet protecteur vis-à-vis des MCV. Au-delà des consommations standards, le risque de MCV augmente.

2.2.7. L'alimentation riche en graisses saturées

Son rôle dans le développement des MCV est bien établi. La consommation d'aliments et de boissons sucrés tient évidemment une grande place dans le développement du diabète, du surpoids et de l'HTA; des FR qui pourraient conduire à des MCV. En outre, la suralimentation est en étroite lien avec la sédentarité : *syndrome « chips-coca-télé », aliments industriels trop sucrés et trop gras », ainsi que le « fast food drive ».*

2.2.8. Stress et profil psychologique

Il est bien connu que l'IM peut être précipitée par le stress mental (O'Loughlin et al., 1998), augmentant ainsi le besoin d'oxygène myocardique, qui causera une agrégation plaquettaire et une vasoconstriction, à l'origine de MCV (Wilson et al., 1994).

2.2.9. Facteur de risque majeur : Dyslipidémies

Les dyslipidémies demeurent un des FR cardiovasculaires majeurs, en particulier pour les cardiopathies ischémiques. Il est maintenant démontré que le traitement de la dyslipidémie diminue la morbi-mortalité cardiovasculaire (Ford et al., 2007).

On distingue différents types de dyslipidémies :

- 1) Les hypolipidémies (diminution du taux des lipides sanguins) sont principalement représentées par l'hypocholestérolémie (diminution du taux de cholestérol sanguin). Les hypolipidémies sont généralement dues à des insuffisances alimentaires importantes ou à des maladies du tube digestif qui diminuent l'absorption des lipides

alimentaires. Ces anomalies purement biologiques n'ont aucune conséquence (ni symptômes ni complications) en elles-mêmes.

- 2) Les hyperlipidémies (augmentation du taux de lipides sanguins) sont principalement représentées par l'hypercholestérolémie, l'hyperchylomicronémie et l'hypertriglycéridémie qui peuvent avoir un effet athéroscléreuse.

Tableau 2 : Les classifications des taux du cholestérol et des triglycérides (NCEP, 2001).

<i>Niveau</i>	<i>Cholestérol total</i>	<i>LDL</i>	<i>HDL</i>	<i>Triglycéridémie</i>
Optimal	< 2,4g/l	< 1,45g/l	< 0,4-0,55g/l	< 1,5g/l
Limite	2,4-2,5g/l	1,45-1,6g/l	-	1,5-2g/l
Élevé	> 2,5g/l	> 1,6g/l	> 0,6g/l	> 2g/l

Les taux normaux sont définis par des niveaux normaux de cholestérol, de LDL et de HDL permettant dans certaines mesures de se mettre à l'abri des risques cardiovasculaires. Selon les guides de pratiques européennes et américains, chez un adulte, la cholestérolémie est limitée aux valeurs suivantes 2,40 et 2,50g/l respectivement, au-delà, le cholestérol est considéré comme élevé. Un niveau de cholestérol est considéré optimal s'il est inférieur à 2,40g/l et élevé s'il est supérieur à 2,50g/l. Ces valeurs croissent avec l'âge, après 70 ans, elles ont tendance à s'abaisser, ce qui peut être lié à une sélection par décès des sujets les plus à risques. Quant à la valeur optimale du LDL, elle est souhaitée inférieure à 1,45g/l. Alors que le HDL se situe à une valeur optimale de 0,4g/l chez l'homme et de 0,55g/l chez la femme pour un risque standard. Concernant la triglycéridémie, elle est à une valeur limite si elle est comprise entre 1,5 et 2,0g/l, optimale si elle est inférieure à 1,5g/l et pathologique au-delà de 2,0g/l (Tableau 2).

2.2.9.1. Différents types d'hyperlipidémies

La classification internationale de Fredrickson classe les hyperlipidémies par type de lipoprotéine dont la concentration plasmatique est élevée (Fredrickson et al., 1967). Selon cette classification, six phénotypes d'hyperlipidémies sont décrits (Tableau 3) :

- 1) Quatre sont liés à l'augmentation du niveau d'une seule lipoprotéine, connue sous le nom d'hypertriglycéridémie prédominante : type I (élévation des chylomicrons), type IIa (élévation des LDL), type III (élévation des IDL), type IV (élévation des VLDL).
- 2) Deux liés à l'augmentation simultanée de la concentration de deux lipoprotéines, nommées hypertriglycéridémies mixtes : type IIb (LDL et VLDL) et type V (chylomicrons et VLDL).

Tableau 3 : Classification des hyperlipidémies selon Fredrickson

<i>Type</i>	<i>Nominations</i>	<i>Lipoprotéines Augmentée</i>	<i>Description</i>
I	Hypertriglycéridémie Majeure	Chylomicron	Élévation de chylomicron.
IIa	Hypercholestérolémie Pure	LDL	Taux normal de TG (1,35g/L); taux élevé de cholestérol (3g/L); une forte teneur en LDL.
IIb	Hyperlipidémie Combinée	LDL + VLDL	Taux élevés de TG (3,15g/L); taux élevé de cholestérol (3g/L); une forte teneur en LDL.
III	Hyperlipidémie	IDL*	Taux élevé de TG (3,2g/L); taux de cholestérol plus élevé (3,45g/L).
IV	Hypertriglycéridémie Endogène	VLDL	Taux très élevé de TG (3,85g/L); taux presque normal de cholestérol (2,45g/L).
V	Hypertriglycéridémie Majeure	VLDL + Chylomicron	Taux très élevé de TG (14g/L); un taux élevé de cholestérol (3,8g/L).

*(IDL : remnants des particules riches en TG).

Le désavantage dans ce type de classification est la variation du phénotype d'un jour à l'autre. Le type IV peut se transformer en type V ou en type IIb. Donc, un même individu peut présenter alternativement un phénotype IIa, IIb et IV.

Les hypertriglycéridémies prédominantes (I, V, IV) et les hypertriglycéridémies mixtes se traduisent par des complications : pancréatites et athérosclérose respectivement, notamment l'hyperlipidémie de type III qui est hautement athérogène (De Gennes, 1971). Nous décrivons ainsi seulement les hyperlipidémies impliquées dans l'athérosclérose, qui constituent une cause majeure à l'origine de cette maladie.

2.2.9.1.1. L'hypercholestérolémie pure (type IIb)

On distingue 2 grands groupes dans ce type d'hypercholestérolémie : la forme dite familiale (hypercholestérolémie familiale (HF)) à transmission autosomique et la forme polygénique. Cette dernière est associée à plusieurs défauts protéiques d'origine génétique en rapport avec un régime alimentaire riche en cholestérol et en graisses saturées. Tandis que l'HF comporte deux affections dont la première est associée à un défaut des récepteurs aux LDL (la mieux connue) et la seconde est une mutation touchant la structure de l'apoB-100. Cette forme familiale est une maladie sévère monogénique à transmission autosomique dominante. Elle peut donner naissance à un phénotype hétérozygote (1/500) de descendant ainsi qu'à un phénotype homozygote (1/1000 000) très rare (Austin et al., 2004). Des mutations naturelles (défaut de synthèse, de maturation, etc.) du gène codant pour le récepteur des LDL sont à l'origine de cette maladie (Bruckert and Chapman, 1994), résultant en un niveau de LDL très élevé (>5g/l). Le traitement courant actuellement est l'aphérèse hebdomadaire des LDL, associée à de fortes doses de statines, permettant de diminuer de 50 % le taux circulant de LDL.

2.2.9.1.2. L'hyperlipidémie de type IIb

C'est l'hyperlipidémie la plus fréquente, elle est mixte et caractérisée par une élévation de TG et de cholestérol qui peut exprimer des symptômes, tels que des dépôts cornéens (dépôt de cholestérol à la périphérie de la cornée) et des xanthélasmas (dépôt de cholestérol jaunâtre sur les paupières). Ce type de dyslipidémie est associé à un trouble du métabolisme glucidique ou une HTA. L'analyse biologique du sérum d'un patient à jeun, montre une élévation du cholestérol, du niveau de LDL et donc d'apo B₁₀₀ ainsi qu'une augmentation des VLDL. Tandis que, le taux des HDL est diminué. Dans la plupart des cas, cette hyperlipidémie se manifeste comme une hyperlipidémie familiale à une transmission autosomique dominante et nommée hyperlipidémie familiale combinée. Le traitement de cette hyperlipidémie fait appelle, en plus de mesures hygiéno-diététiques, l'emploi de 3 classes de médicaments : les résines, les fibrates de 2^{ieme} génération et les statines.

2.2.9.1.3. L'hyperlipidémie de type III

Cette hyperlipidémie liée à une mutation génétique rare est caractérisée par un risque athérogène très élevé qui pourrait être tripolaire : cœur, membres inférieurs et carotides. Cette anomalie est soulignée par une cholestérolémie totale et une triglycéridémie anormale de 3 et 5g/L respectivement. Les manifestations cliniques sont les suivantes : xanthomes tubéreux (tumeurs cutanées bénignes riches en dépôts lipidiques de couleur jaunâtres), dépôts jaunes orangés de plis palmaires (tache jaunâtre linéaire qui se localise au creux des plis de flexion de la main.). La physiopathologie du type III est centrée sur l'apo-E (Utermann et al., 1979) qui est codée par 3 allèles co-dominants (E2, E3, E4) sur un même locus, donnant lieu à 6 phénotypes possibles. Les patients exprimant ce type III montrent principalement un phénotype E2/E2 qui est moins reconnu par les récepteurs de LDL amenant ainsi à un ralentissement du catabolisme des IDL. Le traitement contribue à l'emploi de mesures hygiéno-diététiques et d'une médication, les fibrates.

2.3. Nouveaux facteurs et marqueurs de risque

2.3.1. Caractéristiques lipidiques

Différentes anomalies lipidiques majorent le risque cardiovasculaire. L'élévation des TG, la diminution du taux de HDL au-dessous de 0,45g/L et la présence de LDL petites et denses sont des paramètres à prendre en compte. L'hypertriglycéridémie semble être un FR indépendant, or sa présence est associée à d'autres FR comme l'HTA ou le diabète, mais aussi à une diminution des niveaux de HDL et à une élévation des taux de LDL modifiées qui sont alors plus sensibles à l'oxydation.

2.3.2. Marqueurs biologiques

2.3.2.1. Lipoprotéine (a) (Lp (a))

C'est une particule riche en cholestérol, similaire aux LDL, d'origine hépatique qui présente à sa surface une protéine, l'apo a, liée de façon covalente à l'apo-B₁₀₀. La concentration plasmatique de la Lp (a) varie considérablement selon les ethnies et selon

les individus : elle peut s'étendre de 0,01g/l à 1g/l (jusqu'à 2g/l). Sa valeur physiologique normale est de 0,3g/l. Étant déterminée par le patrimoine génétique, elle reste invariable durant la vie d'une personne saine. Cependant, elle diminue fortement chez les personnes buvant de grandes quantités d'alcool. La Lp (a) est un marqueur de risque cardiovasculaire quand elle atteint une concentration élevée (Schreiner et al., 1993), elle est d'autant plus dangereuse que le niveau de LDL est élevé, notamment chez les sujets masculins ayant un taux bas de HDL et une HTA. Parmi tous les médicaments hypolipémiants, seuls l'acide nicotinique et l'hormonothérapie de remplacement ont pu diminuer significativement les niveaux de Lp(a) (Knopp et al., 1998).

2.3.2.2. Protéine C réactive

L'élévation du taux de cette protéine est associée à un processus d'athérosclérose reflétant la physiopathologie. D'où l'existence d'une forte corrélation entre le taux de la protéine C réactive et la survenue des décès d'origine cardiovasculaire.

2.3.2.3. Homocystéine

L'hyperhomocystéinémie est considérée comme un FR indépendant d'athérosclérose; lorsque le taux plasmatique de cet acide aminé s'élève de façon modérée. Le risque d'IM est multiplié par trois dans les 5 années suivantes.

2.3.2.4. Épaisseur intima-media

Il existe une forte corrélation entre l'épaisseur de l'intima-media évaluée au niveau de la carotide et les FR cardiovasculaires, ce paramètre s'élève lorsque ces derniers sont accrus.

Pour finir, comme indiqué ci-dessus, les dyslipidémies constituent un FR majeur dans le déroulement du processus athérosclérotique, qui est initié par l'étape déterminante de l'oxydation des LDL (expliqué au premier chapitre). Ce FR, caractérisé par un dérèglement de profil lipidique, aide et favorise les circonstances amenant à une oxydation des lipoprotéines membranaires. La réduction de ce FR est donc une cible primordiale dans la prévention de l'athérosclérose, notamment si elle est couplée à la présence d'un agent antioxydant puissant limitant efficacement cette étape d'oxydation des lipoprotéines, telle que la bilirubine, qui sera au centre d'intérêt du chapitre suivant.

3. Effet athéro-protecteur de la bilirubine

La bilirubine est un composé endogène qui pourrait être toxique (Tiribelli and Ostrow, 2005), notamment au stade néonatal, qui, à un état avancé, provoque des dommages cérébraux. Cependant, de nombreuses études récentes ont démontré que la bilirubine possède également des propriétés antioxydantes puissantes grâce à son potentiel d'agir comme un capteur de radicaux peroxy (Dudnik and Khrapova, 1998); et qu'une hyperbilirubinémie modérée pourrait avoir des effets positifs sur la santé cardiovasculaire. Ce pigment biliaire est capable d'inhiber l'oxydation des LDL (le processus initiateur de l'athérosclérose), exprimant ainsi des effets athéro-protecteurs (Stocker and Keaney, 2004). En outre, la bilirubine sert comme marqueur de diagnostic des désordres hépatiques et des troubles sanguins.

3.1. Bilirubine : généralités

3.1.1. Structure et définition de la bilirubine

La bilirubine ((4Z, 15Z)-Bilirubine-IX α), pigment biliaire de coloration jaune, est un acide dicarboxilique tétrapyrrole linéaire lipophile abondant dans le plasma humain à une concentration physiologique variant de 0.3 à 1.2 mg/dl (Adin et al., 2005). C'est le produit endogène de dégradation de l'hème. En effet, l'hème est un complexe de protoporphyrine IX et de fer et constitue un groupement prosthétique de nombreuses hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine, oxydases, catalases) impliquées dans le transport du métabolisme de l'oxygène et le transfert d'électrons (cytochromes).

La bilirubine semble être une molécule simple retrouvée chez les mammifères, or celle-ci non conjuguée, se distingue par une structure stéréochimique particulière (Figure 5). Elle consiste en deux unités de dipyrinones joints par un groupe de -CH₂-. La rotation de ces dipyrinones par rapport au domaine centrale -CH₂-, au niveau du C10, engendre plusieurs conformations chimiques (Lightner et al., 1991). Tous les groupements hydrophiles de cette structure sont impliqués dans de fortes liaisons hydrogènes, ce qui fait de ce composé une molécule fermée caractérisée par une conformation P-hélice (Ostrow et al., 1994). Ces liaisons d'hydrogène permettent à la bilirubine non conjuguée

d'être une molécule hydrophobe. Dépendamment du pH du plasma, de la bile ou de l'urine, la bilirubine non conjuguée se présente sous forme d'un diacide non chargé, d'un mono-anion ou d'un di-anion (Ostrow et al., 1994). Le diacide non chargé est la structure dominante à pH physiologique faible, mais les structures ionisées sont plus répandues dans un milieu alcalin à une valeur de pKa variable de 8,12 à 8,44 respectivement au premier et au deuxième anion (Ostrow et al., 1994).

La bilirubine est le principal pigment des fèces, responsable de leur couleur jaunâtre. Ce pigment biliaire est potentiellement toxique mais il est rapidement conjugué au niveau hépatique, pour être ensuite éliminé dans l'excrétion urinaire. Quand la bilirubine non conjuguée s'accumule dans le sang et atteint un niveau excédentaire à 2.5 mg/dl, il y a ainsi un signe d'hémolyse (destruction des globules rouges à une fréquence rapide par rapport au foie). La présence de bilirubine conjuguée dans le sang (bilirubinémie) ou dans les urines (bilirubinurie) est le signe de dommages hépatocellulaires ou d'une obstruction de conduits biliaires (cholestase). Enfin, l'élévation de l'une ou de l'autre forme de bilirubine dans le sang s'accompagne d'un ictère ou de la jaunisse qui devient apparente. La peau et les paupières des yeux se décolorent par les molécules jaunes.

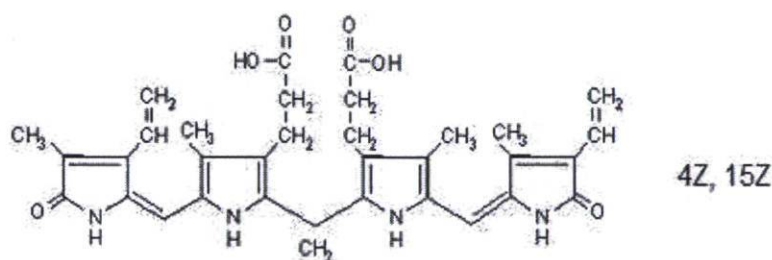


Figure 5 : Structure chimique naturelle de la bilirubine non conjuguée IXa 4Z, 15Z (Feverly, 2008).

3.2. Synthèse de la bilirubine

Le catabolisme de l'hème est l'une des voies métaboliques majeures procédées chez les mammifères. L'hème dérive de l'hémoglobine des globules rouges matures situés dans la rate ainsi que des cytochromes P450. L'hème et de multiples agents comme une modification significative de l'état redox cellulaire (surproduction de radicaux libres et/ou diminution de systèmes antioxydants) induisent la synthèse d'une enzyme inductible, l'hème oxygénase (HO-1) qui est fortement synthétisée dans les macrophages

du foie et de la rate (Maines et al., 1986). Cette enzyme utilise l'hème à la fois comme substrat et comme groupe prosthétique (Alam et al., 2004). HO-1 fixe l'un des deux atomes d'O₂ sur son substrat et convertit l'hème libre en biliverdine, qui est ultérieurement réduite par la biliverdine réductase (BVR) en bilirubine insoluble (Figure 6). En effet, HO-1 dégrade l'anneau du tétrapyrole, du composé héminique (nommé aussi, ferriprotoporphyrine IX), au niveau du pont de l' α -méthane pour former le tétrapyrole linéaire de la biliverdine IX α . La biliverdine IX α est réduite par une enzyme cytosolique, la BVR en bilirubine IX α , suite à une dépense d'une molécule de NADPH. Au cours de cette étape de conversion, l'hème fournit des quantités équimolaires de Fe²⁺, de biliverdine et de monoxyde de carbone (CO). Un atome de carbone est éliminé et diffusé sous forme de CO. Il provient de la libération du carbone α -méthane associant 2 groupements pyrroles. C'est la seule source endogène connue de CO dans l'organisme. L'ion ferreux Fe²⁺ libre est aussi un produit de dégradation de l'hème par HO-1. Bien que cette réaction augmente les proportions de fer libre intracellulaire, or ces concentrations diminueront grâce à l'action de la ferritine agissant comme un antioxydant séquestrant le fer (Otterbein and Choi, 2000).

Pour chaque cycle de clivage de tétrapyrole, la stœchiométrie de la réaction nécessite 3 moles d'O₂ et 7 équivalents réducteurs fournis par la (NADPH, H⁺) cytochrome P450 réductase (Matsui et al., 2005). Cependant, ces produits de dégradation de l'hème, sont des métabolites biologiquement actifs : le Fe²⁺ est un agent pro-oxydant efficace (par contre, l'ion Fe²⁺ stimule l'activité de la ferritine, protéine stockant le fer); la bilirubine et la biliverdine expriment des propriétés antioxydantes et le CO est une molécule ayant un rôle de signalisation neuronale.

3.2.1. Hème oxygénase

A ce jour, trois isoformes de l'hème oxygénase ont été identifiés : HO-1, HO-2 et HO-3. Les isomères HO-1 et HO-2 représentent les produits de gènes distincts alors que HO-3, est considérée comme un pseudo-gène provenant du transcrit de HO-2. Les isoformes HO-2 et HO-3 sont constitutives et non inductibles par les agents environnementaux, contrairement à HO-1 qui est inductible et est ubiquitaire, distribué dans les différents tissus des mammifères et notamment se présente en abondance dans les macrophages du

foie et de la rate (Maines 1986). Les deux isoformes, HO-1 et HO-2 sont capables de transformer l'hème en biliverdine. Chez le rat, l'isoforme HO-2 est présente constitutivement dans le cerveau et les testicules. Elle protège les neurones du stress oxydant (Kitamura et al., 1998). Quant à HO-3, elle est inactive dans le catabolisme de l'hème. À l'inverse, HO-1 n'y est détecté que dans des conditions de stress. Cette synthèse est déclenchée par de multiples agents y compris l'hème lui-même et des modifications de l'état oxydant cellulaire de l'organisme. L'augmentation rapide et importante de la régulation de HO-1 après stimulation cellulaire est l'une des propriétés caractérisant cette enzyme. En outre, cette enzyme, exemple typique du stress cellulaire, répond aux dommages cellulaires aigus et protège contre le stress oxydatif (Stocker, 1990; Vile et al., 1994).

Habituellement, de point de vue antioxydant, une protection est due principalement au déplacement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou à la formation d'antioxydants. Dans le cas de HO-1, la situation est plus complexe, le déplacement de ces ROS est accompagné de la formation de la bilirubine et également de la formation d'autres espèces réactives comme le fer. En effet, dans les conditions de stress oxydatif, HO-1 s'associe à l'augmentation de la synthèse de ferritine de telle façon que les réactions de radicaux libres catalysées par le fer, seront limitées au cours des périodes ultérieures de stress (Vile and Tyrrell, 1993). En outre, on a également mentionné dans la littérature que le CO exprime un certain nombre d'activités potentiellement bénéfiques vis-à-vis du stress cellulaire (Otterbein et al., 2003), mais les mécanismes cellulaires qui y sont impliqués ne sont pas encore élucidés.

Depuis que HO-1 est connue comme l'enzyme limitante de la synthèse de la bilirubine, plusieurs équipes de recherches ont examiné les effets de la déficience de cette enzyme chez l'humain. Dans les cas pathologiques, une déficience pourrait être associée à une anémie hémolytique, à un retard de croissance et à des dommages cellulaires endothéliaux chroniques. Les propriétés antioxydantes indirectes et athéro-protectrices de HO-1 ont fait l'objet de plusieurs travaux; à titre d'exemple, on a révélé que des souris déficientes en HO-1 sont particulièrement susceptibles au stress oxydative (Lin et al., 2007).

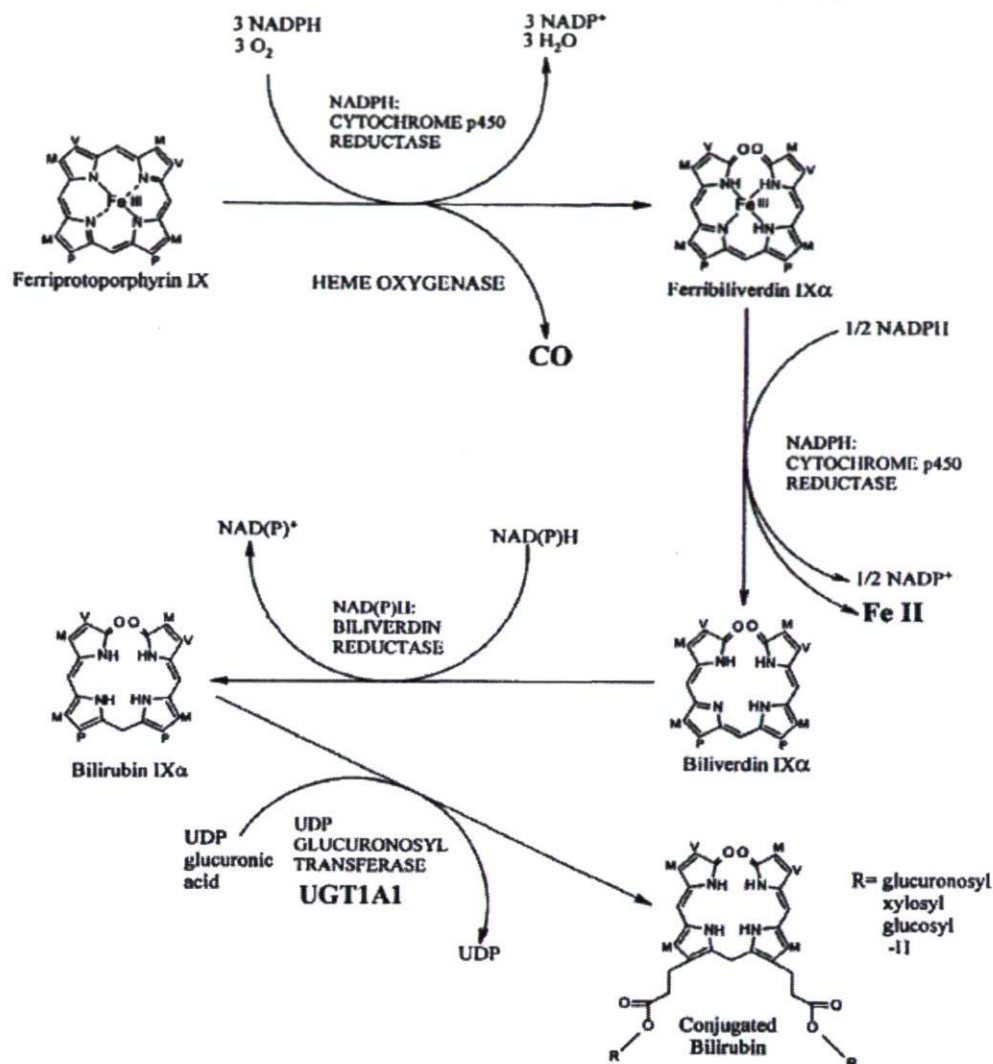


Figure 6 : Métabolisme de la bilirubine.

Synthèse de la bilirubine par l'action successive de HO-1 et BVR. La glucuronidation de la bilirubine par l'UGT1A1 engendre la formation des métabolites mono- et diglucuronidés qui seront excrétés dans la bile (Bosma, 2003).

3.2.2. Biliverdine réductase

Bien que la connaissance de la BVR demeure peu élucidée, elle était identifiée comme une enzyme autophosphorylée qui catalyse la dernière étape du catabolisme de l'hème (Salim et al., 2001). La biliverdine, résultant de l'action de HO-1, est convertie par la BVR à l'aide d'une réaction de phosphorylation-dépendante, en bilirubine et puis cette dernière est recyclée.

3.3. Métabolisme de la bilirubine et niveaux normaux

3.3.1. Métabolisme de la bilirubine sous conditions normales

La bilirubine synthétisée est acheminée dans la circulation sanguine par l'albumine jusqu'au foie. Le passage dans les hépatocytes est partiellement passif d'une part (Zucker et al., 1999) et d'autre part, ce fait partiellement par l'intermédiaire de protéines de transport d'anions organiques (OATP1B1) (Campbell et al., 2004). Dans le cytosol des hépatocytes, la bilirubine non conjuguée est en grande part liée à la glutathion-S-transférase A (ligandin) et en petite part liée à la protéine de liaison aux acides gras (Ostrow et al., 1994). Similairement à ce qui est observé au niveau sérique, cet état lié de la bilirubine maintient un niveau faible de bilirubine libre qui est potentiellement toxique. Au niveau hépatique, cette bilirubine est majoritairement glucuronidée pour être plus tard éliminée dans la bile. Cette molécule est conjuguée au niveau des microsomes hépatiques par l'intermédiaire d'une réaction de glucurono-conjugaison : un transfert d'un ou de deux groupes d'acides glucuroniques (glucose ou xylose) aux groupes d'acides propioniques de la bilirubine dans le cadre d'une liaison ester (Schmid, 1956); ce qui entraîne la mono-conjugaison ou la di-conjugaison de la bilirubine. Cette réaction est catalysée par l'UDP-glucuronyltransférase, codée par le gène UGT1A1 (Bosma et al., 1994). Cette estérification perturbe les liaisons hydrogènes intramoléculaires de la molécule, ce qui permet son ouverture et la rend ainsi plus soluble dans l'eau afin qu'elle puisse être excrétée dans la bile. Le produit majeur de conjugaison est la bilirubine diglucuronidée, elle est nommée bilirubine directe, tandis que la fraction non conjuguée, liée à l'albumine est appelée bilirubine indirecte. La somme des 2 fractions directe et indirecte correspond à la bilirubine totale (bilirubine totale : 0.1-1.2 mg/dl et bilirubine direct : 0.1-0.3mg/dl) (Rosenthal et al., 1990). En outre, il faut noter que cette réaction de conjugaison permet une diminution de 5 à 10 fois de l'interaction à l'albumine ou à des protéines intracellulaires et empêche la réabsorption intestinale (pour que les agents hydrophobes ne traversent pas facilement la paroi intestinale). Chez l'humain, la bilirubine conjuguée formée dans les hépatocytes est excrétée dans la bile contre un gradient de concentration par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire canaliculaire multidrug resistance-related protein (MRP)-2, également appelé ABC-C2,

appartenant à la famille de l'adénosine triphosphate (ATP)-binding cassette (Jansen et al., 1999). Les conjugués sont incorporés dans des vésicules biliaires qui passent au petit intestin, puis au colon où elles sont réduites par des bactéries en un mélange de substances : l'urobilinogène, l'urobiline, la stercobiline et la stercobilinogène. Une part mineure de ce mélange subit une déconjugaison par des enzymes bactériennes qui redonnent de la bilirubine non conjuguée. Cette dernière pourrait être réabsorbée par l'intestin contrairement à la bilirubine glucuronidée qui est excrétée dans la bile. Cependant, dans le cas de maladies hépatiques, la bilirubine conjuguée est diffusée dans l'urine lui donnant une couleur jaune sombre et une couleur jaune clair aux fèces.

3.3.2. Niveaux normaux

Dans un délai de 24h, 250 à 300mg de bilirubine sont produits chez un adulte sain (Berk et al., 1969). Il a été indiqué dans la littérature que le niveau de bilirubine intracellulaire est de l'ordre du nanomolaire; approximativement 50nM (Baranano et al., 2002). Dans les conditions physiologiques, les concentrations plasmatiques de la bilirubine non et liée à l'albumine, chez l'homme sont variables entre 5 et 17 μ M, (McDonagh, 1979). Par contre, les concentrations plasmatiques > 300 μ M sont associés à un risque élevé de dysfonction neurologique suite à une accumulation de bilirubine au niveau cérébral. Bien qu'elle soit produite dans pratiquement toutes les cellules, la concentration cellulaire exacte de la bilirubine reste inconnue, évidemment, elle est susceptible d'être présente à de faibles concentrations dans toutes les membranes cellulaires.

La bilirubine non conjuguée est très peu soluble dans l'eau; dans le plasma, elle est étroitement reliée à l'albumine. La constante de dissociation du site de liaison à l'albumine est de $K_d = 7 \times 10^7 M^{-1}$ (Brodersen, 1979). Ostrow et ses collègues (Ostrow et al., 1994) ont déterminé la solubilité de la bilirubine non conjuguée IX α , sous forme de diacide non ionisé : 70nM. Cette forme est la plus retrouvée au niveau sanguin à un pH physiologique. Le mono-anion est répandu selon une proportion d'environ de 17%, tandis que le dianion est à une proportion très mineure (Ostrow et al., 1994).

3.3.3. Réaction de glucuronidation

La glucuronidation ou la glucurono-conjugaison est un processus métabolique important impliquant une réaction catalytique, ayant comme co-substrat l'acide glucuronique et aboutit à la formation de métabolites hydrophiles. Cette réaction est impliquée dans le mécanisme de détoxification de la majorité des médicaments ainsi que dans la métabolisation de plusieurs substances endogènes et exogènes favorisant leur excrétion de l'organisme (Dutton, 1980). En effet, la glucuronidation protège l'organisme des accumulations de métabolites toxiques telles que la bilirubine, certains flavonoïdes, le benzo-pyrène et certaines médications phénoliques comme l'acétaminophène.

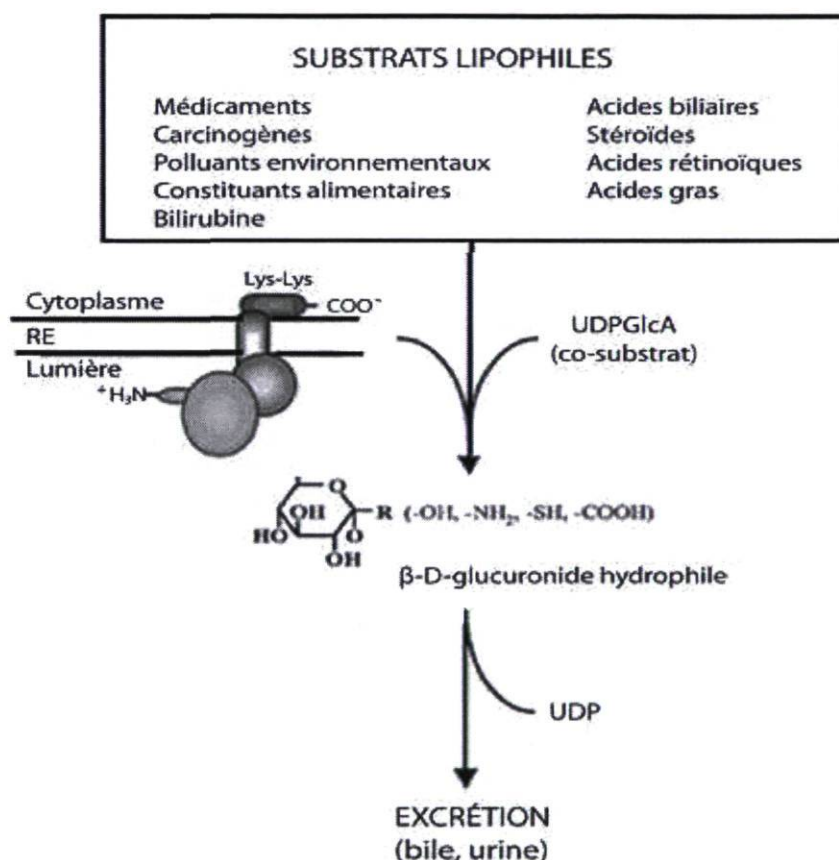


Figure 7 : Réaction de glucuronidation.

L'enzyme UGT catalyse l'ajout de l'acide glucuronique (provenant du co-substrat, UDPGA) sur un groupement fonctionnel (-OH, -COOH, -SH, -NH₂) d'une molécule lipophile donnée. Le substrat ainsi glucuronidé est rendu plus hydrophile (polaire) et est plus facilement excrété par l'urine ou la bile (Guillemette, 2003).

La réaction de glucuronidation consiste à un ajout enzymatique d'un groupement polaire, l'acide glucuronosyl sur le groupement fonctionnel d'une molécule cible hydrophobe (Figure 7). Ce groupement glucuronosyl est en provenance de l'acide uridine diphosphate glucuronique (UDPGA), réagit sur différents groupements fonctionnels : les hydroxyles (-OH), les carboxyles (-COOH), les thiols et les amines (-NH₂). Ce transfert de groupement augmente la polarité de la structure moléculaire (Strassburg et al., 2000) et entraîne un encombrement stérique sur la molécule qui modifie sa conformation en diminuant son affinité au récepteur spécifique, afin de favoriser son élimination par la bile et l'urine (Guillemette, 2003). Les réactions de glucuronidation ont principalement lieu au niveau hépatique, où le co-substrat, l'UDPGA est répandu à de fortes concentrations, bien supérieures à celles retrouvées dans les cellules extrahépatiques. Or, cette réaction est retrouvée aussi au niveau des tissus rénaux, des poumons, de l'intestin, de l'utérus et de la prostate (Pacifici et al., 1988; Pacifici et al., 1989).

3.3.3.1. L'enzyme uridine 5'-diphosphate-glucuronosyl-transférase (UGT)1A1

3.3.3.1.1. Généralités sur les UDP-Glucuronosyltransférase (UGTs)

La réaction de glucuronidation est catalysée par les UGTs, enzymes de la phase II du métabolisme, retrouvées chez la plupart des vertébrés. Les UGTs sont des enzymes transmembranaires, situées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) dans la majorité des tissus de l'organisme (Radomska-Pandya et al., 2005). A ce jour, plus de 117 UGTs ont été isolés et clonés chez les différentes espèces de mammifères, et dont 22 ont été identifiés chez l'homme. En général, les UGTs sont constitués de 529 à 531 acides aminés, comportant un domaine qui siège la liaison au substrat, le domaine amino-terminal (N-Ter) (constitue plus de 90% de la chaîne peptidique) et un domaine carboxy-terminal (C-Ter) qui siège la fixation du cofacteur l'UDPGA (Figure 8) (Strassburg et al., 1997; Hum et al., 1999). Ce domaine C-Ter est conservé entre tous les UGTs contrairement au domaine N-Ter qui est moins conservé et confère une certaine spécificité à chaque enzyme vis-à-vis de son ou ses substrat(s) (Strassburg et al., 2000).

Mackenzie et al. en 1997 (Mackenzie et al., 1997) ont suggéré une classification de la racine des UGTs, basée sur une divergence évolutive, dans laquelle, chaque premier exon est considéré comme un gène distinct. Ensuite, Mackenzie (Mackenzie et al., 2005) à mis à jour cette nomenclature de la superfamille des UGTs : 4 familles distinctes (UGT1, UGT2, UGT3 et UGT8) et dont 5 sous-familles (UGT1A, UGT2A, UGT2B, UGT3A, UGT8A) avec une homologie de séquence de 50% entre les différentes familles ainsi qu'une similitude protéique de 60% au sein d'une même famille. L'arbre phylogénétique des UGTs humains est présenté dans la Figure 9. L'UGT1A1 est l'enzyme responsable de la glucuronidation hépatique de la bilirubine, une attention particulière sera accordée à la famille des UGT1 et notamment l'isoforme UGT1A1.

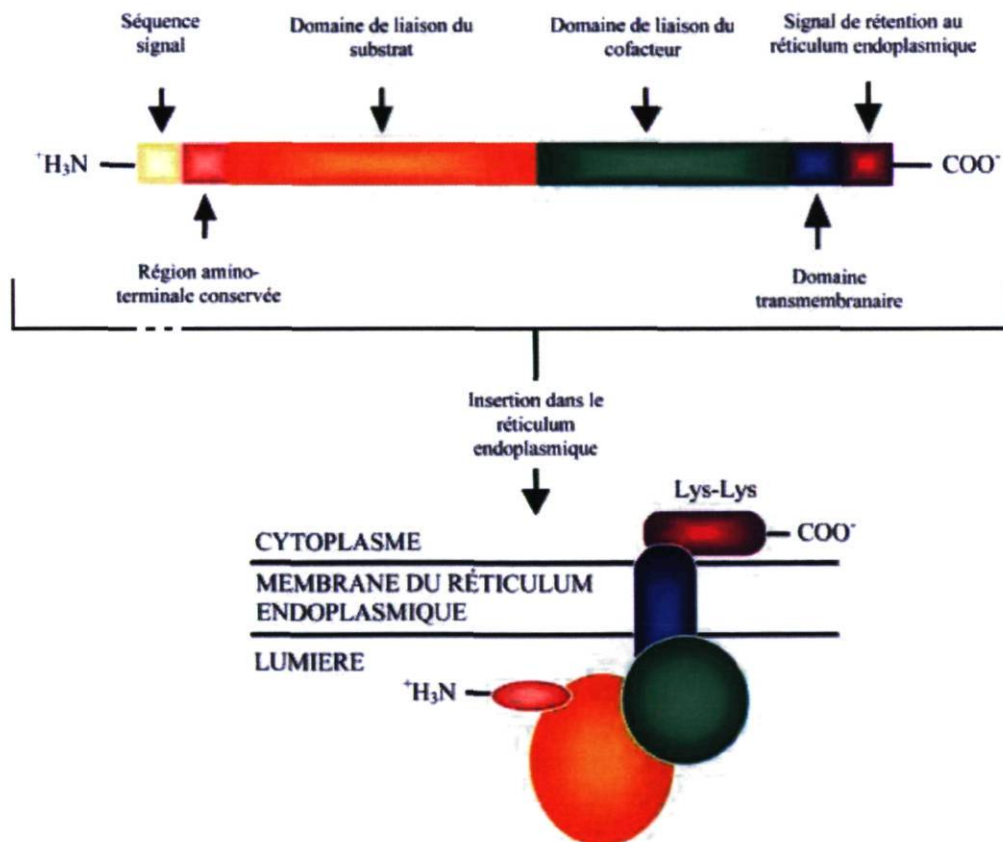


Figure 8 : Structure générale des UGTs localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique.

Le domaine transmembranaire des UGTs est composé d'une suite d'acides aminés hydrophobes (nécessaires à la localisation subcellulaire au niveau du RE).

3.3.3.1.2. La famille UGT1A et l'isoforme UGT1A1

La famille des UGT1 ne comporte que la sous-famille UGT1A qui comprend 9 enzymes distincts. Cette famille est localisée sur le chromosome 2 dans la région q37 (Gall et al., 1999). Le locus d'UGT1 comporte 13 exons 1 (en 5') spécifiques et 4 exons identiques (en 3') entre toutes les UGT1A. Par conséquent, 13 transcrits différents sont créés suite à l'épissage alternatif et chacune des UGT1A s'exprime individuellement (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 et UGT1A10). Chez l'homme, l'UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6 et 1A9 ont été identifiés et clonés au niveau hépatique, tandis que les transcrits de l'UGT1A7 (œsophage et estomac), l'UGT1A8 (œsophage, intestin) et l'UGT1A10 (œsophage, estomac, intestin et conduits biliaires) ont été identifiés exclusivement au niveau extrahépatique (Strassburg et al., 1999; Strassburg et al., 2000). L'UGT1A5 a été identifié au niveau de plusieurs tissus, mais sa fonction reste très peu connue (Strassburg et al., 1997). Également, 4 pseudo-gènes ont été identifiés au niveau du locus UGT1 : UGT1A2p, UGT1A11p, UGT1A12p et UGT1A13p. Ces gènes comprennent des codons-stops (non-sens, retrouvés sur la séquence nucléotidique de l'exon) qui interrompent la traduction à un stade prématuré, inhibant ainsi la formation de la protéine (Gong et al., 2001). Concernant la famille des UGT2, chaque protéine a un gène différent. Cette série de gènes est située sur le chromosome 4 de la région q13 à q28, comprend 6 exons et glucuronident préférentiellement les substrats endobiotique.

Ritter et al. ont réussi à isoler l'UGT1A1 humain nommé, HUG-Br1 (Ritter et al., 1991). Cet isoforme, membre de la famille des UGT1A est essentiellement retrouvée dans le foie, au niveau des microsomes du RE. Il constitue une enzyme de détoxification de la bilirubine, de la β -estradiol, du 2-hydroxy-estrone, du 2-hydroxy-estradiol, du 4-nitrophénol et de certains flavonoïdes (Senafi et al., 1994; Ito et al., 2002). La bilirubine est un substrat spécifique à l'UGT1A1 (Bosma et al., 1994) qui catalyse sa conjugaison à l'aide de l'UDPGA (Iyanagi et al., 1998). Le site catalytique membranaire de l'UGT1A1 est localisé dans la lumière du RE. Par conséquent, il y a une translocation de la bilirubine et de l'UDPGA du cytosol vers la lumière du RE, cette étape est primordiale pour le déroulement de la réaction de glucuronidation. On pense que ce transport de la bilirubine et de l'UDPGA dans la lumière du RE se fait par

l'intermédiaire de multiples protéines impliquées dans les voies de transport (Berg et al., 1995; Iyanagi et al., 1998). Toutefois, le mécanisme moléculaire de la translocation de la bilirubine et de l'UDPGA n'est pas clairement élucidé. Plusieurs déficits de conjugaison, dus au polymorphisme varié du gène de l'UGT1A1, ont été identifiés. On note la maladie de CN de type I et II et le SG, qui correspondent à des hyperbilirubinémies à prédominance conjuguée d'origine héréditaire (Bailey et al., 1977; Kadakol et al., 2000). Ces pathologies seront présentées dans les paragraphes 3.5.1.2 et 3.5.1.3.

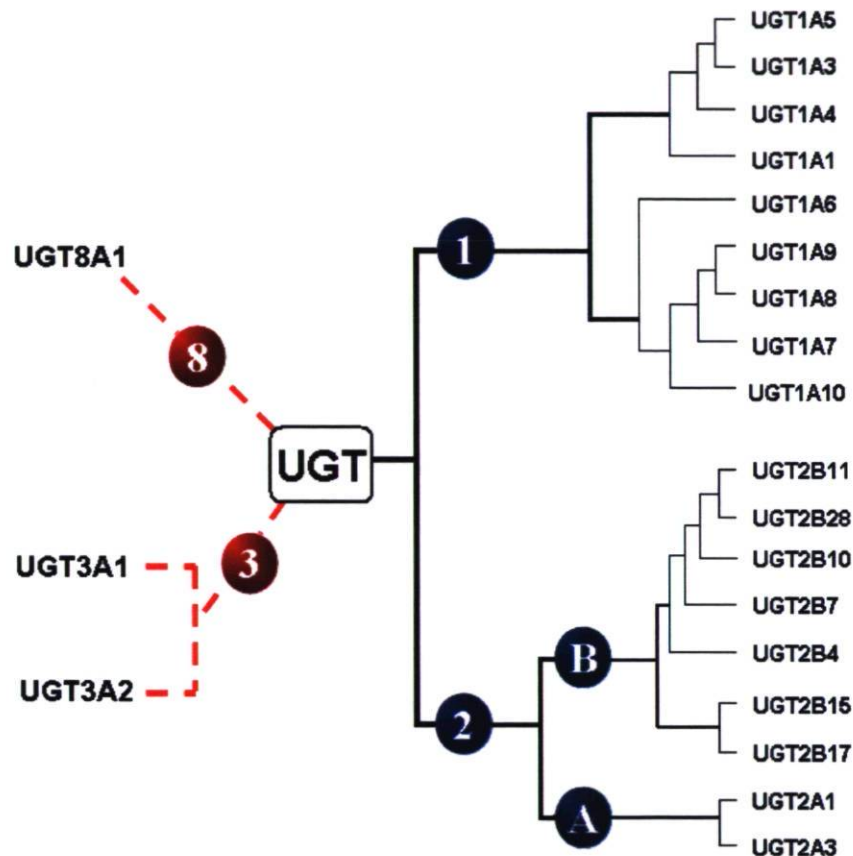


Figure 9 : Arbre phylogénétique de la superfamille des UGTs humaine.

Les familles UGT1 et UGT2 partagent environ 50% d'homologie, entre leurs chaînes d'acides aminés. À l'intérieur des familles 1 et 2, les différents isoformes partagent au moins 66% et 59% d'homologie, respectivement (Mackenzie et al., 1997).

3.3.3.2. MRP-2

Dans le foie, la bilirubine devenue conjuguée, acquiert des propriétés d'hydrophilicité et peut être excrétée dans la bile. La découverte des voies responsables de cette excrétion revient à des études réalisées, en présence de vésicules membranaires canaliculaires de

rats normaux confirmant l'existence d'un transporteur ATP-dépendant qui est impliqué dans le transport des métabolites glucuronidés du glutathion (Kobayashi et al., 1988; Nishida et al., 1992). De plus, ce même transporteur n'a pas été retrouvé chez des rats hyperbilirubinémiques. Dans un premier temps, il a été nommé « canalicular multispecific organic anion Transporter » (cMOAT) en tenant compte de sa grande spécificité aux anions organiques. En 1996, l'ADN d'une protéine hépatique isolée chez le rat, montre une similarité de 47,6% d'acide aminé au multidrug resistance associated protein 1 (MRP-1) humain (Paulusma et al., 1996). On a prouvé que l'expression de cette protéine est inexistante chez les rats hyperbilirubinémiques et qu'elle correspond bien au cMOAT du rat. Plus tard, le cMOAT humain, a été nommé MRP2 (ou ABC-C2) et dont on a aussi identifié 46% (1545 acides aminés, 190 kDa) de similitude de ce dernier avec MRP-1 (Taniguchi et al., 1996). MRP-2 est localisé au niveau de la membrane canaliculaire. Récemment, on a démontré que la bilirubine monoglucuronidée et diglucuronidée agissent comme des substrats de mrp2 (chez le rat)/MRP-2 (chez l'homme) (Kartenbeck et al., 1996). En effet, le MRP-2 humain appartient à la famille des MRPs, qui comporte 6 membres, y compris MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-4, MRP-5 et MRP-6 (nommés aussi, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, et ABCC6, respectivement) (Kool et al., 1997). D'un point de vue pathologique, un déficit de l'expression de MRP-2 est indiqué chez les patients porteurs du syndrome de Dubin-Johnson, montrant une déficience de l'excrétion de la bilirubine glucuronidée dans la bile (Kartenbeck et al., 1996).

3.4. Récapitulatif du métabolisme de la bilirubine

On peut résumer les différentes étapes de la synthèse et du métabolisme de la bilirubine, dans le récapitulatif suivant : dans la paroi vasculaire, l'hème est dégradé par l'enzyme HO-1 en biliverdine, CO et fer. Chez les mammifères, la biliverdine est ensuite réduite par la BVR pour former de la bilirubine, de couleur jaune et insoluble (Maines, 1997). La bilirubine insoluble est libérée dans la circulation sanguine, où elle se lie à l'albumine qui l'achemine jusqu'au foie. Dans les hépatocytes, elle est glucurono-conjuguée par l'enzyme UGT1A1 formant de la bilirubine conjugquée (soluble), puis éliminée dans la bile via le transporteur MRP-2 (Figure 10) (Vitek and Schwertner, 2007).

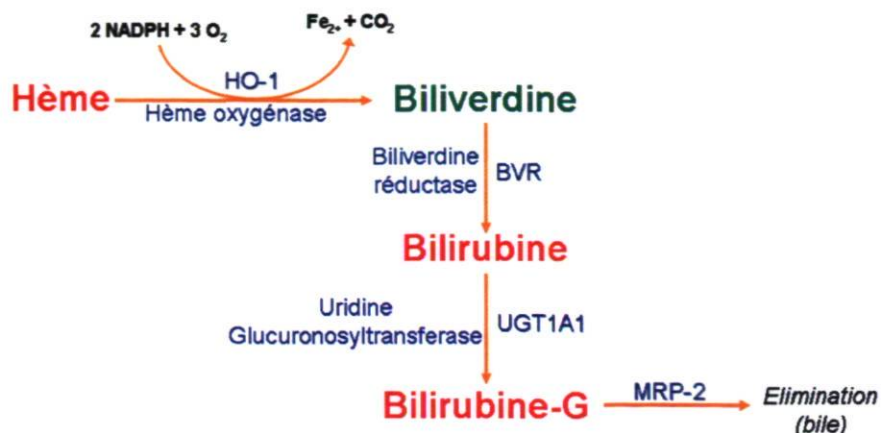


Figure 10 : Synthèse et métabolisme de la bilirubine.

3.5. Pathologies liées à la bilirubine

Cliniquement, on distingue les hyperbilirubinémies à prédominance non conjuguée et à prédominance conjuguée. Cette dernière est bénigne et peut être causée par une sécrétion anormalement réduite de la bilirubine conjuguée ou par une cholestase (Zucker et al., 2004). Seule la bilirubine libre (non conjuguée) et non liée à l'albumine peut diffuser dans les tissus et y exercer une action toxique, surtout chez les nouveau-nés, elle cause une toxicité neurologique. Également, des hépatites virales auto-immunes ou alcooliques sont associées à des élévations de taux de bilirubine conjuguée et non conjuguée. Le niveau sérique normal mesuré de bilirubine n'excède pas 1mg/dl ou 17 μ M.

3.5.1. Hyperbilirubinémies à prédominance non conjuguée

Un ictère apparent causé par une surproduction de bilirubine est habituellement dû à une hémolyse excessive chez des patients exprimant des défauts de conjugaison de ce métabolite. Un défaut de conjugaison est également la conséquence d'une perturbation de l'absorption hépatique ou d'une conjugaison débordée. Plusieurs défauts de conjugaison sont connus : le SG et la maladie de CN de type I et II. L'ictère néonatal défini par une toxicité neurologique chez le nouveau-né est aussi une pathologie à noter.

3.5.1.1. L'ictère néonatal

Chez le nouveau-né, à terme ou prématuré, l'ictère à bilirubine non conjuguée est fréquent. Le métabolisme de la bilirubine comporte des particularités chez le nouveau-né

qui expliquent la grande fréquence de l'ictère à cet âge de la vie, surtout le 2^{ème} ou 3^{ème} jour de vie. Il disparaît vers le 5 ou 6^{ème} jour de vie après que les urines retrouvent une coloration normale. En fait, plus de 50% des nouveau-nés montrent cette jaunisse qui est visible à des niveaux de bilirubine allant de 86 à 120 μ M (Ross, 2003). Ces particularités pourraient être dues à une durée de vie courte des globules rouges (Kaplan et al., 2002), à une liaison limitée de la bilirubine libre à l'albumine, à une immaturité de l'activité de l'UGT1A1 pendant la première semaine de vie (durant cette période de vie la capacité du foie à conjuguer la bilirubine n'est pas encore complètement développée) ou à une augmentation du cycle entéro-hépatique, etc. (Kapitulnik, 2004). Ainsi, le niveau de la bilirubine non conjuguée augmente, elle devient capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et se fixer sur les neurones, notamment au niveau des noyaux gris centraux, entraînant une nécrose cellulaire (Shapiro, 2003). Une des manifestations cliniques les plus dangereuses est l'ictère nucléaire caractérisé dans 70% des cas par un trouble du tonus, du comportement, anomalies oculaires et des troubles neurovégétatifs (apnées). À cet état, la concentration de la bilirubine est d'environ 300-400 μ M. L'encéphalopathie bilirubinique est aussi l'une des manifestations les plus dangereuses. Les symptômes comprennent la léthargie, une faible succion et l'hypertonie. Celle-ci peut être réversible, grâce au dépistage précoce. Lorsque des symptômes comme les crises épileptiques se manifestent, le nourrisson a déjà subi des lésions cérébrales et des séquelles à long terme comprenant des troubles auditifs, moteurs, du langage, etc.

La photothérapie est le premier choix de traitement, elle est précédée, si le niveau de bilirubine dépasse les valeurs limites (environ 260 μ M) selon les recommandations de l'académie américaine de la pédiatrie faites par en 1994. Ce type de traitement consiste en une formation d'autres dérivés de la bilirubine non conjuguée IX α normale, qui sont plus hydrophiles et qui peuvent être excrétés dans la bile sans être conjugués (Stoll et al., 1982; Fevery et al., 1989; Ostrow et al., 1994). Une transfusion d'échange doit être précédée si la photothérapie n'est pas réussie. Cependant, si le niveau de la bilirubine est très élevé (> 430 μ M), une photothérapie associée à une transfusion d'échange doivent être employées. Un autre type de traitement, la cholestyramine et le phosphate de calcium peuvent interrompre le cycle entérohépatique et diminuer ainsi la synthèse de bilirubine non conjuguée. Également, l'hème oxygénase pourrait être temporairement

inhibée par les mésoporphyrins (dérivés cristallins obtenus lors d'un processus de réduction), à l'origine d'une production diminuée de la bilirubine non conjuguée, rencontrée dans les cas d'ictère néonatal (Drummond and Kappas, 2004).

3.5.1.2. Syndrome de Gilbert et athérosclérose

La maladie de Gilbert est une affection fréquente et bénigne. Elle est caractérisée par une élévation légère du niveau de la bilirubine non conjuguée. Son incidence est estimée à 5-10% approximativement dans la population caucasienne et est plus courante chez les hommes que chez la femme (Shapiro, 2003). Cette maladie est associée à une réduction légère de l'activité de l'enzyme hépatique de conjugaison de la bilirubine, l'UGT1A1, d'où l'apparition d'une hyperbilirubinémie plasmatique non conjuguée modérée (niveau de bilirubine sérique entre 20 et 50 μ M) (Vitek et al., 2002) (Tableau 4). Dans les populations caucasiennes, le SG est lié à une mutation au niveau du promoteur du gène de l'UGT1A1. Les études effectuées sur la région codante de l'UGT1A1 ont identifié un locus majeur au niveau du télomère du chromosome 2q37 qui affecte la concentration de la bilirubine. Le promoteur de cet UGT contient un TATAA box avec 6 répétitions de dinucléotides TA. L'insertion d'un groupe TA supplémentaire au niveau du TATAA box engendre un allèle désigné par UGT1A1*28 qui provoque une diminution de la transcription de ce gène. Cette mutation entraîne un abaissement de 70 % de l'activité de l'UGT1A1 (Bosma, 2003) et en conséquence un niveau élevé de bilirubine non conjuguée (tableau 4). En outre, une association significative entre UGT1A1*28 et les événements de MCV a été établie par Vitek et al. : une étude prospective montre une incidence significative de trois ans limitant les événements de MCV chez les individus porteurs du SG (Vitek et al., 2002). Cependant, des travaux récents réalisés par Lin et al montrent que les individus homozygotes pour UGT1A1*28 (génotype 7/7) marquent une élévation du sérum de bilirubine comparé aux individus hétérozygotes porteurs de l'allèle 6 (génotype 6/7 ou 6/6) (Lin et al., 2006), ce qui explique la raison pour laquelle les manifestations cliniques ne sont pas exprimées chez tous les sujets porteurs de cette maladie. Seulement 12 à 16 % des Caucasiens porteurs du SG montrent un phénotype homozygote. Cependant, cette maladie bénigne reflète des effets bénéfiques basés sur la notion de Novotony et al en 2003 : « un niveau de bilirubine modérément élevé est associé à des effets athéro-protecteurs ». C'est plus évident dans le cas des MCV, dont la

prévalence est significativement réduite chez les individus porteurs du SG (Novotny and Vitek, 2003). Pour cela, les porteurs du SG sont généralement asymptomatiques de point de vue symptômes cliniques des MCV. Néanmoins, il se peut que les porteurs de cette maladie présentent des effets secondaires lors de l'emploi de drogues métabolisées par l'UGT1A1 (Bosma, 2003).

3.5.1.3. Maladie de Crigler-Najjar I et II

La maladie de CN est caractérisée par une élévation du taux de bilirubine sérique non conjuguée, habituellement $\geq 100\mu\text{M}$ et parfois de l'ordre de 150 à $400\mu\text{M}$. Cette maladie est appelée aussi hyperbilirubinémie non conjuguée non hémolytique héréditaire. C'est une affection exceptionnelle qui touche environ 1 enfant sur 1 000 000 et se manifeste dès la première heure de vie par un ictère intense à bilirubine non conjuguée. Elle est transmise par un mode autosomique récessif et est due à un déficit partiel ou total de l'activité de l'UGT1A1. Cliniquement, on distingue deux variétés de maladie de CN (type I et II) selon la sensibilité au traitement inducteur par le phénobarbital. Dans le cas de type I, ce traitement est inefficace, le déficit de l'activité de l'UGT1A1 est total et non inductible, par conséquent la conjugaison de la bilirubine est absente. Alors que dans le cas du type II qui est défini par un déficit partiel de l'activité de conjugaison de l'UGT1A1 (Sinaasappel and Jansen, 1991), le phénobarbital induit une décroissance rapide (30%) des concentrations de bilirubine plasmatique permettant à l'enfant une protection des complications neurologiques (Shapiro, 2003) (tableau 4). En effet, le phénobarbital est un traitement efficace et fiable chez les sujets atteints du type II. Les enfants devenus adultes, posent peu de problème car ce traitement de long est facilement supporté. Tandis que, le niveau de bilirubine non conjuguée chez les patients porteurs du type I est $\geq 340\mu\text{M}$, ils présentent dans leur bile des traces de bilirubine. Tandis que le type II montre de faibles quantités de bilirubine mono- et di-glucuronidée avec une proportion plus élevée de la mono- (Fevery et al., 1977) et dans ce cas, le niveau de bilirubine non conjuguée est compris entre 150 et $340\mu\text{M}$. La déficience de la glucuronidation de la bilirubine chez les CN est due à une mutation du gène de l'UGT1A1. Dernièrement, 50 différentes mutations ont été décrites (Kadacol et al., 2000). Plusieurs de ces mutations provoquent une substitution d'un seul acide aminé qui

pourrait inactiver complètement (type I) ou partiellement (type II) l'enzyme, d'autres mettent en lieu un codon-stop ou une troncature de protéine. La plupart des mutations du type II correspondent à une substitution d'un seul acide aminé. Les lésions génétiques s'impliquent au niveau des 5 exons de l'UGT1A1, pour les 2 types (Aono et al., 1993; Bosma et al., 1993; Labrune et al., 1994; Gantla et al., 1998; Kadakol et al., 2000).

A ce jour, le seul traitement radical de la maladie de CN-I est la transplantation hépatique, une photothérapie intensive supplémentaire pour plusieurs années pourrait être bénéfique jusqu'à l'adolescence. Après cet âge, la photothérapie devient moins efficace (Chalasanani et al., 1997). À l'opposé, les porteurs du type II doivent être maintenus sous photothérapie quotidienne (10 à 12 heures par jour), ce traitement n'arrête pas la maladie, juste prolonge la vie (Bosma, 2003).

3.5.2. Hyperbilirubinémies à prédominance conjuguée

Après avoir subi la réaction de conjugaison, les métabolites de la bilirubine sont excrétés dans la bile. Le transfert à partir des hépatocytes vers la bile se fait par l'intermédiaire du transporteur MRP-2 contre un gradient de concentration (Buchler et al., 1996). L'activité de ce transporteur est fortement altérée par des pathologies, on distingue les plus connues; le syndrome de Dubin-johnson et le syndrome de Rotor qui constituent les principales causes de la jaunisse. D'autres pathologies peuvent également être impliquées à l'ictère : l'obstruction des conduits biliaires causée par des calculs biliaires, des tumeurs, des hépatites virales ou par des maladies auto-immunes, etc.

3.5.2.1. Syndrome de Dubin-Johnson

Le syndrome de Dubin-Johnson est caractérisé par une élévation de bilirubine conjuguée en absence d'autres anomalies hépatiques, à un niveau allant de 50 à 85 μ M, mais qui peut atteindre les 385 μ M (Cohen et al., 1972). Il s'agit d'une transmission autosomique récessive rare et avec une fréquence génétique d'environ 1 pour 800 000. Le syndrome de Dubin-Johnson consiste à une sécrétion hépatobiliaire affaiblit de la bilirubine conjuguée, causée par une déficience de l'activité du transporteur MRP-2. Le gène codant pour MRP-2 est localisé sur le chromosome 10q24 (van Kuijck et al., 1997). Les mutations décrites pour ce gène, correspondent soit à un blocage de la synthèse d'une

protéine intacte active, soit à la synthèse d'une protéine non correctement dirigée du RE vers la membrane canaliculaire, soit à une production de protéine qui est correctement visée, mais inactive ou faiblement active (Wada et al., 1998; Toh et al., 1999; Tsujii et al., 1999; Hashimoto et al., 2002; Tate et al., 2002). Par conséquent, la bilirubine conjuguée ne pourrait pas être sécrétée dans la bile. Or, une protéine MRP-3 (ABCC3) est capable de transporter un grand nombre de substrats spécifique à MRP-2 (Konig et al., 1999). Dans des conditions normales, MRP-3 est exprimé modestement dans le foie, mais chez des patients atteints de Dubin-Johnson, son expression est augmentée. Elle se charge du transfert de la bilirubine conjuguée des hépatocytes vers la circulation sanguine, ensuite elle est éliminée par la sécrétion rénale. Toutefois, cela est moins efficace que l'élimination effectuée par les voies hépatobiliaires et les porteurs du Dubin-Johnson montrent ainsi une apparence jaune permanente. Cependant, la maladie à un excellent pronostic et la thérapie n'est pas nécessaire.

3.5.2.2. Syndrome de Rotor

Comparés au syndrome de Dubin-Johnson, les sujets porteurs du syndrome de Rotor expriment des taux élevés de bilirubine conjuguée et non-conjuguée (50 - 100 μ mol/L), tout en conservant une histologie normale du foie. Cette maladie est extrêmement rare. Les mutations génétiques propres à cette maladie ne sont pas encore élucidées. Cependant on a suggéré qu'elle pourrait être causée par une déficience de stockage et/ou d'absorption hépatique (Wolkoff et al., 1976; Wolpert et al., 1977).

Tableau 4 : Comparaison des niveaux de la bilirubine et de l'activité d'UGT1A1 (Bosma, 2003).

<i>STADE CLINIQUE</i>	<i>Normal</i>	<i>Gilbert</i>	<i>CN II</i>	<i>CN I</i>
Niveau de bilirubine circulante	$\leq 17.1\mu\text{M}$	17-50 μM	50-340 μM	340-700 μM
Bilirubine non-conjuguée	1-3%	2-12%	10-81%	100%
Bilirubine mono-glucuronidée	6-18%	25-32%	12-63%	0%
Bilirubine diglucuronidée	76-90%	59-82%	1-56%	0%
Activité hépatique d'UGT 1A1	100%	30-35%	<25%	0%

3.6. Effets protecteurs de la bilirubine

3.6.1. Bilirubine : Antioxydant puissant

Pendant longtemps, on regardait la bilirubine comme un produit nuisible à l'organisme, or de nombreuses études ont conféré aux produits du catabolisme de l'hème, notamment la bilirubine, des propriétés antioxydantes de protection cellulaire et tissulaire. On a mis en évidence que la bilirubine fonctionne comme un antioxydant, qu'elle soit liée ou libre (Stocker et al., 1987).

La formation des ROS survient à l'occasion de situations d'hypoxie ou d'hyperoxie qui induisent un stress cellulaire. C'est au cours du processus de la réduction du O_2 en H_2O_2 que se forment les intermédiaires incomplètement réduits de l'oxygène par transfert d'électrons. Ces ROS ainsi produits, sont responsables des effets négatifs d'oxydation réalisés sur un grand nombre de molécules : acides nucléiques, protéines, lipides, sucres, etc. Les ROS sont représentés par l'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que le radical hydroxyl ($\cdot OH$) qui est l'espèce la plus nuisible du stress oxydant. On parle de stress oxydant lorsque le potentiel des agents antioxydants n'est plus capable de maintenir l'homéostasie redox intracellulaire. Or, Stocker et al sont les premiers à avoir démontré le pouvoir antioxydant de la bilirubine (à des concentrations de l'ordre du micromolaire) contre les radicaux peroxylys (Stocker et al., 1987). En effet, la bilirubine compte parmi les principaux antioxydants du plasma et se distingue par un fort pouvoir antioxydant envers les radicaux hydroperoxyl ($RO_2^{\cdot-}$) et l'oxygène singulet (Stocker et al., 1987). Elle est capable de protéger les lipides membranaires contre l'oxydation pour une efficacité semblable à celle du α -tocophérol et de la β -carotène (Stocker et al., 1987). De même, elle s'est avérée de posséder d'autant de capacité antioxydante que celle de la vitamine E/ Trolox (Kapitulnik, 2004). D'autre part, la concentration de la bilirubine est assez remarquable dans le plasma mais insuffisante dans une cellule pour s'opposer au stress oxydatif, par contre 10nM de bilirubine est capable de protéger contre une concentration 10^5 fois plus élevée de H_2O_2 . En fait, ce pigment est regardé comme un facteur agissant de façon catalytique au cours d'un cycle redox. Au cours de ce cycle, la bilirubine est oxydée par les ROS en

biliverdine puis à nouveau réduite en bilirubine (Stocker, 2004). Cette interconversion entre bilirubine et biliverdine amplifie davantage le potentiel antioxydant, ceci explique la capacité des concentrations faibles de la bilirubine à surmonter des concentrations 10^5 fois plus élevées de ROS. Par conséquent, il y a une réduction des molécules réactives, les ROS en molécules non réactives. Également, ces propriétés antioxydantes de la bilirubine ont été prouvées à travers divers études *in vitro* et *in vivo*. De plus, la notion d'activité antioxydante de ce pigment biliaire, *in vivo*, a été confirmée par le fait qu'on a trouvé chez l'homme les métabolites oxydants de la bilirubine (les biotripyrrrins) (Mayer, 2000).

3.6.1.1. Biliverdine réductase : antioxydant indirect

La BVR qui catalyse la réduction de la biliverdine en bilirubine (qui est aussi un produit majeur oxydé de la bilirubine), se comporte également comme un antioxydant, mais d'une façon indirecte (Stocker, 2004).

3.6.1.2. HO-1 : antioxydant indirect

L'isoforme HO-1 est l'enzyme limitante de la dégradation de l'hème en bilirubine, sa surexpression établit également une activité antioxydante, dépendant en premier lieu des métabolites de l'hème libérés par l'enzyme ainsi que par des agents déclencheurs de stress oxydatif (Mayer, 2000). Ainsi, similairement à la BVR, un rôle indirect d'antioxydant a été conféré à HO-1. Cette notion a été nettement vérifiée : dans les cellules macrophagiques, la dégradation de l'hème par HO-1 empêche la maturation de la NADPH-oxydase (enzyme majeur de la production d'anion superoxyde), diminuant ainsi la production de $(O_2^{\bullet-})$ par l'enzyme (Taille et al., 2004). De même, l'activation de HO-1 qui consomme 3 moles de O_2 lors du catabolisme d'une molécule d'hème, permet une importante diminution de la survenue des ROS (Katori et al., 2002).

Autre que BVR et HO-1, le rôle d'antioxydant indirect a été aussi conféré à un autre métabolite de l'hème, le CO. En outre, on a prouvé que ces 3 métabolites expriment également des propriétés anti-athéromateuses. Il est ainsi difficile de séparer l'importance de chaque composante dans la protection vasculaire, notamment lors d'une étude clinique du type end point (Mayer, 2000; Maines and Panahian, 2001).

3.6.2. Bilirubine : protection cardiovasculaire

Une grande attention a été portée les 15 dernières années sur les substances antioxydantes qui pourraient prévenir les cardiopathies et les maladies connexes. De nombreuses études rétrospectives et prospectives ont démontré l'effet athéro-protecteur de la bilirubine : en plus des propriétés antioxydantes (Stocker and Keaney, 2004), cette molécule exprime aussi des propriétés anti-inflammatoires (Willis et al., 1996) et anti-athéromateuses (Wu et al., 1996). En effet, plusieurs études ont établi l'existence d'une corrélation positive entre le niveau plasmatique de la bilirubine et celui de HDL (Nakagami et al., 1993), ainsi que celui du statut antioxydant total (Vitek et al., 2002) et une corrélation négative entre le niveau de bilirubine et celui de LDL, de VLDL, de TG, de la protéine C réactive, de la pression artérielle systolique, de l'HTA et des antécédents familiaux (Madhavan et al., 1997a). De même, on établit, l'existence d'une relation inverse entre le niveau sérique de la bilirubine et les risques de maladies coronaires (Schwertner et al., 1994). Également, on a démontré qu'un niveau modérément élevé de bilirubine diminue les risques familiaux précoces de MCV (Hopkins et al., 1996). Tandis qu'un niveau faible de bilirubine est associé à une réduction de l'élasticité aortique et à une élévation de l'excrétion urinaire de biopyrrin, substance reconnue comme un marqueur de stress oxydative (Vitek et al., 2007); ainsi qu'à une plus grande prévalence de risques cardiovasculaires *in vivo* (Breimer et al., 1995), à une plus grande fréquence de CHD (Hunt et al., 2001) et à des propriétés anti-apoptiques et anti-inflammatoires (Nakagami et al., 1993; Willis et al., 1996). Finalement, une concentration élevée de bilirubine s'est avérée d'avoir une capacité protectrice égale à celle de HDL chez les individus souffrant de maladies coronariennes (Novotny and Vitek, 2003).

En plus, une méta-analyse d'études épidémiologiques basées sur l'observation a révélé l'existence d'une relation inverse entre la concentration plasmatique de bilirubine et l'athérosclérose (coefficient de la corrélation $r = -0.31$; $P < 0,0001$; régression non paramétrique $r^2 = 0,34$) (Figure 11) : un niveau modérément élevé de bilirubine est un facteur protecteur contre l'athérosclérose et les cardiopathies coronariennes (Djousse et al., 2001; Novotny and Vitek, 2003); chaque augmentation de $1.0\mu\text{m}$

ol/L du niveau plasmatique de bilirubine est associée à une diminution de 6,5% de risque de MCV (Madhavan et al., 1997b). Notons que la valeur limitante pour un risque cardiovasculaire est de 10 μ M (Figure 11). En effet, le potentiel antioxydant de la bilirubine, déjà décrit, lui confie cette propriété athéro-protectrice : elle inhibe l'oxydation des LDL et d'autres lipides (Neuzil and Stocker, 1994; Wu et al., 1996), ainsi que l'action du stress oxydatif sur les CML et les cellules endothéliales (Kapitulnik, 2004), elle accroît aussi l'état antioxydant du sérum physiologique (Vitek et al., 2002). Ceci a été observé aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* lors d'études animales : la bilirubine restaure la fonction myocardique et minimise la taille de l'infarctus et des lésions mitochondriales chez le rat (Kapitulnik, 2004). D'autres études ont révélé que la bilirubine inhibe l'expression des gènes de molécules d'adhésion (des cellules endothéliales) NF-kB ou TNF α inductibles de VCAM-1, E-sélectine et des facteurs cellulaires pro-athérogènes (Soares et al., 2004). De même, elle inhibe l'activité de la protéine kinase C (un marqueur biologique de risque de MCV) (Amit and Boneh, 1993) qui peut inactiver une variété de facteurs pro-athérogéniques responsables de déclenchement des réactions immunitaires (Nakagami et al., 1993) et des processus inflammatoires (Willis et al., 1996). Aussi, la réponse chimioattractrice des monocytes, qui initie leur migration vers l'intima, peut être inhibée par la bilirubine (Morita et al., 2003; Keshavan et al., 2005). Lindenblatt et al. (2004) ont également découvert un retard dans la formation du thrombus sous l'influence de ce pigment biliaire (Lindenblatt et al., 2004).

D'autre part, une substance, la HDL s'est avérée protectrice des MCV, or, d'après l'ensemble de ces études, on pourrait considérer la bilirubine comme une autre molécule endogène ayant un rôle pharmacologique protecteur : elle se distingue simultanément par des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et ainsi anti-athéromateuses.

3.6.2.1. Propriétés athéroprotectrices de HO-1

Également, on a démontré dans la littérature, plusieurs effets athéroprotecteurs de l'enzyme HO-1, par contre il faut mentionner que ces effets passent par les propriétés antioxydantes de la bilirubine et ne sont pas directement sous la dépendance de HO-1. Cependant, si l'expression de HO-1 est inexistante, il y aura absence de formation de

bilirubine et par conséquent des dommages cellulaires considérables seront développés (causés par les ROS) particulièrement lorsque l'antioxydant primaire, le glutathion est épuisé. D'autre part, des travaux, basés sur cet effet protecteur de HO-1 contre les lésions oxydatives, montrent qu'une sur-régulation de cette enzyme par différents inducteurs diminue la sévérité de l'athérosclérose chez des lapins hyperlipidémiques et diminue le niveau de LDL chez des souris *knock-out*, tandis qu'une inhibition de l'expression de HO-1 élève la prévalence athéroscléreuse (Ishikawa et al., 2001a; Ishikawa et al., 2001b). Aussi, une surexpression de HO-1 est capable de diminuer l'épaississement des artères vasculaires lors de resténose (Duckers 2001).

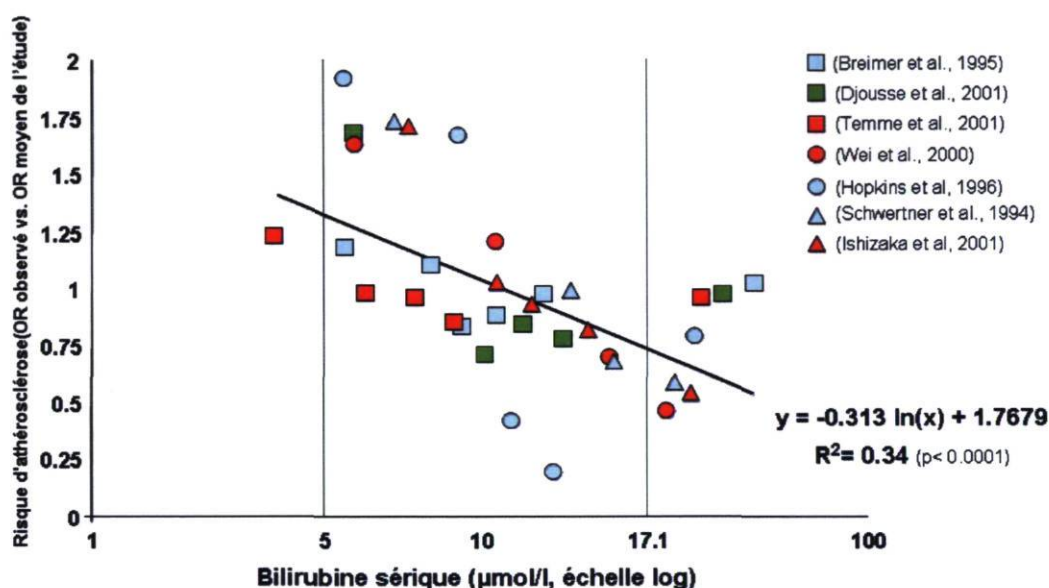


Figure 11: Relation inverse entre le niveau sérique de la bilirubine et l'athérosclérose (Novotny and Vitek, 2003).

4. Hypolipémiants : traitement des dyslipidémies

La prise en charge d'un patient dyslipidémique se traduit par la correction de l'ensemble des FR. L'objectif est de retarder l'apparition (prévention primaire) ou les récurrences (prévention secondaire) des complications cliniques de l'athérosclérose. Toute personne ayant un taux de LDL > 1,6g/l (4,1mmol/L) ou au moins un FR cardiovasculaire, doit subir une prise en charge diététique visant un mode vie sain : une activité physique et une alimentation saine (Zimmet and Thomas, 2003). Dans le cadre de ce mémoire, nous focaliserons notre attention sur les stratégies thérapeutiques et notamment sur l'utilisation des fibrates, qui constituent le centre d'intérêt de nos travaux.

Traitement médical : Médicaments hypocholestérolémiants

La réduction de ces dyslipidémies est une cible prioritaire dans la prévention des MCV. Les stratégies pharmaceutiques hypolipémiantes impliquent cinq types de médicaments qui permettent tous une amélioration du profil lipidique. En clinique, les molécules majoritairement prescrites pour réduire les risques de MCV sont les dérivés de l'acide fibrique (i.e. fibrates), les inhibiteurs de la HMG-CoA-réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase) (i.e. les statines), les inhibiteurs de l'absorption intestinale de cholestérol (i.e. l'ézétimibe), les séquestrants des acides biliaires et les acides nicotiques ou niacine. Par ailleurs, l'avènement de la pharmacologie moléculaire a permis d'identifier de nouvelles molécules ayant un potentiel thérapeutique important. Il s'agit notamment des activateurs du récepteur nucléaire Liver-X-Receptor (LXR) α . Dans le cadre de ce projet de recherche, une attention particulière est portée sur les fibrates.

4.1. Statines

Les statines (simvastatine, pravastatine, fluvastatine, etc.) sont les médicaments les plus couramment utilisés en clinique dans le traitement des dyslipidémies et sont bien tolérés. Ils constituent les hypocholestérolémiants les plus puissants (Schieffer and Drexler, 2003) par le biais d'une inhibition compétitive et sélective de l'activité de l'HMG-CoA-réductase impliqué dans la biosynthèse hépatique du cholestérol (Endo, 1992). Cette inhibition résulte en une diminution de la synthèse endogène de cholestérol, suivie par

une régulation à la hausse des récepteurs de LDL et ainsi une diminution de la concentration plasmatique de LDL d'environ 35%, en prévention primaire ou secondaire des accidents ischémiques cardiaques (Mol and Stalenhoef, 1993). En outre, les statines induisent une réduction modérée et significative des triglycérides (de 10 à 15 %), à la différence des fibrates qui permettent une diminution plus remarquable (de 30 à 45 %). Par ailleurs, les statines induisent faiblement le taux des HDL (5%), contrairement aux fibrates qui soulignent une induction de 15 à 20 %. D'autre part, des expérimentations ont révélé aussi que les statines expriment des propriétés anti-inflammatoires en réduisant l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Weber et al., 1997), et qu'un traitement aux statines diminue les niveaux de CRP (Gupta, 2004) et induit des effets anti-thrombotiques (Schieffer and Drexler, 2003). Finalement, les statines possèdent des effets pléiotropiques tels que vasodilatation, anti-thrombose, anti-prolifération, anti-inflammatoire, et la stabilisation de la plaque (Rosenson and Tangney, 1998).

4.2. Acide nicotinique ou niacine

L'acide nicotinique ou niacine, a été associé à des événements cardiovasculaires depuis les années 1950 (Altschul et al., 1955). C'est une médication qui s'est avérée importante dans le traitement des hyperlipidémies grâce à sa capacité d'agir sur toutes les composantes du profil lipidique. Malgré ses effets secondaires non négligeables (bouffées de chaleur, prurit et diarrhées), la niacine a été couramment employée, grâce à son puissant effet dans l'induction des niveaux de HDL. La niacine, administrée à une dose de 1 à 2g/j, abaisse les niveaux de TG et celle de LDL de 15% et marque la plus importante augmentation de taux de HDL (17 à 26%) parmi tous les types de traitements disponibles (NCEP, 2001). De plus, la niacine réduit la synthèse hépatique des TG (20 à 50%) (Knopp et al., 1985). Par ailleurs, la niacine est la seule molécule normolipémiante qui diminue le taux plasmatique de la lp(a) de 25 à 35% (Niaspan®LP, 2006).

4.3. Ézétimibe

L'ézétimibe (Ézetrol®) est un inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol et constitue une nouvelle famille d'hypolipémiants employé en monothérapie ou en association avec une statine. Cette molécule a été mise sur le marché en 2004 avec 3

indications : administrée en monothérapie ou en association avec une statine pour traitements d'hypercholestérolémies primaires et d'HF homozygote. L'ézétimibe bloque de façon sélective l'absorption intestinale du cholestérol total et des phytostérols apparentés, il agit en réduisant le transport du cholestérol à la fois alimentaire et biliaire à travers la barrière intestinale (Farnier, 2002). D'autre part, des études ont montré l'efficacité de la combinaison de l'ézétimibe à l'emploi de la lovastatine, la simvastatine et l'atorvastatine chez des patients ayant une hypercholestérolémie primaire (Gagne et al., 2002a; Gagne et al., 2002b). Ce médicament serait donc particulièrement intéressant chez les patients qui ont une intolérance aux statines. Enfin, il a été aussi observé une diminution significative du niveau de TG de 7 à 10 % et une augmentation de 1,4 à 4,5 % du niveau de HDL, lors d'une association de l'ézétimibe à la pravastatine.

4.4. Séquestrants des acides biliaires ou résines

Les séquestrants des acides biliaires ou résines (telle que la cholestyramine), combinées à un régime alimentaire pauvre en cholestérol, inhibent la réabsorption des acides biliaires, favorisent l'élimination fécale du cholestérol et amplifient la clairance des LDL. De plus, le taux hépatique d'apo B est réduit suite à la diminution de la disponibilité du cholestérol et une induction de l'activité de l'HMG-CoA réductase est soulignée (Huff et al., 2002). Les doses maximales de résines indiquent une réduction des taux de LDL de 20%, cependant les concentrations en HDL ne sont pas modulées. Ce type de traitement est non toléré en monothérapie des hyperlipidémies mixtes et exprime des effets secondaires limitant leur utilisation : troubles gastro-intestinaux. Enfin, les résines causent une élévation de la triglycéridémie (10%) chez les normotriglycéridémiques.

4.5. Fibrates

4.5.1. Définition, Découverte et Structure

Définition

Les dérivés fibriques sont considérés comme un traitement de seconde intention des hypercholestérolémies pures parce que leur efficacité sur l'abaissement du niveau des LDL est inférieure à celle des statines. Les fibrates, approuvés par la FDA (Food and

Drug administration), sont des activateurs du récepteur nucléaire PPAR α (Peroxisome Prolifator Activating Receptor- α) qui régule la transcription de gène impliqués dans le métabolisme de TG et de HDLs. Brièvement, ils permettent un effet bénéfique, en augmentant les taux de HDL et en diminuant significativement les taux de cholestérol total et de LDL ainsi que celui des TG chez les patients dyslipidémiques. Aussi ils expriment des effets pléiotropes et réduisent l'inflammation vasculaire. Les fibrates partagent avec les statines les mêmes complications secondaires : musculaires et hépatiques.

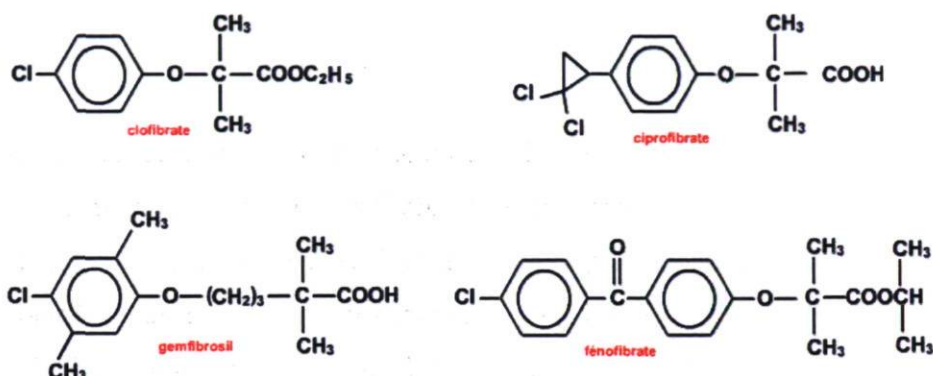


Figure 12 : Structures chimiques des fibrates (Etgen and Mantlo, 2003).

Découverte et structure

Leur découverte a été faite en 1963 grâce à un « heureux hasard » : l'acide chlorophénoxy-isobutyrique ou le clofibrate (Astromid-S[®]) qui est un des composants de l'excipient de l'Astromid présentant des effets hypocholestérolémiants. C'est un liquide légèrement jaunâtre, insoluble dans l'eau, par contre soluble dans l'alcool et administré selon une posologie de 2g/jour (Turpin et al., 1998). Depuis ce temps, de nombreux autres dérivés d'acides fibriques ont été élaborés et commercialisés sous le nom de «fibrates» avec des propriétés hypolipémiantes légèrement différentes (Figure 12, et Tableau 5). Le fibrate suivant, largement utilisé, est le gemfibrozil (Lopid[®]), suivi par le bézafibrate (Bezalip[®]) et le fénofibrate (Lipidil[®]). Deux autres, à utilisation clinique limitée, ont été aussi mis sur le marché : l'étofibrate et le ciprofibrate (Liponor[®]) (Turpin et al., 1998). Depuis, l'avènement du fénofibrate en 1975, les fibrates sont devenus plus utilisés, notamment, ce dernier ainsi que le gemfibrozil. Le clofibrate est le seul composé parmi les fibrates à avoir une activité antidiurétique qui pourrait être efficace

dans le traitement du diabète, or ce médicament n'est plus prescrit parce qu'il exprime des propriétés hypocholestérolémiantes modestes (Turpin et al., 1998).

De point de vue pharmacocinétique, les fibrates (Turpin et al., 1998) ont une absorption intestinale complète permettant une grande biodisponibilité. Ils circulent sous 2 formes : une forme libre physiologiquement active et une forme liée aux protéines (plus de 90 % sont liés à l'albumine : sont efficaces par eux-mêmes (bézafibrate) ou par leurs métabolites (acide fénofibrique dans le cas du fénofibrate et une forme glucuronocconjuguée dans le cas du ciprofibrate et du gemfibrozil). Ils sont surtout éliminés par voie rénale (Tableau 5), d'où une grande attention à considérer en cas d'insuffisance rénale. Les fibrates peuvent être utilisés en monothérapie ou en combinaison avec les statines. Par contre en combinaison, il faut mentionner que ces deux médicaments sont à l'origine de nombreux effets indésirables.

Tableau 5 : Posologies et propriétés pharmacocinétiques communes des fibrates (Turpin and Bruckert, 1999).

<i>Fibrates</i>	<i>Demi-vie*</i>	<i>Élimination</i>	<i>Posologie [mg/j] et nom commercial</i>
Clofibrate	12 heures	Rénale	1500mg Atromid-S®
Fénofibarte	7 heures	Rénale	145mg Lipidil®
Bézafibarte	2 heures	Rénale	400mg Bezalip®
Ciprofibrate	17 heures	Rénale	300mg Lipanor®
Gemfibrozil	12 heures	Rénale (75%)	900mg Lopid®

***Demi-vie d'élimination**

4.5.2. Effet pharmacologique des fibrates.

En général l'effet majeur des fibrates est une réduction triglycéridique de 30 à 50%, accompagnée d'une élévation du niveau de HDL de 5 à 6%. L'ampleur de leur effet est reliée à la sévérité de l'anomalie des lipoprotéines (Frick et al., 1987; ErratumPublished, 2001). Les fibrates peuvent aussi réduire les taux de LDL, mais leur effet est variable d'un dérivé à un autre, tel que le gemfibrozil ne réduit pas le niveau des LDL, tandis que le bézafibrate et le fénofibrate sont associés à une réduction de l'ordre de 10 à 20% dépendamment de l'anomalie des lipoprotéines. De plus, un traitement au gemfibrozil chez des individus exprimant un niveau très élevé de lipoprotéines riches en TG pourrait jouer un rôle négatif et induire le taux de LDL. Bien que l'effet quantitatif des fibrates

soit variable sur les LDL, ils sont capables de moduler cette population de lipoprotéine de façon à agrandir leur taille, ce qui les rendent moins athérogènes (Chapman, 2003). Enfin, le gemfibrozil est capable de réduire le risque coronaire chez les sujets à faible niveau de HDL et le fénofibrate ralentit la progression de l'athérome chez les diabétiques (DAIS, 2001). En outre, des études récentes ont montré que les fibrates exercent des effets pléiotropes : anti-inflammatoires (notamment sur la paroi des vaisseaux), diminuent la synthèse de facteurs pro-thrombotiques et vasoconstricteurs, limitant ainsi le développement de l'athérosclérose (Delerive et al., 1999; Kleemann et al., 2003).

En général, les fibrates sont surtout recommandés dans les traitements des hypertriglycéridémies pures (types IV et V) et des hyperlipidémies mixtes (type IIb et type III). Ces agonistes de PPAR α , en activant ce dernier, exercent des mécanismes d'action complexes avec des modifications bénéfiques du métabolisme lipidique.

Diminution de l'hypertriglycéridémie

Les fibrates, en activant PPAR α , stimulent les enzymes responsables de la β -oxydation lysosomiale et mitochondriale des acides gras par le foie. Il y a ainsi élévation du catabolisme hépatique des acides gras. Ceci aboutit à une diminution de la synthèse hépatique des acides gras qui sont essentiels pour la formation des TG des VLDL, et dont la sécrétion sera réduite (Schoonjans et al., 1996b). Également, PPAR α activé, stimule l'expression du gène de la lipoprotéine lipase (LPL) (Schoonjans et al., 1996a). Le fait qui augmente le catabolisme intra-vasculaire des chylomicrons, des TG et des VLDL, et donc leur hydrolyse ainsi que leur clairance dans l'intention de réduire la triglycéridémie (Staels et al., 1998). De plus, l'activation de PPAR α diminue indirectement la synthèse d'apoC-III (Staels et al., 1998), par l'intermédiaire d'un site C3P interagissant avec plusieurs récepteurs nucléaires (HNF-4, ARP-1, RXR, etc.) (Haubenwallner et al., 1995; Hertz et al., 1995; Staels et al., 1995). En effet, l'apoC-III est localisée à la surface des particules de VLDL (riches en TG) et constitue un inhibiteur naturel de l'action de la LPL (van Dijk et al., 2004). Cette réduction du niveau d'apoC-III, augmente encore plus l'inhibition de l'activité de la LPL et donc l'hydrolyse des particules circulantes riches en TG afin de réduire leur production ainsi que la triglycéridémie (il a été observé que la synthèse d'apo-CIII est très importante chez les

hypertriglycéridémiques (Cohn et al., 2004)). Récemment, on a aussi démontré que PPAR α activé, augmente l'expression du gène apoA-V dont la surexpression est une voie de réduction des TG (Vu-Dac et al., 2003; van Dijk et al., 2004).

Augmentation du HDL

Les fibrates stimulent la production des taux de HDL (de 10 à 15%) par une induction transcriptionnelle de la synthèse des apoA-I et apoA-II (Fruchart, 2001). De plus, il a été démontré que l'élévation de l'expression d'apoA-I est dépendante de la capacité du fibrate administré à activer PPAR α (Berthou et al., 1996). Par exemple, le fénofibrate et le gemfibrozil activent PPAR α d'une grande efficacité et d'une efficacité moindre respectivement (Staels, 2003). D'autre part, la diminution de la triglycéridémie induite par les fibrates réduit les échanges de VLDL-TG contre les esters de cholestérol des HDL. Ces échanges sont sous la dépendance d'une protéine de transfert de lipides, la CETP (cholesteryl ester transfer protein), située à la surface des HDL. De ce fait, plus les concentrations des VLDL-TG sont faibles, plus les HDL s'enrichissent en esters de cholestérol et plus leurs concentrations plasmatiques augmentent. Aussi les fibrates favorisent le transport inverse du cholestérol à l'aide d'une stimulation de l'expression de deux récepteurs cellulaires, l'Adénosine Triphosphate-Binding Cassette-1(ABC-A1) et le récepteur éboueur (ou *scavenger récepteur*) SR-BI/CLA-1 (Chinetti et al., 2001). Ces 2 récepteurs sont impliqués dans l'élimination du cholestérol excédentaire dans les macrophages grâce à sa capture par les HDL et ainsi sa sortie des cellules. De plus, SRB-I/CLA-I est aussi exprimé dans le foie, où il permet aux HDL de se fixer sur la membrane des hépatocytes et de leur transférer des esters de cholestérols. Ce cholestérol sera ensuite recyclé et éliminé de l'organisme.

Donc les fibrates favorisent l'efflux du cholestérol cellulaire (des tissus périphériques vers le foie) qui est la première étape du transport inverse du cholestérol, tout en évitant les dépôts de cholestérol dans la paroi artérielle, la transformation des macrophages en cellules spumeuses et la formation de plaques athéroscléreuse.

Réduction des niveaux plasmatiques des LDL petites et denses

Les hypertriglycéridémies sont souvent associés à des niveaux plasmatiques élevés de LDL petites et denses qui sont plus athérogènes que les LDL de grande taille, du fait qu'elles s'infiltrant et s'oxydent plus facilement dans l'endothélium vasculaire.

Cette même diminution de triglycéridémie induite par les fibrates (précédemment décrite pour les VLDL et les HDL), limite les échanges des TG des VLDL contre les esters de cholestérol des LDL, qui sont également sous la dépendance de la CETP. De même, l'intensité des échanges lipidiques est influencée par : d'autant les niveaux des VLDL-TG sont faibles, que les LDL s'enrichissent en esters de cholestérol et s'appauvrissent en TG et subissent ainsi une action limitée de la lipase hépatique. Par conséquent, il y a une réduction de la densité et de la proportion des LDL de petite taille au profit des LDL de grande taille. Ces derniers sont moins athérogènes parce qu'elles pénètrent plus difficilement dans l'endothélium vasculaire et s'y oxydent moins facilement. En plus, elles sont mieux reconnues par les récepteurs des LDL (B et E), et subissent ainsi, une élimination rapide au niveau hépatique (Malmendier and Delcroix, 1985).

Effets pléiotropes des fibrates

PPAR α , activé par les fibrates, inhibe l'action de plusieurs facteurs nucléaires, dont NF-kB et AP-I (Devine et al., 2002) impliqués dans l'activation de la synthèse de nombreuses protéines pro-inflammatoires : IL6, ICAM, COX2, etc. (Elias and Innis, 2002) réduisant ainsi leur sécrétion et l'inflammation vasculaire. Également, l'activation de PPAR α diminue l'expression des protéines d'adhésion VCAM-I, situées à la surface des cellules endothéliales, par conséquent, il y aura un abaissement de recrutement de monocytes dans la paroi artérielle. PPAR α activé, diminue aussi la sécrétion d'un facteur vasoconstricteur (l'endothéline) par les cellules endothéliales (Fremann et al., 2002), et d'un facteur de la coagulation (le facteur tissulaire) par les macrophages (Gretebeck et al., 2002). Finalement, certains fibrates comme le fénofibrate, diminuent la synthèse hépatique du fibrinogène (qui affecte la coagulation sanguine et l'agrégation plaquettaire) et donc ses concentrations sanguines (Holt et al., 2002).

4.5.3. Mode d'action des fibrates : Activation de PPAR α

Le mode d'action primaire des fibrates est l'activation du récepteur nucléaire PPAR α , responsable de la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des TG et de HDL au niveau hépatique.

4.5.3.1. PPAR α

4.5.3.1.1. Rappel sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des récepteurs intracellulaires formant une large famille composée de plus de 150 protéines différentes. Ils sont présents dans de nombreuses espèces, y compris chez les vertébrés (Maglich et al., 2001; Robinson-Rechavi et al., 2001). La plupart des récepteurs nucléaires fonctionnent comme des facteurs de transcription activés par des ligands lipophiles tels que les hormones thyroïdiennes, l'acide rétinoïque, les acides gras et les prostaglandines, etc. Cependant, les autres n'ont pas de ligands identifiés, sont nommés récepteurs orphelins (Enmark and Gustafsson, 2001). La fixation des ligands aux récepteurs permet un changement de la conformation de ces récepteurs (repliement de l'hélice H12) qui forment ainsi des complexes actifs avec d'autres constituants de la machinerie transcriptionnelle. Ces récepteurs nucléaires ont la capacité de transloquer du cytoplasme dans le noyau pour moduler l'activité transcriptionnelle de gènes cibles en se fixant sur des régions spécifiques de l'ADN, qui correspondent à des éléments de réponse (au récepteur nucléaire concerné), situés dans la région promotrice. Grâce à la fixation de ligands spécifiques qui modulent leur activité, ces récepteurs offrent ainsi la possibilité de contrôler l'expression de gènes cibles, dans l'intention de contrôler de grandes fonctions comme la différenciation cellulaire ou l'homéostasie.

Les récepteurs nucléaires sont des protéines de tailles variables entre 40 et 100 KDa. Ils sont divisés en 6 domaines : A, B, C, D, E, F (Figure 13). La partie N-terminale comprenant les domaines A et B ainsi qu'une partie fonctionnelle transactivatrice AF-1 (indépendante des ligands), est impliquée dans l'interaction avec différents coactivateurs et corépresseurs. Le domaine C, le plus conservé au sein du groupe, assure la liaison à l'ADN (le *DNA binding domain*), ce domaine est considéré comme la «signature» de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le domaine D est une charnière possédant un rôle conformationnel. Tandis que, la partie C-terminale comprend les domaines E et F, sièges du site de liaison avec les ligands (le *ligand binding domain*) et d'une interaction avec un régulateur transcriptionnel AF-2 (région transactivatrice dépendante des ligands) (Escher and Wahli, 2000).

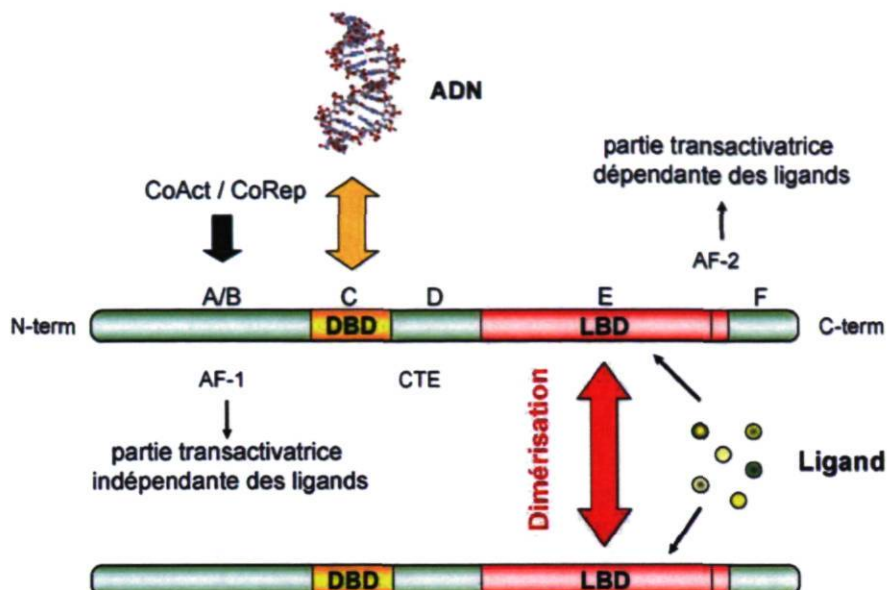


Figure 13 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires ont une structure divisée en 6 domaines (A à F) supportant des fonctions différentes (Olefsky, 2001). DBD : DNA binding domain; LBD : ligand binding domain.

Selon une classification établie en 1999, ces récepteurs nucléaires ont été classés en 4 groupes en fonction de la dimérisation (hétérodimère, monomère ou homodimère) et des séquences d'ADN reconnues (Olefsky, 2001). Une première classe comprend les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (récepteur des estrogènes, des glucocorticoïdes et des androgènes). L'interaction de ces récepteurs est sous forme d'homodimère à de courtes séquences d'ADN inversées (appelée séquence palindromique).

La 2^{ème} classe est divisée en sous-groupes distincts : récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes, à l'acide rétinoïque et à la vitamine D et les récepteurs activés par les proliférateurs des péroxysomes (PPAR) ainsi que le récepteur aux oxystérols (LXR ou Liver X Receptor) activés par des dérivés oxydés du cholestérol (Kliwer et al., 1992). Ces récepteurs se lient à l'ADN sous forme d'un hétérodimère, avec le récepteur X aux rétinoïdes ou RXR (retinoid X receptor). La séquence d'ADN reconnue par ces récepteurs consiste en une répétition directe de la séquence AGGTCA séparée par un nombre variable (jusqu'à 5) de nucléotides. Ce nombre de nucléotides détermine partiellement la spécificité de reconnaissance du récepteur. Une 3^{ème} classe est celle des

récepteurs homodimériques : le récepteur RXR et certains récepteurs orphelins se lient à des séquences d'ADN directement répétées (correspondent à doubles séquences hexaséquences (AGGTCA) de même sens, séparés par un (DR1) nucléotide. Enfin, la 4^{ème} classe comprend des récepteurs monomériques : certains récepteurs orphelins, comme le récepteur NGFI-B qui se lie à des séquences simples (TCAAGGTCA) (Mangelsdorf et al., 1995).

4.5.3.1.2. La famille des PPARs : PPAR α , PPAR γ , PPAR δ

Les PPARs, identifiés comme des récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs des peroxyosomes (ADA, 2002), jouent un rôle central dans la régulation du stockage et du catabolisme des acides gras. Il existe 3 types de PPARs, codés par 3 gènes différents et désignés par les nominations suivantes : PPAR α (NR1C1), PPAR γ (NR1C3) et PPAR δ (NR1C2) (Ayoob et al., 2002). Ils partagent une organisation structurale commune entre eux avec une homologie assez importante (Figure 14). Le premier récepteur identifié était le PPAR α murin en 1990 (Issemann and Green, 1990). Les séquences des domaines de liaison à l'ADN (DBD) sont très conservées entre les 3 sous-types alors que celles des sites de liaison des ligands (LBD) montrent une similitude moindre, indiquant que chaque sous-type présente des caractéristiques spécifiques. Les PPARs se distinguent par leur implication dans de nombreux processus physiologiques hépatiques : modulation du métabolisme lipidique, effets pléiotropes et anti-inflammatoires, différenciation et le cycle cellulaire (Barbier et al., 2002).

PPAR α	Nter	DBD		LBD
PPAR γ	Nter	83%		68%
PPAR δ	Nter	83%		70%

Figure 14 : Homologies entre les trois sous-types de PPARs.

Domaines fonctionnels des PPARs : Nter, région N-terminale; DBD, domaine de liaison à l'ADN; LBD, domaine de liaison du ligand. % pourcentage d'homologie entre les 3 types de PPARs humain (référence : PPAR α = 100 %).

Expression hépatique et distribution cellulaire des PPARs

PPAR α est essentiellement exprimé dans le foie dont il est sa principale source cellulaire (Auboef et al., 1997). Il est également exprimé dans les cellules de la paroi vasculaire

(cellules endothéliales), dans la bile, le rein et les muscles (Miyahara et al., 2000; Hoekstra et al., 2005). Son niveau d'expression hépatique est variable d'un individu à un autre et dépend également du sexe et de l'espèce étudiée (Tugwood et al., 1998; Jalouli et al., 2003). Quant à PPAR γ , il est surtout exprimé dans les cellules de Kupffer, ainsi que dans les hépatocytes et les cellules endothéliales (Tugwood et al., 1998; Miyahara et al., 2000; Peters et al., 2000; Hoekstra et al., 2003). Finalement, PPAR γ est exprimé par les hépatocytes, les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer (Hellemans et al., 2003; Hoekstra et al., 2003; Hoekstra et al., 2005).

L'avènement de nouveaux ligands, activateurs des PPARs, ont fait de ces récepteurs nucléaires, des cibles thérapeutiques potentielles en hépatologie, depuis plusieurs années (Barbier et al., 2002).

4.5.3.1.3. Ligands des 3 isoformes

Les fibrates sont utilisés depuis plus de 20 ans dans le cadre des anomalies du métabolisme lipidique et la prévention des complications cardiovasculaires. Généralement, les acides gras et leurs dérivés sont des ligands naturels des PPARs. Concernant PPAR γ , les molécules de la classe des thiazolinedinédiones ou glitazones (pioglitazone, rosiglitazone) sont les principaux agonistes synthétiques de ce PPAR chez l'homme. Tandis que, les dérivés des prostaglandines J2 et les acides gras polyinsaturés ω 3 ont été décrits comme les principaux ligands naturels de PPAR γ mais leur capacité physiologique, *in vivo*, n'est pas encore validée. Un autre acide gras, l'acide nitrolinoléique, a été également identifié comme un puissant agoniste endogène naturel de ce PPAR et agit en un effet physiologique selon des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Schopfer et al., 2005). Quant à PPAR δ , ni la fonction, ni les gènes régulés par ce récepteur ne sont actuellement connus. Cependant, certaines données suggèrent que des longues chaînes d'acides gras pourraient être des ligands activateurs de ce PPAR. Finalement, plusieurs ligands naturels sont impliqués dans l'activation de PPAR α , comme les acides gras saturés et polyinsaturés (acide arachidonique, prostaglandine E2, leucotriène B4, acide linoléique/oléique, acide stéarique, acide palmitoléique/palmitique). Les acides palmitique, oléique, linoléique et arachidonique sont en particulier des activateurs endogènes du PPAR α chez le rat (Borghini et al., 2002). Parmi les 3 types de PPARs, seul PPAR α est activé par les acides gras. Ces acides gras

se lie au PPAR α selon une constante d'affinité de l'ordre du micromolaire. Or les concentrations intracellulaires de ces derniers ne semblent pas être suffisantes pour activer ce PPAR. À ce jour, aucun ligand naturel endogène n'a été encore nettement identifié. D'autre part, concernant les ligands synthétiques, le Wy-14643 et les fibrates (le ciprofibrate, le gemfibrozil, le fénofibrate, le bézafibrate et clofibrate) et les glitazones constituent une classe d'hypocholestérolémiants prépondérante dans l'activation des PPAR α et γ , respectivement (Willson and Wahli, 1997). Le tableau 6 présente les paramètres pharmacologiques de ces molécules en action avec les PPARs humains. Le clofibrate et le fénofibrate se lie à PPAR α et γ mais sont 10 fois plus spécifiques à PPAR α , alors que le bézafibrate active les 3 types de PPARs avec la même efficacité (tableau 6). Ces agents doivent être de l'ordre de micromole pour pouvoir activer le PPAR α humain, ce qui explique les posologies employées en clinique (300-1200mg/jour). Enfin, il a été prouvé que les uréidofibrates (nouvelles molécules) se lie aux PPARs avec des constantes d'affinité de l'ordre de la nanomole.

Tableau 6 : Activité transactivatrice des agonistes PPAR(s) (Kemp et al., 2002).

<i>Composés</i>	<i>Récepteur humain EC50 (μM)</i>		
	<i>PPARα</i>	<i>PPARγ</i>	<i>PPARδ</i>
Wy-14643	5.0	60	35
Clofibrate	55	1500	ia à 100
Fénofibrate	30	300	ia à 100
Bézafibrate	50	60	20
Troglitazone	Ia	0.55	ia
Pioglitazone	Ia	0.58	ia
Rosiglitazone	Ia	0.043	ia

ia : inactif à la concentration de 10 nm

4.5.3.2. Peroxisome Proliferation Response Element, PPRE

Les PPARs, activés par un ligand, forment un hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire, RXR. En même temps, RXR est activé par son ligand naturel, l'acide 9-cis rétinoïque, pour s'associer au PPAR. Initialement, avant la liaison des ligands, l'hétérodimère PPAR/RXR est lié à des corépresseurs qui empêchent sa liaison à l'ADN. La fixation au ligand entraîne un changement conformationnel qui modifie

l'accessibilité du domaine AF-2 et remplace les corépresseurs par des coactivateurs. En plus, cette hétérodimérisation avec RXR permet une forte élévation de l'affinité au niveau du site de fixation (Glass and Ogawa, 2006). Suite à l'activation des PPAR/RXR, la liaison à l'ADN se fait ainsi sur une séquence consensus : les complexes PPAR/RXR stimulent, par un processus de transactivation (augmente l'expression de l'ARNm codé par les gènes correspondants) la transcription des gènes qui contiennent dans leurs promoteurs un élément de réponse aux PPARs (Peroxisome Proliferation Response Element = PPRE). Les PPREs correspondent à des doubles séquences hexanucléotidiques (AGGTCA) de même sens, séparées par un nucléotide, connu sous le nom d'élément de réponse de type DR-1 (Figure 15).

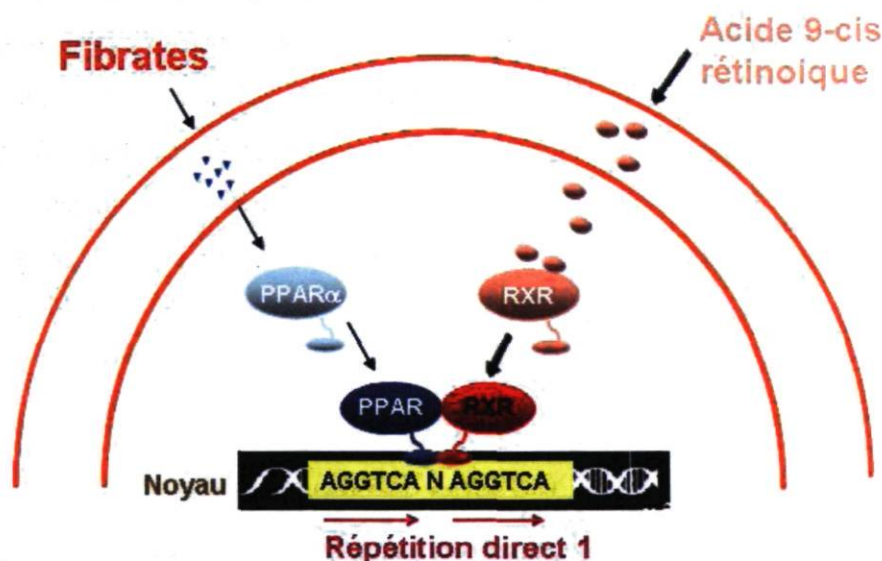


Figure 15 : L'activation de PPAR α par un ligand naturel (eicosanoïdes) ou synthétique (fibrates).

PPAR α , activé par un ligand, s'associe à un autre récepteur nucléaire, le RXR, lui-même activé par l'acide 9-cis rétinolique. L'hétérodimère PPAR α /RXR activé, se fixe sur des PPREs de type DR1 contenus dans les promoteurs des gènes cibles. La liaison de PPAR α /RXR sur ces PPREs stimule la transcription de ces gènes, et donc la synthèse des protéines correspondantes.

4.5.3.3. Gènes cibles

PPAR α est exprimé dans les cellules de la paroi vasculaire, dans le foie, le rein et les muscles. Son gène humain est situé sur le chromosome 22 (22q12-13.1). Les fibrates

modulent le métabolisme lipidique grâce à leur capacité de stimuler l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de ce métabolisme. Ces gènes sont porteurs, au niveau de leur promoteur, de PPREs. A titre d'exemple, les fibrates augmentent l'activité de la LPL en stimulant l'expression du gène qui code pour cet enzyme. En effet, il existe un PPRE dans le promoteur du gène de la LPL dont l'activation par PPAR α augmente la transcription de l'ARNm. D'autre part, les fibrates diminuent la synthèse de l'apo C-III qui est un inhibiteur naturel de l'activité de la LPL. Ceci passe par la présence d'un site C3P, qui, régulé par PPAR α , est capable de lier différents récepteurs nucléaires (HNF-4, ARP-1, etc.) dans le promoteur du gène de l'apo C-III. PPAR α activé stimule aussi un PPRE localisé dans le promoteur du gène de Revrb et augmente l'expression de ce facteur nucléaire qui réprime, au niveau génique, la synthèse de l'apo C-III (Chambolle, 2002). Les fibrates ont aussi la capacité d'augmenter la synthèse des apo A-I (Cohn, 2002; Coulston and Johnson, 2002) qui sont responsables d'une modulation positive du métabolisme des HDL, parce qu'ils comprennent dans leurs promoteurs gènes des PPRE. Enfin, la diminution de la triglycéridémie plasmatique dépendante de l'activité de la CETP (décrite dans le § 4.5.2) se produit grâce à la présence d'un PPRE (reconnue par PPAR α) dans le promoteur de gène codant pour cet enzyme.

CHAPITRE II : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET

Les propriétés athéro-protectrices de la bilirubine rendent cette molécule endogène comme attrayante dans le cadre de l'identification de nouvelles approches thérapeutiques réduisant les risques de MCV. Cependant, les effets neurotoxiques de cette molécule empêchent son utilisation systémique. Basée sur l'hypothèse qu' « *une induction modérée de la synthèse de bilirubine permettrait de stimuler ses propriétés anti-athérosclérotiques en évitant de rejoindre des niveaux neurotoxiques* », le but de notre projet de recherche est d'identifier des molécules pharmacologiques capables de stimuler simultanément la formation de bilirubine dans les cellules de la paroi vasculaire et son métabolisme au niveau hépatique. Pour tester notre hypothèse et valider notre but, le présent projet de recherche a pour objectifs de (Figure 16) :

Objectif 1 :

Tester l'effet des fibrates hypolipémiants, couramment utilisés en clinique et activateurs de PPAR α , sur l'expression des enzymes de synthèse de la bilirubine, HO-1 (enzyme limitante de la synthèse de la bilirubine) et BVR dans la paroi vasculaire. Pour cette étude, les modèles cellulaires utilisés sont les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC). Dans le cas d'un effet positif, cet impact permettrait une amplification locale de la synthèse de la bilirubine, antioxydant puissant capteur de radicaux libres. Ceci favorise ainsi, une inhibition de l'événement initiateur de l'athérosclérose, l'oxydation des LDL et par la suite une protection potentiellement athéro-protectrice.

Objectif 2 :

Tester l'effet des fibrates hypolipémiants, couramment utilisés en clinique et activateurs de PPAR α , sur l'expression des enzymes de métabolisme de la bilirubine, UGT1A1 et MRP-2, dans des cellules hépatiques. Les modèles cellulaires utilisés sont les hépatocytes humains en culture primaire (HH) et la lignée d'hépatome humaine, HepG2. En admettant qu'une modulation positive soit exercée sur l'expression de ces enzymes, la conjugaison et l'élimination de la bilirubine dans la bile seront favorisées, protégeant ainsi l'organisme contre les accumulations toxiques de ce métabolite biliaire.

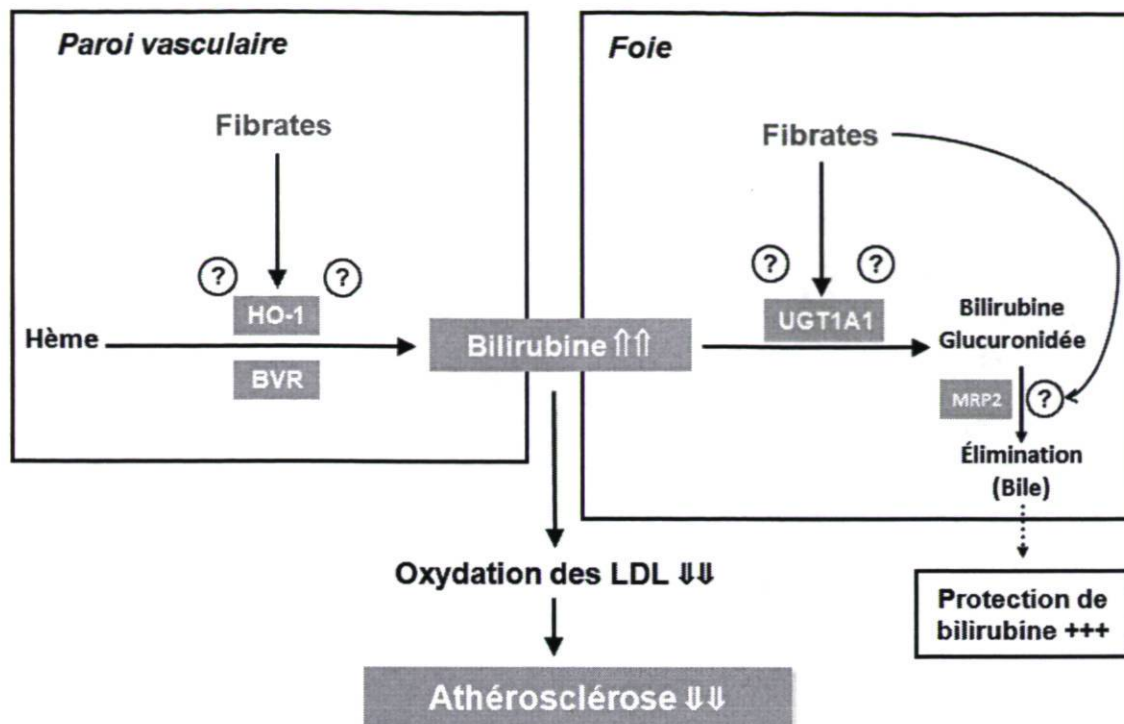


Figure 16 : Hypothèse générale du projet de recherche.

CHAPITRE III : RÉSULTATS

Article inséré

COORDINATED REGULATION OF BILIRUBIN SYNTHESIS AND METABOLISM BY THE HYPOLIPIDEMIC FIBRATES

Diala el Hussein, Jenny Kaeding and Olivier Barbier

Article non soumis encore

Contributions

L'étude a été supervisée par le Dr Olivier Barbier. Les manipulations ont été réalisées par Diala el Hussein (immunobuvardage et PCR en temps réel) et par Jenny Kaeding (PCR en temps réel). L'analyse des résultats a été effectuée par Diala el Hussein, également Jenny Kaeding a participé à certaines analyses. L'interprétation des résultats et l'écriture du manuscrit ont été faites par Diala el Hussein sous la supervision d'Olivier Barbier. La préparation des figures et du tableau a été accomplie par Diala el Hussein. La révision de l'article et de la bibliographie a été faite par Olivier Barbier et Diala el Hussein. J'ai contribué à la majorité de ce travail. La version présentée est la version initiale et sera soumise prochainement.

Résumé

La bilirubine, produit de la dégradation de l'hème, est un antioxydant puissant exerçant des fonctions athéro-protectrices. Synthétisée lors du métabolisme de l'hème par l'action successive des enzymes, hème-oxygénase (HO-1) et biliverdine-réductase (BVR), la bilirubine est métabolisée par l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT1A1) dans le foie, afin d'être éliminée sous forme glucurono-conjuguée par le transporteur, «Multidrug resistance Related Protein» (MRP)-2. Les fibrates sont une médication fréquemment utilisée dans le traitement de la dyslipidémie, prévenant l'athérosclérose *in vivo*. L'hypothèse de la présente étude est : les fibrates régulent l'homéostasie de la bilirubine, ils modulent positivement l'expression des gènes impliqués dans sa synthèse et son métabolisme. Des cellules provenant de la veine ombilicale humaine (HUVEC) ainsi que des hépatocytes humains en culture primaire (HH) et des cellules d'hépatome (HepG-2) ont été cultivées en présence de différentes fibrates. L'expression de HO-1, de BVR, d'UGT1A1 et de MRP-2 a été analysée par PCR en temps réel et/ou par immunobuvardage. Dans les HUVECs, les fibrates stimulent le niveau d'ARNm et de protéines de HO-1, cependant la BVR n'est pas affectée. D'autre part, dans le foie, les fibrates affectent modérément l'expression de MRP-2, mais significativement celle de l'UGT1A1. En conclusion, les fibrates exercent deux rôles dans l'homéostasie de la bilirubine : dans les cellules vasculaires, ils amplifient la synthèse de la bilirubine, favorisant ainsi ses propriétés antioxydantes et athéro-protectrice. Dans le foie, ils stimulent la conjugaison et l'élimination de la bilirubine protégeant ainsi le patient contre les accumulations toxiques de ce métabolite.

Coordinated regulation of bilirubin synthesis and metabolism by the hypolipidemic fibrates

Diala El Hussein^{1,2} Jenny Kaeding^{1,2} and Olivier Barbier^{1,2}

¹ Molecular Endocrinology and Oncology Research Center, CHUL Research Center, Québec, Canada.

² Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada.

Corresponding author and impression coordinates:

Olivier Barbier
Laboratory of molecular pharmacology
CHUQ-CHUL Research Center
2705, boulevard Laurier
Quebec, QC G1V 4G2, CANADA
Phone: 418 654 2296
Fax: 418 654 2769
Email: olivier.barbier@pha.ulaval.ca

Short Title: Fibrates stimulates the athero-protector effect of bilirubin

Abstract

Background: Atherosclerosis remains the first cause of mortality in the world. Bilirubin is a product of heme degradation which has a potent anti-oxidative capacity. It has recently emerged as an athero-protective endobiotic, but is neurotoxic in elevated concentrations. Synthesized during the heme metabolism by the successive action of heme oxygenase (HO-1) and biliverdin reductase (BVR), bilirubin is glucuronidated by UDP-glucuronosyl-transferase (UGT1A1) in the liver and eliminated from the body as a conjugated glucuronide by the transporter Multidrug resistance Related Protein (MRP)-2. Fibrates are frequently used in the treatment of the dyslipidemia, preventing the atherosclerosis *in vivo*.

Objective: Our purpose is to determine if fibrates modulates positively the expression of the genes involved in the synthesis of bilirubin and its metabolism. In order to verify if the pharmacologic action of these drugs, take advantage of bilirubin anti-oxidant capacities and of its athero-protector effect.

Methods: Human Umbilical Vein Endothelium Cells (HUVEC), Human Hepatocytes in primary culture cells (HH) and hepatoblastoma cells (HepG-2) were cultured in presence or absence of different fibrates for different durations (6 to 24 hours and 6 to 72 hours) at indicated concentrations (10 to 250 μ M and 10 to 250 μ M) respectively. The expression of HO-1, BVR, UGT1A1 and MRP-2 was analyzed by real-time PCR and/or by western blot.

Results: In HUVEC, fibrates stimulate the expression of HO-1 gene; while BVR gene expression remains not affected. In hepatic cells, fibrates affect moderately the expression of MRP-2, but increased the UGT1A1 mRNA level.

Conclusion: In vascular cells, fibrates amplify bilirubin synthesis, thus favoring its potential antioxidant and athero-protective properties. In the liver, these drugs stimulate the conjugation and the elimination of bilirubin thus protecting the organism from its toxic systemic accumulations.

Key words: Atherosclerosis, dyslipidemia, fibrates therapy, bilirubin serum, antioxidant.

Abbreviations

BVR	Biliverdin Reductase
CHD	Coronary Heart Disease
CAD	Coronary Artery Disease
CVD	Cardiovascular Disease
FBS	Foetal Bovin Serum
Ct	Threshold Cycle
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DR	Dose Response
EGM	Endothelial Cell Growth Medium
GS	Gilbert Syndrome
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterol
HH	Human Hepatocytes in primary culture cells
HepG-2	Hepatoblastoma Cells
HO-1	Heme Oxygenase-1
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IHD	Ischemic Heart Disease
LDL-C	Low Density Lipoprotein Cholesterol
MRP-2	Multidrug Resistance-associated Protein 2
PPAR α	Peroxisome Proliferator-activated Receptor α
PPRE	Peroxisome Proliferation Response Element
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
TC	Time Course
UGT	UDP-Glucuronosyl-Transferase
UGT-1A1	Uridin-Diphospho-Glucuronosyl-Transferase-1A1

Introduction

Atherosclerosis is a pathological condition of the vascular wall in which arteries undergo thickening of their intimal regions (Intern tunica of vascular wall) causing a total or partial obstruction of the arteries [1]. Atherosclerotic cardiovascular disease (CVD), which involves the heart, brain, and peripheral circulation, is a major health problem in industrialized countries and around the world. The world health organization predicts that these pathologies will be the primary cause of mortality and morbidity in the world until 2010[2]. A dominant factor in initiation of atherosclerosis is oxidative stress. It causes the oxidation of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), these oxidized LDL-C involve the penetration of monocytes in intimal region and their differentiation in foams cells which is followed by an accumulation of inflammatory response leading to formation of a fibrous caps [3]. The atheromatous plaque thus will extend gradually until the media (intermediate tunica of vascular wall), eventually lead to plaque ruptures causing stenosis or myocardial infarction [4]. Dyslipidemia correspondent to a disruption in the amount of lipids in the blood; it's positively correlated with the risks of CVD [5]. Their reduction thus is a major target in prevention of circulatory diseases.

However, at present, different strategies of cholesterol-lowering drugs exist: acid fibric derivatives (i.e fibrates), HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase) inhibitors, (i.e statins), inhibitors of intestinal cholesterol absorption (i.e ezetimibe), a sequestrating of bile acid (i.e resins) and the niacin (increase catabolism of the cholesterol) which allow an improvement on lipidic profile [6]. Fibrates (gemfibrozil (Lopid®) or ciprofibrate (Lipantor®)) are used in the treatment of hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Treatment with fibrates results in a substantial decrease in plasma triglycerides and LDL-C and an increase in HDL-C (High Density Lipoprotein Cholesterol) concentrations, which have an athero-protector effect. In fact, fibrates are activators of the peroxisome proliferator-activated nuclear receptor (PPAR) α [7] that modulate the expression of genes involved in the metabolism of triglycerides and cholesterol. In human, PPAR α is strongly expressed in liver, muscle, kidney, and intestine. Furthermore, it is expressed in vascular wall cells where it controls reverse cholesterol transport genes; and it is also expressed in the liver where its action supports the elimination of cholesterol and triglycerides. Moreover fibrates also show a several many pleiotropic effects; it reduces the vascular inflammation and decreases the synthesis of vasoconstrictor factors [8, 7]. In

addition, the endogenous antioxidant systems, like bilirubin, have the ability to limit lipoprotein oxidation which is a crucial step for triggering the atherosclerosis.

Bilirubin is a lipophilic linear tetrapyrrole (fig.1) abundant in human plasma with physiological concentrations ongoing from 0.3 to 1.2 mg/dl [9], formed from the heme. In vascular wall, heme is degraded by the enzyme heme oxygenase (HO)-1 into equimolar amounts of free iron, biliverdin, and carbon monoxide. In mammals, biliverdin is subsequently reduced by the biliverdin reductase (BVR) to bilirubin (fig.1) [10]. Being insoluble, bilirubin is released in blood circulation where it binds to albumin. In hepatocytes, bilirubin is glucuronidated by UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A1 enzyme forming mono- and diglucuronid conjugates (soluble). This metabolite is then eliminated in the bile via the transporter, Multidrug resistance Related Protein (MRP)-2 (fig.1) [11]. Nevertheless, recent studies demonstrated that bilirubin efficiently scavenges peroxy radicals and suppresses the oxidation reaction, thereby protecting membrane lipids [12]. Consequently, the antioxidant capacity of bilirubin and its ability to scavenge peroxy radicals may protect against oxidized LDL-C which associated with CVD [3]. Furthermore, the protective activity of bilirubin has been shown in numerous retrospective and prospective studies [13, 14] as well as in a meta-analysis study [15]. Several analyzes reported that bilirubin concentrations are inversely related to coronary artery disease (CAD), to carotid atherosclerosis [16] and to risks of CVD, in men. In addition, a moderate high bilirubin level is a protective factor against the heart diseases [15, 17]. Finally, a high bilirubin concentration proved to have a protective capacity equal to that of HDL-C in coronary diseases patients [15].

The reaction of glucuronidation is an important metabolic process by which exogenous and endogenous compounds, are converted into hydrophilic substances more easily excreted in the urine [18]. These reactions are catalyzed by UDP-glucuronosyl-transferase (UGTs) enzymes. The UGT1A1 is the enzyme in charge of the glucuronidation way of the insoluble bilirubin in a soluble glucuronide metabolite. The activity of this enzyme may be affected by mild or strong mutations, which will have consequences on the bilirubin concentrations and then on atherosclerosis. Recently, Vitek et al [19] reported on the prevalence of ischemic heart disease (IHD) in individuals with Gilbert syndrome (GS), a light deficit in UGT1A1 activity which generates a moderately higher bilirubin plasmatic level than the normal [19]. About GS, linkage region encoding for UGT1A1 studies have identified a major locus at the chromosome 2q 37 telomere that affects bilirubin concentrations. The insertion of a TA in the TATAA box of the gene represents an allele designated by UGT1A1*28 which decreases

gene transcription. A significant association between UGT1A1*28 and CVD events has been reported. These individuals present a moderate elevated circulating bilirubin and were found to have an IHD prevalence rate of 2% compared with 12.1% in the general population [19]. In addition, several meta-analysis studies have shown a negative relationship between serum bilirubin concentrations and severity of atherosclerosis in men [15].

However, with high concentration, bilirubin is a neurotoxic molecule [20]. Mutations in the UGT1A1 gene (located on chromosome 2q37), as previously reported, lead to complete or partial inactivation of the enzyme causing two other unconjugated hyperbilirubinemia syndromes: type I and type II Crigler-Najjar syndromes.

Finally, general UGTs families constitute also target genes controlled by PPAR α (which is activated by fibrates). Recent work shows that a treatment with Wy14643, a synthetic activator of PPAR α , stimulates strongly and significantly the expression of UGT1A1 in human hepatocytes and hepatocytes isolated from transgenic mice (TG-UGT1) as well as the expression of other UGTs, in vitro [21]. Also in vivo, an oral administration by cramming with Wy14643 to others transgenic mice (TG-UGT1) shows an important induction of the UGT1A1 in the liver and intestine [21]. In the same way, other works revealed that the activators of PPAR α amplify UGT1A1 expression in hepatic cells of C57BL/6 mouse in vivo [22]. Therefore, fibrates, activators of PPAR α appear to be modulators of UGT1A1 activity which is responsible for bilirubin glucuronidation.

The athero-protective properties of bilirubin make this molecule as an attractive candidate of identification of new therapeutic approaches reducing CVD. However, the neurotoxic effects of this molecule prevent its systemic use. Based on the observation that “a significant, but non-toxic drug-induced elevation of bilirubin levels will be profitable to reduce atherogenesis”, the aim of the present study was to test the effect of fibrates on the expression of bilirubin synthesizing enzymes (HO-1 and BVR) in vascular wall cells (represented by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)); and on the expression of its metabolic way enzyme (UGT1A1 and MRP-2) in hepatic cells (human hepatocytes in primary culture cells (HH) and HepG-2 (hepatoblastoma cells)).

Materials and Methods

Materials

HUVEC were purchased from Cambrex, East Rutherford, U.S.A. and HH were obtained from Invitro Technologies (Baltimore, MD). HepG2 cells were provided by the American type Culture Collection (Rockville, MD). Cell culture reagents were from Invitrogen (Burlington, Canada). Pirinixic acid (4-Chloro-6-(2, 3-xylidino)-2-pyrimidin-ylthioacetic acid), commonly known as Wy-14643, ciprofibrate, gemfibrozil and DMSO were purchased from Sigma-Aldrid (St. Louis, MO). Syber Green PCR Mastermix was provided from Applied Biosystems (Foster City, CA, U.S.A.). The anti-HO-1 was obtained from Stressgen, Ann Arbor, Michigan U.S.A.; the rabbit polyclonal anti-human actin antibody was purchased from Sigma (A5060) and the secondary anti-rabbit IgG (RPN4301) was from Amershan (Oakville, ON, Canada).

Cell Culture

HUVEC were cultured in EGM (Endothelial Cell Growth Medium) according to the manufacturer's instructions (Lonza group, Switzerland), supplemented with 0.2% FBS (Foetal Bovin serum). For cell treatments, 1.2×10^5 cells in 12-well plates were plated and exposed to fibrates for indicated durations (6 to 24 hours) at indicated concentrations (10 to $250 \mu\text{M}$) as described below.

HepG2 were incubated in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% FBS. 4×10^5 cells were plated in 12-well plates and treated with fibrates in DMEM without FBS for indicated durations (6 to 72 hours) at indicated concentrations (10 to $250 \mu\text{M}$) as described below.

HH were plated in 24-well plates (35×10^5 cells/well) and maintained in InVitroGro CP medium for 48 hours with change of medium after 24 hours. Afterwards, the cells were treated with vehicle (dimethylsulfoxide (DMSO), 0.1 % v/v) or fibrates in InVitroGro HI medium for 48 hours.

All the experiments were released in Dose Response (DR) or in Time course (TC) for determining the requirements for obtaining an optimal effect. For each compound, the concentrations and the durations used are pharmacologically relevant as described in literature [23]. The fibrates used in this study are: gemfibrozil (DR: 10 à $250 \mu\text{M}$, TC: 6 à 72h) and ciprofibrate (DR: 10 à $250 \mu\text{M}$, TC: 6 à 72h). Moreover, one synthetic activator of PPAR α , Wy14643 (DR: 10 à $100 \mu\text{M}$; TC: 6 à 48h) was also used. All the treatments were realized in triplicate with a negative control (vehicle).

RNA Isolation and Reverse Transcription

Total RNA was isolated from treated or control cells as previously reported [24] according to the Tri-reagent acid phenol protocol as specified by the supplier (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH). The reverse transcription was performed using 200 units of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) for 1 µg of total RNA and 7.5ng random hexamere (Roche, Laval, Quebec, Canada) at 42°C for 50 minutes (as previously reported [25, 26]).

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The level of expression of HO-1, BVR, UGT1A1 and MRP-2 was analyzed by RT-PCR with SYBR[®] Green by using the ABI Prism 7500 detection system from Applied Biosystems (Foster City, CA).

For the analysis of HO-1 and UGT1A1, in each reaction, the final volume of 20µl comprised 10µl of SYBR[®] Green PCR Master Mix, 2µl of each primer and 6µl of diluted reverse transcription product (1:500 dilution) (Table 1). The cycle parameters for real-time PCR were as follows: initial 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 1 minute at the gene-specific temperature as indicated (Table 1).

The specific amplification of each target mRNA was ensured by direct sequencing of PCR products. Threshold cycle (Ct) values were analysed using the comparative CT ($\Delta\Delta CT$) method as described by the manufacturer (Applied Biosystems). The amount of target gene ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was obtained by normalizing to the endogenous reference (28S (for UGT1A1) and GAPDH (for HO-1) gene) and was expressed relatively to vehicle-treated control as the baseline. For each gene, the amplification efficiency and the accuracies of $\Delta\Delta CT$ of target genes compared with (28S or GAPDH) were tested using 2 to 5 log of concentrations of cDNA produced from HepG2 or HH or HUVEC-cell purified mRNA.

For the analysis of BVR and MRP-2, each reaction (20µl) consisted of 10µl of Taqman Universal[®] PCR Master Mix (provided by Applied Biosystems), 1µl of specific probe (Taqman gene expression assay) and 9µl of diluted RT product. The assay ID used: Hs00167599_m1 for BVR and Hs00166123_m1 for MRP2

Western-blot analysis

Total proteins from control and treated cells were purified according to the Tri-Reagent acid phenol protocol. For western blot experiments, 20 µg of total proteins were size-separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel, and immunoblotted with an anti-HO-1 antibody (dilution 1:5000). The same amount of protein was also immunoblotted with an anti-actin antibody as a

loading control. Relative protein levels were quantified by using BioImage Visage 110s (Genomic Solution, Ann Arbor, MI, U.S.A.).

Statistical analyses

All data are presented as mean \pm SD. Comparisons between two groups were performed using a two-tailed Student T-test with the JMP V4.0.2 software (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.). In all cases $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Fibrates stimulate expression of the rate limiting enzyme of the bilirubin synthesizing (HO-1) in vascular endothelial cells

To validate our first aim, we tested the effect of fibrates (Wy14643, ciprofibrate and gemfibrozil) on HO-1 and BVR expression in HUVEC. We have observed that exposure of HUVEC cells to vehicle or fibrates for 12h in dose response (10 to 100 μ M for Wy14643 and 10 to 250 μ M for ciprofibrate and gemfibrozil), induces HO-1 mRNA level. Wy14643 amplifies significantly and dose-dependently HO-1 expression and the most effect was pronounced at 50 μ M for 3.6 fold more (fig.2A). In the same way, ciprofibrate and gemfibrozil induce dose-dependently HO-1 mRNA level, the strongest effect was observed at 250 μ M for each of the 2 fibrates with 2.25 and 4.4 fold induction respectively (fig.2B et 2C).

Moreover, subsequent analysis of HO-1 protein levels in fibrates-treated HUVEC cells, with the same concentrations for 12h, confirmed the induction observed at the mRNA level. Wy14643 treatment resulted in a moderate increase of HO-1 expression at 100 μ M (50 % more). While this expression does not seem to be affected at 10; 25 and 50 μ M (fig.2D). The analysis of HO-1 protein levels in ciprofibrate-treated HUVEC cells confirmed the increased detected with RNA at 10; 50 and 100 μ M (an amplification of 50, 94 and 66 % more than vehicle, respectively), but at 250 μ M, the protein level is only slightly increased (24% more than vehicle) (fig.2E). Finally, gemfibrozil resulted in a strong expression at 250 μ M only (50% more than vehicle) (fig.2F).

This DR experiments allowed to determine the concentrations of fibrates for which the induction of HO-1 expression is maximum (Wy14643 (50 μ M), ciprofibrate (250 μ M) and gemfibrozil (250 μ M)), also, they are in agreement with the concentrations often found in the literature [27]. Exceptionally, in the case of Wy14643, a concentration of 75 μ M is more used in literature than a concentration of 50 μ M [21, 35]. Additional TC experiments (6 to 24h) of fibrates-treated HUVEC cells were realized with the conceived concentrations for ciprofibrate and gemfibrozil and 75 μ M for Wy14643 (fig.2).

Wy14643 (75 μ M) treatment led to a significant stimulation of the HO-1 activity for the different durations of treatments, with the largest response being observed after 9h and 12h (3.7 and 3.6 fold induction respectively) (fig.2G). Also, ciprofibrate (250 μ M) showed a significant amplification of this gene activity after 9h of treatment (4 fold more than vehicle) (fig.2H). As well, gemfibrozil (250 μ M) increase HO-1 activity after the different treatment with the highest effect being observed after 4h (fig.2I).

In addition, several analyzes of BVR mRNA level in fibrates-treated HUVEC were carried out in our laboratory, the activity of this gene remains unchanged (results not presented).

Therefore, our data indicate that in HUVEC, PPAR α activators increase HO-1 (the rate limiting enzyme of the bilirubin synthesizing pathway) mRNA and protein levels, whereas the expression of BVR remains unchanged.

Fibrates stimulate the enzymes expression of bilirubin metabolizing enzymes in hepatic cells

The second objective aims at examining the potential effect of fibrates on UGT1A1 and MRP-2 genes in the liver. For this study the cellular models which were used are the HH and HepG2. Obviously, the conceived concentrations (250 μ M for gemfibrozil and ciprofibrate) were also used during experiments of this second objective (fig.3 and 4). For Wy14643, we also used at 75 μ M for cells-treatment.

We have observed the exposure of HepG2 cells to vehicle or fibrates in DR and/or in TC experiments on the UGT1A1 and MRP-2 mRNA level, which were determined by PCR in real time. These analyses showed that fibrates stimulate UGT1A1 expression in TC and in time dependant manner from 6 to 48h for Wy14643 (significant maximal induction: 2.75 fold more than vehicle (fig3.A)) and from 12 to 72h for ciprofibrate and gemfibrozil (significant maximal induction: 2.3 and 2.2 fold more than vehicle, respectively (fig.3B and 3C)).

Evenly, in dose response and after 48h of treatment, these fibrates increased the UGT1A1 gene activity in a dose-dependent manner with the highest response was observed at 100 μ M for the Wy14643 (a significant rise of 2.9 fold more (fig.3D)) as well as for the ciprofibrate (a significant rise of 2.25 fold more (fig.3E)). Whereas the maximum expression induced by the gemfibrozil was observed at 250 μ M with a significant rise of 2.25 fold induction (fig.3F).

However, the fibrates slightly modulated MRP-2 expression during TC experiments in HepG2 cells (fig.4). Variable effects were observed at the different durations of treatments, as well for Wy14643, as for ciprofibrate, than for gemfibrozil. A significant induction of MRP-2 expression of 50 and 30% was marked after 24 and 48h of treatment respectively in the case of Wy14643, contrary after 12h of treatment no effect was observed (effect non significant) (fig.4A). As well, ciprofibrate allowed a significant stimulation of MRP-2 activity only after 12 and 48h (of treatment) with a weak increase of 25 and 15%, respectively (fig.4B). In particular, the gemfibrozil treatment underlined very variable effects from 12 to 72h: an induction of 2 fold more than vehicle after 12h, 25% after 24h, 7% after 72h and no effect after 48h (fig.4C).

Likewise, the expression of HO-1 was slightly modulated by the 3 fibrates in HepG2 cells in a time-dependent manner (fig.4) and very variable responses were showed following the treatments. Wy14643 treatment resulted in light significant rise of 20 and 25% after 12 and 24h respectively (fig.4D). Similarly, ciprofibrate treatment showed an induction of the HO-1 activity after 12 and 24h whereas no significant effect after 48 and 72h of treatment (fig.4E). As for gemfibrozil, it significantly doubled the mRNA level of HO-1 after 12h, and no significant modulation was observed after 12, 24 and 48h of treatment (fig.4F).

In order to confirm the induction of UGT1A1, HO-1 and MRP-2 hepatic expression by fibrates treatment, HH were treated with vehicle or fibrates, obviously according to pharmacologically relevant doses: Wy14643 (75 μ M), ciprofibrate (200 μ M) and gemfibrozil (200 μ M). These experiments affirmed the rise of relative UGT1A1 mRNA level (Wy14643: 1.9 fold more; ciprofibrate: 2.5 fold more and gemfibrozil: 2 fold more (fig.5A)) and the light induction of MRP-2 activity (Wy14643: 1.5 fold more; ciprofibrate: 1.8 fold more and gemfibrozil: 2 fold more (fig.5B)). However a reduction of HO-1 expression of 50% was remarked in theses cells treatment (fig.5B).

Thus fibrates induce genes expression responsible for the conjugation and elimination of bilirubin in order to avoid its accumulation on toxic levels.

Discussion

Current therapeutic interventions for the treatment of hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia include fibric acid derivatives, statins and oral hypoglycemic agents, respectively, with the underlying aim of preventing CVD.

In the present study, it was found that fibrates induced bilirubin synthesis (by inducing HO-1 expression) and its metabolism (by inducing UGT1A1 and MRP-2 activity) in vascular wall cells and hepatic cells, respectively. These in vitro observations provide a novel pharmacologic effect involving mechanistic possibilities for endogen pathways contributing to a reduction vascular disease in vivo. This is supported by the potent antioxidant properties of bilirubin involved in the defense against oxidative stress [28] and then in the protection against atherosclerosis [29]. Moreover, to avoid a body imbalance, the induction of the bilirubin glucuronidation and its transport into bile protect against its toxic accumulations. Thus, this study is about an original model initiated by fibrates, based on a balance between the bilirubin synthesis and its metabolism, for anti-atherosclerosis aim.

Effect of fibrates on HO-1 and BVR

According to “Diabetes and Combined Lipid Therapy Regimen (DIACOR)”, these cholesterol-lowering drugs induce HDL-C level of 13.7%. Indeed, the pharmacological action of fibrates is mediated by PPAR α , a ligand-activated transcription factor that positively regulates gene expression of lipoproteins metabolism by increasing lipoprotein lipase expression; Apo-lipoprotein-I and Apo-lipoprotein-II synthesis and by reducing of Apo-lipoprotein C-III activity [30]. However, the mechanism of action of this medication remains very little elucidated, the present work identifies a novel mechanism of action of fibrates also via the stage of PPAR α activation.

In recent years, a considerable amount of attention has been focused on the role of HO-1 and the heme-bilirubine-carbon monoxide pathway in the development of atherosclerosis [31]. In fact, HO-1 induction gene has been proposed as a new therapy by Victor et al [32]. They showed that this HO-1 induction had protection effect against oxidative stress, which is a process that may be important in CVD pathophysiology [32]. Moreover, our results shown that fibrates stimulate the gene expression of this bilirubin-synthesizing enzyme, HO-1 in vascular wall cells. This was most clearly observed in mRNA level than in protein after cells treatment. That can be explained by the fact that protein expression takes more times than mRNA expression for the same treatment duration (12h of treatment in this case). However as

we have mentioned previously, that bilirubin efficiently scavenges peroxy radicals and suppresses the oxidation reaction in liposomes [28], thereby protecting membrane lipids [12]. Also, it constitutes a protective factor positively correlated to a lower risk of CVD. Therefore, the protective antioxidant effect of HO-1 is indirect, depends on the metabolites of heme released by the enzyme and passes by the antioxidant power of the bilirubin. In fact, the bilirubin concentration is weak in plasma but insufficient in cell to be opposed to oxidative stress according to stoichiometric basis. Indeed, 10nM of bilirubin protect from a concentration 10^5 times higher from H₂O₂. In fact, bilirubin is considered like as factor acting in catalytic way in a redox cycle. In this cycle, the bilirubin is oxidized by the ROS in biliverdin then again reduced in bilirubin [33].

BVR which catalyzes the reduction of biliverdin in bilirubin also behaves like an antioxidant, but in indirect manner [33]. That explains the reasons for which, we focused our studies on the fibrates impact on these 2 genes responsible for the bilirubin synthesis. However according to the results obtained, the BVR expression wasn't modified after a fibrates treatment. That is can be explained by the limiting enzyme of the bilirubin synthesizing pathway correspond to HO-1 and not to BVR.

Effect of fibrates on UGT1A1 and MRP-2

According to recent work, a fibrates-treatment significantly induces UGT1A1 activity in hepatic cells [21]. These results were confirmed by our works; Wy14643, ciprofibrate and gemfibrozil induce UGT1A1 expression in time-dependent and dose-dependent manners in HepG2 cells and these results were confirmed in HH cells. Also, our results confirm others studies published recently like: Chlouchi et al demonstrated that treatment with clofibrate stimulates UGT1A1 expression in hepatocytes of rat and then over-expressing bilirubin glucuronidation [36].

Moreover, about GS, a significant association between UGT1A1*28 and CVD events were established by Vitek et al.: a prospective study shows a significant incidence of three years limiting CVD events in GS patients [19]. That supports our results concerning pharmacologic action of PPAR α which resulting in a moderate higher bilirubin concentration and then an athero-protective effect.

We finally proved that fibrates increase moderately the expression of the MRP-2 transporter, responsible of bilirubin elimination in bile. So according to our results, fibrates induce efficiently the UGT1A1 expression, but its effect is moderate on MRP-2 expression, this can lead to a situation where the hepatic production of conjugated bilirubin exceeding the capacity

of elimination by MRP-2, and then can lead to a hepatic accumulation of conjugated bilirubin. This situation is close to the Dubin-Johnson disease, which results from a hereditary defect in biliary secretion of bilirubin pigments, and manifests as recurrent jaundice with conjugated hyperbilirubinemia. This anomaly is due to the absence of the MRP-2 gene expression located on chromosomes 10q 24. This disease is totally benign. No treatment is necessary and patients have a normal life expectancy [34]. Thus a moderated induction of MRP-2 by the fibrates has no disadvantage effect and reinforces the idea of starting research and experiments trying and confirming this model of “bilirubin balance”, in vivo.

All these concepts together can indicate a high probability of implication of the bilirubin antioxidant and anti-atheromatous properties in the action of fibrates, through regulation of implicated gene by PPAR α . It remains to identify the molecular mechanisms involved in the expression response of the following genes HO-1; UGT1A1 and MRP-2 to PPAR α . However, it is known in literature that PPAR α regulates the transcription of genes which have in their promoters a responsive element (Peroxisome Proliferation Response Element (PPRE)) to PPAR α [37, 38]. This concept will be interesting to check in vivo.

Conclusion

Despite the progress achieved in the last decade, we remain far of finding a complete cure for Atherosclerosis. This study opened a way for a novel pharmacologic mechanism of fibrates action benefiting from bilirubin antioxidant capacities in their athero-protectors effects. This original model, initiate by fibrates is based on the balance between the induction of the bilirubin synthesis and its metabolism in vitro. It allows also a better comprehension of fibrates pharmacological activity and clinical effects observed in order to improve knowledge of complex mechanisms involve in atherosclerosis lesions. It remains to check these concepts on an animal model.

Acknowledgements

These studies are financed by “Pfizer Cardiovascular”; and by “Foundation of Cardiovascular Diseases”; we thank this organization.

References

1. Giral, P., Athérome: Anatomie pathologique, physiopathologie, épidémiologie et facteurs de risque, prévention. *La Revue du praticien* 1998. 48(1): p. 99-106.
2. Who, Cardiovascular disease: prevention and control. World Health Organization: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en>, 2005.
3. Stocker, R. and J.F. Kearney, Jr., Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 2004. 84(4): p. 1381-478.
4. Tanaka, A., Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 2004. 11(6): p. 322-9.
5. Yusuf, S., et al., Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 2004. 364(9438): p. 937-52.
6. Wierzbicki, A.S., Lipid-lowering therapies in development. *Expert Opin Investig Drugs*, 2004. 13(11): p. 1405-18.
7. Chapman, M.J., Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis*, 2003. 171(1): p. 1-13.
8. Evans, M., et al., Medical lipid-regulating therapy: current evidence, ongoing trials and future developments. *Drugs*, 2004. 64(11): p. 1181-96.
9. Adin, C.A., B.P. Croker, and A. Agarwal, Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. 288(4): p. F778-84.
10. Maines, M.D., The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997. 37: p. 517-54.
11. Vitek, L. and H.A. Schwertner, The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem*, 2007. 43: p. 1-57.
12. Dudnik, L.B. and N.G. Khrapova, Characterization of bilirubin inhibitory properties in free radical oxidation reactions. *Membr Cell Biol*, 1998. 12(2): p. 233-40.
13. Morita, T., Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(9): p. 1786-95.
14. Yamaguchi, T., et al., Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia-reperfusion of rat liver and induction of heme oxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 223(1): p. 129-35.
15. Novotny, L. and L. Vitek, Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: a meta-analysis of published studies. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(5): p. 568-71.
16. Ishizaka, N., et al., High serum bilirubin level is inversely associated with the presence of carotid plaque. *Stroke*, 2001. 32(2): p. 580-3.
17. Djousse, L., et al., Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. *Am J Cardiol*, 2001. 87(10): p. 1196-200; A4, 7.

18. Guillemette, C., Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J*, 2003. 3(3): p. 136-58.
19. Vitek, L., et al., Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis*, 2002. 160(2): p. 449-56.
20. Kapitulnik, J., Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol*, 2004. 66(4): p. 773-9.
21. Senekeo-Effenberger, K., et al., Expression of the human UGT1 locus in transgenic mice by 4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthioacetic acid (WY-14643) and implications on drug metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *Drug Metab Dispos*, 2007. 35(3): p. 419-27.
22. Buckley, D.B. and C.D. Klaassen, Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Drug Metab Dispos*, 2009. 37(4): p. 847-56.
23. Westerink, W.M. and W.G. Schoonen, Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro*, 2007. 21(8): p. 1592-602.
24. Trottier, J., et al., Human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A3 enzyme conjugates chenodeoxycholic acid in the liver. *Hepatology*, 2006. 44(5): p. 1158-70.
25. Barbier, O., et al., FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology*, 2003. 124(7): p. 1926-40.
26. Chouinard, S., et al., Isoform-specific regulation of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B enzymes in the human prostate: differential consequences for androgen and bioactive lipid inactivation. *Endocrinology*, 2006. 147(11): p. 5431-42.
27. Whitney, E.J., et al., A randomized trial of a strategy for increasing high-density lipoprotein cholesterol levels: effects on progression of coronary heart disease and clinical events. *Ann Intern Med*, 2005. 142(2): p. 95-104.
28. Stocker, R., et al., Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987. 235(4792): p. 1043-6.
29. Schwertner, H.A., W.G. Jackson, and G. Tolan, Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin Chem*, 1994. 40(1): p. 18-23.
30. Staels, B., et al., Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 1998. 98(19): p. 2088-93.
31. Scott, J.R., et al., Restoring HOmeostasis: is heme oxygenase-1 ready for the clinic? *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28(5): p. 200-5.
32. Victor, V.M. and M. Rocha, Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*, 2007. 13(8): p. 845-63.
33. Stocker, R., Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal*, 2004. 6(5): p. 841-9.

34. Nisa, A.U. and Z. Ahmad, Dubin-Johnson syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2008. 18(3): p. 188-9.
35. Barbier, O., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP-glucuronosyltransferase 2B4 enzyme. *J Biol Chem*, 2003. 278(35): p. 32852-60.
36. Chlouchi, A., et al., Effect of chrysin and natural coumarins on UGT1A1 and 1A6 activities in rat and human hepatocytes in primary culture. *Planta Med*, 2007. 73(8): p. 742-7.
37. Barbier, O., et al., Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(5): p. 717-26.
38. Entred, Prise en charge thérapeutique du risque cardiovasculaire des personnes ayant un diabète de type 2 (DT2). 2003, diaporama construit par Anne Fagot-Campagna, Isabelle Romon, et Claire Marant, de l'Institut de Veille Sanitaire (programme diabète), et validé par le comité scientifique d'Entred (Mise à jour le 15.12.2006). <http://www.invs.sante.fr/entred>.

Legends

Figure 1: Synthesis and metabolism of bilirubin [10].

Figure 2: Fibrates induce HO-1 mRNA expression in cells of the vascular wall

(A, B, C, D, E and F) HUVEC were treated, in dose response, with DMSO (vehicle) or Wy14643 (10 to 100 μ M) (A and D) or ciprofibrate (10 to 250 μ M) (B and E) or gemfibrozil (10 to 250 μ M) (C and F) in EGM, supplemented with 0.2% FBS for 12h.

(G, H and I) HUVEC were treated, in Time Course, with DMSO (vehicle) or Wy14643 (75 μ M) (G) or ciprofibrate (250 μ M) (H) or gemfibrozil (250 μ M) (I) in EGM, supplemented with 0.2% FBS for the indicated durations (6 à 24h).

(A, B, C, G, H and I) HO-1 mRNA levels were measured by real-time PCR and normalized to GAPDH expression. Results are presented as means \pm S.D. Statistically significant differences are indicated by asterisks. (Student's t test between control and treated samples: *p < 0.05; **: p < 0.005; ***: p < 0.001).

(D, E and F), twenty μ g of total protein of each sample was immunoblotted with an anti-human HO-1 antibody (dilution 1:5000). Five μ g of human liver was used like positive control. The same quantity of protein was, also immunoblotted with an anti-actin antibody considered like a control.

Figure 3: Fibrates induce UGT1A1 mRNA expression in HepG2 cells

(A, B and C) HepG2 cells were treated, in time course, with DMSO (vehicle) or Wy14643 (75 μ M) (A) or ciprofibrate (250 μ M) (B) or gemfibrozil (250 μ M) (C) in DMEM, supplemented with 10% FBS, for the indicated durations (6 to 48h for Wy14643 and 12 to 72h for ciprofibrate and gemfibrozil).

(D, E and F) HUVEC cells were treated, in dose response, with DMSO (vehicle) or Wy14643 (10 to 100 μ M) (D) or ciprofibrate (10 to 250 μ M) (E) gemfibrozil (10 to 250 μ M) (F) in DMEM, supplemented with 10 % FBS for 48h. UGT1A1 mRNA levels were measured by real-time PCR and normalized to 28S expression. Results are presented as means \pm S.D. Statistically significant differences are indicated by asterisks. (Student's t test between control and treated samples: *p < 0.05; **: p < 0.005; ***: p < 0.001).

Figure 4: Fibrates modify HO-1 and MRP-2 mRNA expression in hepG2 cells

(A, B, C, D, E and F) HepG2 cells were treated, in time course, with DMSO (vehicle) or Wy14643 (75 μ M) (A and D) or ciprofibrate (250 μ M) (B and E) or gemfibrozil (250 μ M) (C and F) in DMEM, supplemented with 10 % FBS, for indicated durations (12 to 48h for Wy14643 and 12 to 72h for ciprofibrate and gemfibrozil). HO-1 or MRP-2 mRNA levels were measured by real-time PCR. Results are presented as means \pm S.D. Statistically significant differences are indicated by asterisks. (Student's t test between control and treated samples: *p < 0.05; **: p < 0.005; ***: p < 0.001).

Figure 5: Effect of fibrates is confirmed on UGT1A1; HO-1 and MRP-2 in liver cells

(A, B and C) HH cells were treated in DMSO (vehicle) or fibrates: or Wy14643 (75 μ M), or ciprofibrate (250 μ M), or gemfibrozil (250 μ M) In Vitro Gro CP medium for 48 h. UGT1A1 (A); MRP-2 (B) or HO-1 (C) mRNA levels were measured by real-time PCR. Results are presented as means \pm S.D. Statistically significant differences are indicated by asterisks. (Student's t test between control and treated samples: *p < 0.05; **: p < 0.005; ***: p < 0.001).

Tableau

TABLE I: Primers and conditions used in PCR analysis

<i>Gene</i>	<i>Primers</i>	<i>Final concentration (nM)</i>	<i>T [°C]</i>
HO-1	FOR 5'-AAGATTGCCAGAAAGCCCTGGAC-3' REV 5'-AACTGTCGCCACCAGAAAGCTGAG-3'	2500	65°C
GAPDH	FOR 5'-TTCATTGACCTCAACTACATGGTTTAC-3' REV 5'-TTGGAGGGATCTCGTCCTG-3'	2000	62 °C
UGT1A1	FOR 5'-GAGAGAGGTGACTGTCCAGGAC-3' REV 5'-CAAATTCCTGGGATAGTGGATTTT-3'	1250	63°C
28s	FOR 5'-AAACTCTGGTGGAGGTCCGT-3' REV 5'-CTTACCAAAAAGTGCCCACTA-3'	2000	Depends on the strategy

FWD: FORWARD; REV: REVERSE; RT-PCR

Figures

Figure 1: Synthesis and metabolism of bilirubin [10].

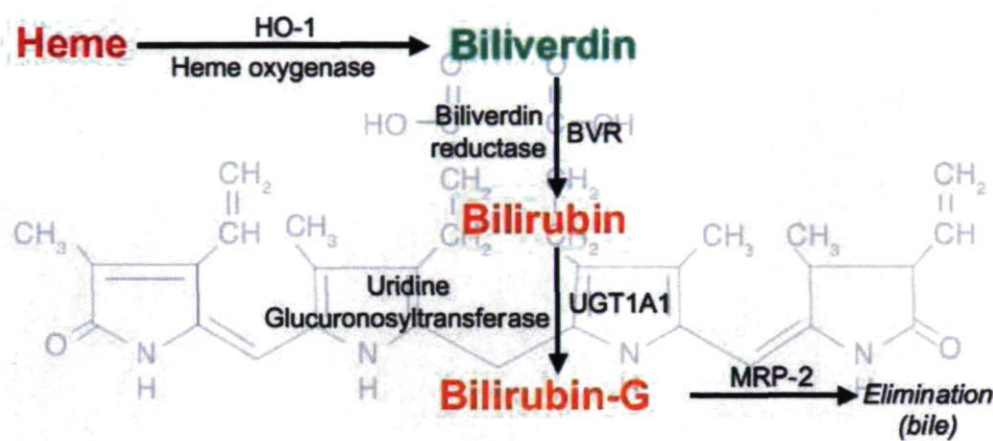


Figure 2: Fibrates induce HO-1 mRNA expression in cells of the vascular wall.

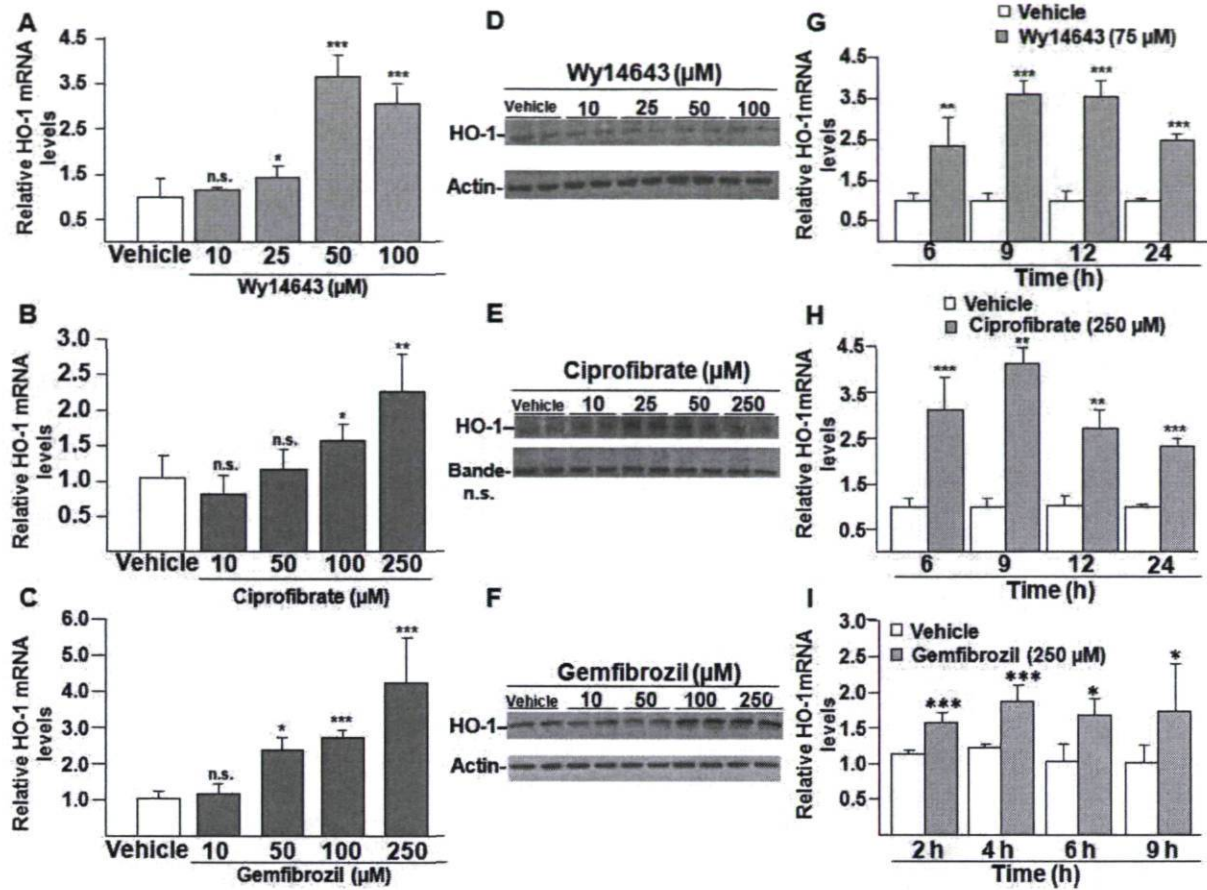


Figure 3: Fibrates induce UGT1A1 mRNA expression in HepG2 cells.

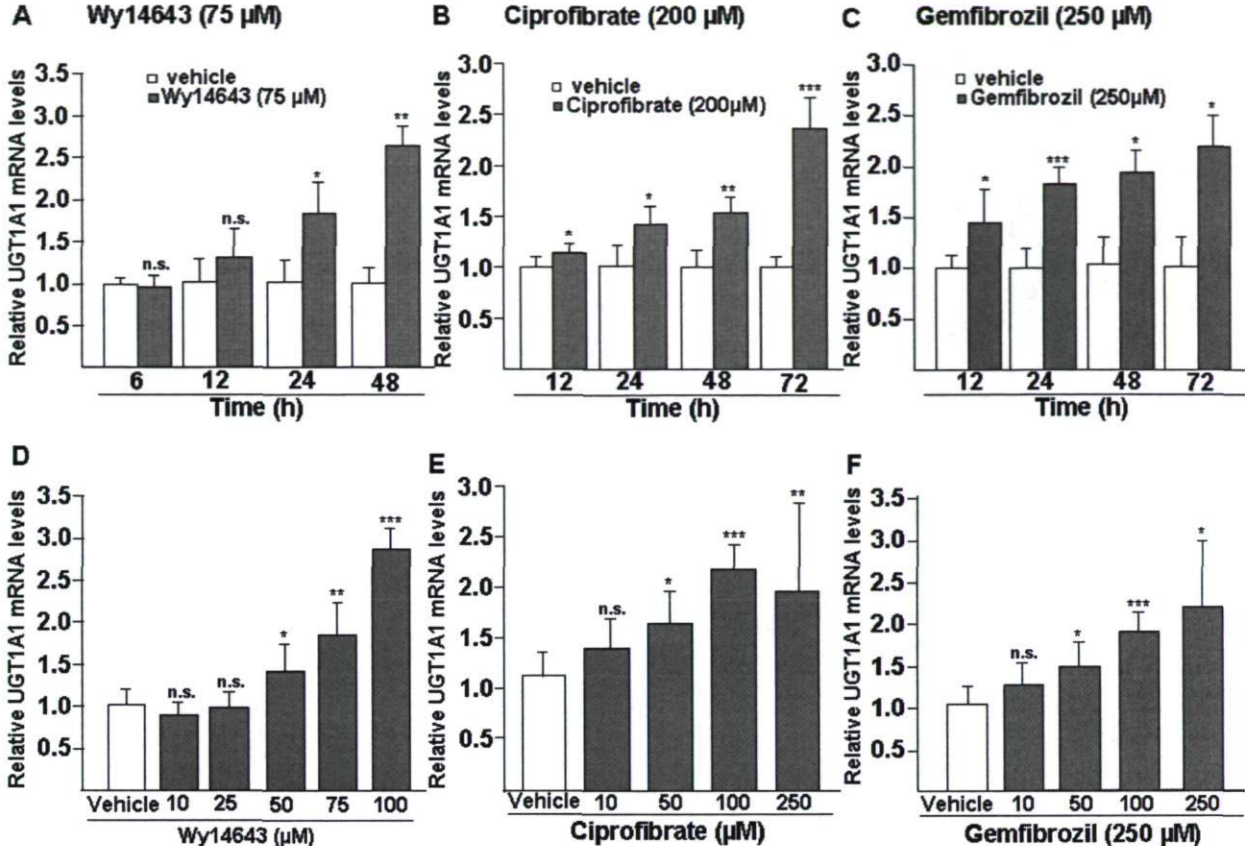


Figure 4: Fibrates modify HO-1 and MRP-2 mRNA expression in hepG2 cells.

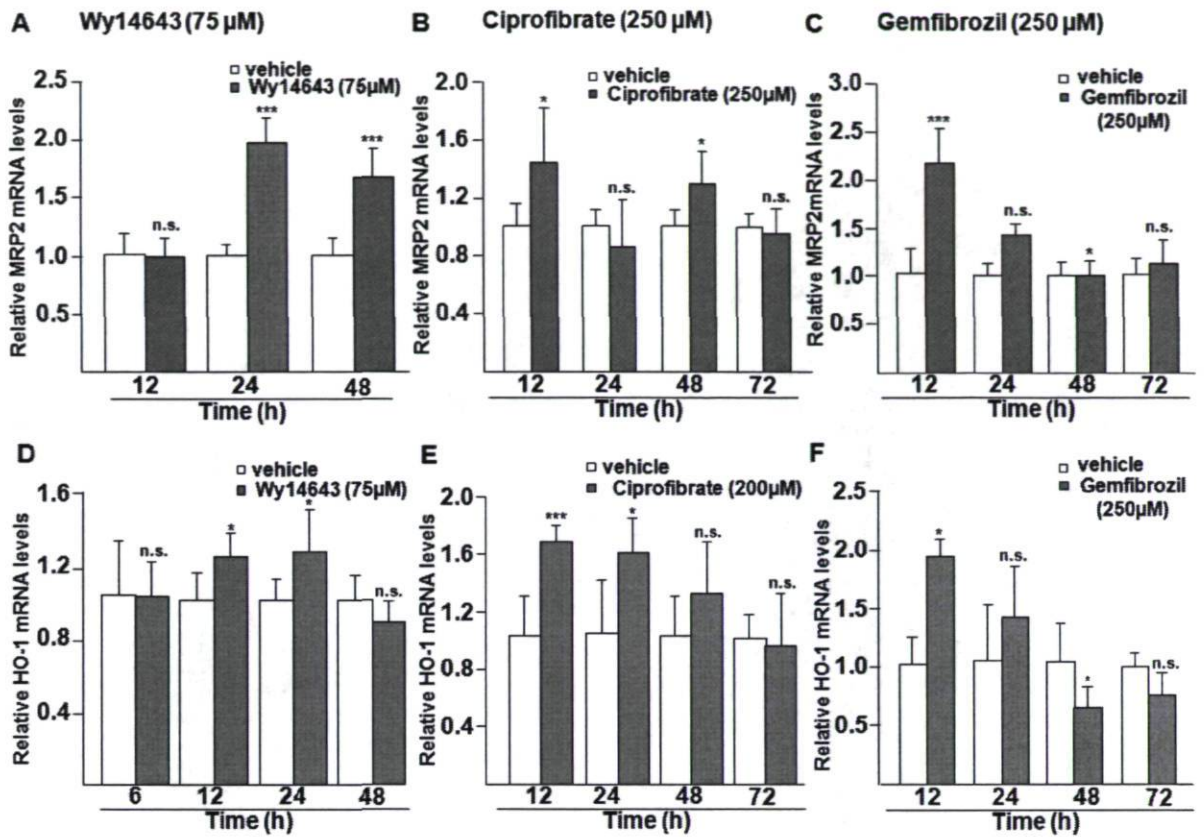
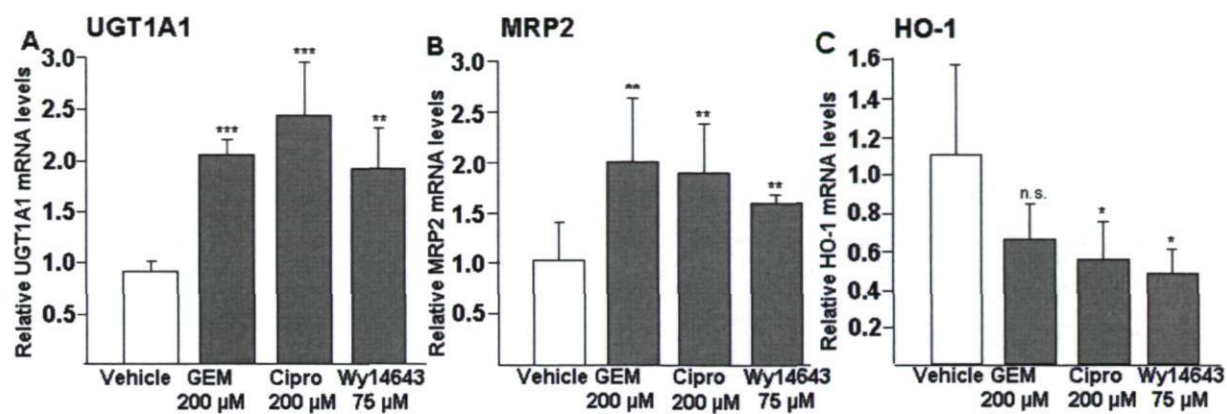


Figure 5: Effect of fibrates is confirmed on UGT1A1; HO-1 and MRP-2 in human hepatocytes.



**CHAPITRE IV : DISCUSSION &
PERSPECTIVES**

5. Discussion

Les interventions thérapeutiques courantes au sujet du traitement de l'hypertriglycéridémie et de l'hypercholestérolémie visant dans la plupart des cas l'athérosclérose, impliquent plusieurs stratégies incluant les dérivés de l'acide fibrique. En effet, l'impact des fibrates sur le métabolisme lipidique est lié à leur capacité d'activer l'expression du récepteur nucléaire PPAR α qui régule la transcription des gènes impliqués dans ce métabolisme : ils visent la régulation des lipoprotéines en stimulant l'expression des gènes de la LPL; de l'apo-I et de l'apo-II et en réduisant l'expression du gène de l'apo-C-III (Staels et al., 1998). Or, le mécanisme d'action moléculaire exacte de cette médication demeure très peu élucidé à ce jour. Dans ces travaux, on propose une action complémentaire du mode d'action des fibrates, toujours en passant par l'étape de l'activation du récepteur nucléaire PPAR α mais couplée à une surexpression locale d'un système antioxydant endogène, la bilirubine. Ce pigment biliaire se distingue aussi par des propriétés anti-inflammatoires (Willis et al., 1996) et anti-athéromateuses (Wu et al., 1996) reconnues dans la littérature.

Avec nos résultats, on a démontré que les fibrates activateurs de PPAR α , induisent la synthèse de la bilirubine par une stimulation du gène de l'enzyme HO-1 (enzyme limitante de la synthèse de ce pigment biliaire dans les cellules de la paroi vasculaire) à une intention athéro-protectrice. Ces travaux pourraient dévoiler ainsi des voies endogènes impliquées dans le mode d'action des fibrates, contribuant à la réduction et à la prévention des MCV *in vivo*. Ces résultats expérimentaux s'appuient sur la capacité antioxydante de la bilirubine, impliquée dans la réduction du stress oxydatif (Stocker et al., 1987), protégeant les lipides membranaires contre les radicaux peroxy et évitant ainsi la formation des LDL-ox, déclencheurs de l'athérosclérose (Schwertner et al., 1994).

D'autre part, au niveau hépatique, l'activation de PPAR α stimule aussi le métabolisme de la bilirubine par une amplification de l'expression de l'UGT1A1 et celle du transporteur MRP-2. Cette stimulation de la glucuronidation de la bilirubine et de son transport dans la bile protège l'organisme contre les accumulations toxiques de ce métabolite et évite un déséquilibre corporel.

Donc, ce projet évoque un modèle original initié par les fibrates, passant par l'activation de PPAR α , tout en gardant un équilibre entre la synthèse de la bilirubine et son métabolisme, à des fins athéro-protectrices.

Effet des activateurs de PPAR α sur HO-1 et BVR

Ces dernières années, une grande attention a été consacrée au rôle de HO-1 et celui de la voie de l'hème-bilirubine-monoxyle de carbone dans le développement de l'athérosclérose (Scott et al., 2007). En fait, l'induction de l'expression de HO-1 a été proposée comme une nouvelle thérapie par Victor et al. (Victor and Rocha, 2007); il a démontré que cette enzyme, par sa propriété antioxydante exprime un effet protecteur contre le stress oxydatif, un processus important dans la pathophysiologie des MCV qui fait état d'une action anti-inflammatoire (Victor and Rocha, 2007). Toujours *in vitro* et d'après des travaux récents réalisés par Gerhard Kronke et al en 2007, une nouvelle notion vient de se rajouter : l'expression de HO-1 est régulée par PPAR α de façon transcriptionnelle, impliquant une protection anti-inflammatoire et antiproliférative (par des activateurs de PPAR α) à travers la surrégulation de HO-1 (Kronke et al., 2007). En fait, nos travaux soutiennent ces rapports et offrent aussi une notion additionnelle : l'implication de la stimulation de HO-1 par l'activation de PPAR α au cours du mode d'action des fibrates, passe par la stimulation de la synthèse de la bilirubine, molécule à puissante capacité antioxydante; le fait qui est à l'origine des protections anti-inflammatoires observées, *in vitro*.

Comme HO-1 est l'enzyme limitante de la synthèse de la bilirubine et d'après les résultats de la présente étude, une stimulation de cette enzyme répond par un accroissement de la synthèse du pigment biliaire dans les cellules de la paroi vasculaires; et de plus, comme on vient de le mentionner, la bilirubine possède un fort pouvoir antioxydant envers les radicaux hydroperoxyls (RO $_2\cdot$) et l'oxygène singulet, donc l'effet antioxydant protecteur de HO-1 est indirect, dépend des métabolites de l'hème libérés par l'enzyme et passe par le pouvoir antioxydant de la bilirubine.

La BVR qui catalyse la réduction de la biliverdine en bilirubine se comporte aussi comme un antioxydant indirect (Stocker, 2004). Ceci explique les raisons pour lesquels, nous nous sommes concentrés surtout sur l'étude de l'effet des fibrates vis-à-vis de ces 2 gènes (HO-1 et BVR) qui sont aussi responsables de la synthèse de la bilirubine. Or selon les résultats

obtenus, l'expression de BVR n'est pas modifiée suite à un traitement aux fibrates (résultats non présentés). Ces résultats sont expliqués par la notion d'enzyme limitante de la synthèse de la bilirubine qui est attribuée à HO-1 et non à BVR (Maines, 1997; Maines and Panahian, 2001). Néanmoins, des travaux récents indiquent que l'action protectrice de la BVR peut être indépendante de la formation de la bilirubine. On explique ceci par le fait que la synthèse de la bilirubine est associée à l'activité kinase de la BVR qui agit dans les cascades transductionnelle du signal, au cours du cycle redox (de la biliverdine-bilirubine) (Miralem et al., 2005). Donc, des travaux supplémentaires seront nécessaires à réaliser pour dévoiler les propriétés et les fonctions précises de l'enzyme BVR.

Par ailleurs, une étude récente s'est concentrée sur l'effet de HO-1 *in vivo* : une sur-régulation pharmacologique de l'expression de HO-1 à l'aide de cobalt protoporphyrine IX chez la souris révèle une montée des propriétés antioxydatives et anti-inflammatoires, alors qu'une inhibition de l'expression de ce gène par injection d'un anti-siRNA HO-1 s'est avérée réductrice des ses effets protecteurs (Benallaoua et al., 2007). Mais la concentration de la bilirubine n'a pas été analysée dans la plupart des études impliquant une sur- ou une sous-régulation de HO-1. Donc cette étude appuie notre modèle de « balance » de la bilirubine régulée par PPAR α , qui pourrait être appliqué et réussi *in vivo*. Pour cela, il serait important d'étudier et de déterminer clairement ce modèle.

Effet des fibrates sur UGT1A1 et MRP-2

Dans nos travaux, on a démontré que le wy14643, le ciprofibrate et le gemfibrozil, ligands de PPAR α , induisent l'expression d'UGT1A1 au fur et à mesure de la durée du traitement et d'une façon dose-dépendante dans les HepG2 ainsi que dans les HH. En effet, en plus des gènes lipidiques, les UGTs constituent aussi des gènes cibles régulés par PPAR α qui est fortement exprimé au niveau hépatique chez l'humain. Ces résultats confirment plusieurs travaux publiés récemment; Chlouchi et al ont démontré qu'un traitement au clofibrate stimule l'expression de l'UGT1A1 dans les hépatocytes de rats stimulant ainsi la glucuronidation de la bilirubine (Chlouchi et al., 2007). Également, d'autres rapports évoquent que le Wy14643, activateur synthétique de PPAR α , stimule aussi fortement et significativement l'expression de l'UGT1A1 dans des HH et des hépatocytes isolés à partir de souris transgéniques (TG-UGT1) ainsi que l'expression d'autres UGTs, *in vitro* (Senekeo-Effenberger et al., 2007).

En outre, *in vivo*, une administration orale par gavage de Wy14643 à d'autres souris transgéniques (TG-UGT1), montre une importante induction de l'UGT1A1 au niveau du foie et de l'intestin (Senekeo-Effenberger et al., 2007). Pareillement, d'autres travaux ont révélé que les activateurs de PPAR α amplifient l'expression d'UGT1A1 dans les cellules de foie de souris C57BL/6, *in vivo* (Buckley and Klaassen, 2009).

Donc, les fibrates qui sont des activateurs de PPAR α , semblent bien être des modulateurs de l'activité de l'enzyme responsable de la glucuronidation de la bilirubine, l'UGT1A1. La bilirubine est ainsi conjuguée et éliminée dans la bile; et par conséquent la balance entre la synthèse et le métabolisme de ce métabolite sera rétablie (après induction de sa synthèse par la stimulation de HO-1) et l'organisme sera protégé de ses accumulations toxiques.

Finalement, nous avons prouvé que les fibrates induisent modérément l'expression du transporteur MRP-2 responsable de l'élimination de la bilirubine dans la bile. Donc, selon nos résultats obtenus, les fibrates induisent fortement l'expression de l'UGT1A1 et modérément celle de MRP-2. Ceci pourra engendrer la situation suivante : une production hépatique de bilirubine glucuronidée excédante à la capacité d'élimination par MRP-2 et qui pourra se finir par une accumulation hépatique de bilirubine glucuronidée. Cette situation est semblable à celle de la maladie de Dubin-Johnson qui est défini comme un ictère héréditaire de l'adulte à bilirubine conjuguée, lié à un déficit de l'excrétion de cette dernière dans la bile. L'anomalie est à l'origine d'une absence d'expression du gène de MRP-2, localisé sur le chromosome 10q24. La maladie est totalement bénigne. Il n'y a aucun traitement et l'espérance de vie du patient est normale (Nisa and Ahmad, 2008).

Donc une induction modérément élevée de MRP-2 par les fibrates n'a aucun effet désavantageux et renforce l'idée d'aborder des travaux concernant l'essai de ce modèle de « balance de la bilirubine » *in vivo*.

Cependant, cette possibilité d'exprimer le syndrome de Dubin-Johnson dû à un effet différentiel des agonistes de PPAR α sur UGT1A1 et MRP2 ne peut être qu'une hypothèse suggérée, surtout que le rôle de PPAR α dans le foie humain n'est pas encore clairement défini. En plus, la vérification de cet effet à l'aide d'un modèle animal, à titre d'exemple le modèle de souris transgéniques (TG-UGT1), traité à l'aide du Wy14643, décrit par Senekeo-Effenberger et ses collègues, ne peut être fiable, car il a été démontré que les fonctionnalités de PPAR α ne sont pas semblables chez l'humain et chez la souris. En effet,

la concentration hépatique de PPAR α chez la souris est plus élevée que celle observée dans le foie humain (Desvergne and Wahli, 1999). Toutefois, les résultats obtenus par Seneko-Effenberg et ses collègues ne montrent pas une induction «dramatique» de l'expression d'UGT1A1 à l'aide du traitement au Wy14643. Le fait qui permettra de dire qu'un effet différentiel des agonistes de PPAR α sur UGT1A1 et MRP2 n'est pas forcément très exprimé suite à un traitement à ces activateurs pharmacologiques. Ce point devrait donc être abondamment étudié.

Cependant, l'approche méthodologique de cette étude est concentrée uniquement sur l'examen de l'expression génique. Il aurait été idéale de la compléter par une étude de l'effet des agonistes de PPAR α sur la production de la bilirubine et de la bilirubine glucuronidée. Cette analyse aurait été réalisée de la façon suivante : cultiver des HUVEC en absence et en présence de doses pharmacologiques d'activateurs de PPAR α . En plus du fait d'analyser les niveaux d'ARNm et de protéines de HO-1 et BVR respectivement par PCR en temps réel et immunobuvardage, il aurait été intéressant de doser par chromatographie liquide et spectrométrie de masse la formation de bilirubine par les cellules traitées ou non (contrôle). Ces analyses permettront déterminer et de valider les résultats obtenus en expression géniques : si en favorisant la synthèse de bilirubine, les activateurs pharmacologiques activent les propriétés anti-oxydantes de ce métabolite de l'hème, et ainsi réduisent l'athérosclérose.

Enfin, toutes ces notions réunies ensemble cèdent une forte probabilité de l'implication de l'activité antioxydante et anti-athéromateuse de la bilirubine dans le mode d'action moléculaire des dérivés fibriques, passant par la régulation des gènes impliqués par PPAR α . Il reste alors à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse de l'expression des gènes HO-1; UGT1A1 et MRP-2 vis-à-vis de PPAR α . Or selon ce qui est mentionné dans la littérature (et expliqué dans le § 4.5.3.3), PPAR α régule la transcription des gènes ayant dans leurs promoteurs un élément de réponse au PPARs. Cette notion sera effectivement intéressante à vérifier *in vivo*.

6. Perspectives

D'autres molécules pharmacologiques en cours de développement, ont été identifiées comme capables de stimuler simultanément la formation de bilirubine dans les cellules de la paroi vasculaire et son métabolisme au niveau hépatique. Cette nouvelle approche thérapeutique sont les agonistes du récepteur nucléaire aux oxystérols (LXR α) ou Liver X Receptor. LXR α est un régulateur majeur de l'homéostasie des lipides et ses activateurs pharmacologiques constituent une nouvelle cible potentielle en cours de développement dans le traitement de l'athérosclérose. Pareillement à PPAR α , LXR α fonctionne comme un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (Peet et al., 1998) qui sont activés par des signaux lipophiles (voir rappel sur les récepteurs nucléaires, § 4.5.3.1.1.). Similairement à PPAR α , LXR α forme un hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR de l'acide 9 cis-rétinoïque (Lobaccaro et al., 2001). Il est surtout exprimé au niveau des tissus ayant un fort métabolisme lipidique comme les tissus hépatiques, les tissus adipeux et les macrophages. Ce récepteur nucléaire régule l'expression des gènes impliqués dans le transport et le catabolisme du cholestérol (Repa et al., 2000). LXR α est activé par des ligands endogènes correspondant à des dérivés oxydés du cholestérol, nommés oxystérols et qui dépendent de leur lieu de synthèse (Janowski et al., 1999), tels que : le 24S-hydroxy-cholestérol (24(S)OH-cholestérol) retrouvé dans le cerveau et le plasma ou le 27-hydroxycholestérol (27-OH-cholestérol) qui est retrouvé dans les macrophages et le plasma. Une série d'activateurs synthétiques ont été également générés (le T0901317 et GW3965) présentant aussi un intérêt dans le traitement de l'athérosclérose. Ce récepteur nucléaire, LXR α , activé par un activateur pharmacologique, est qualifié de facteur hypocholestérolémiant (Repa and Mangelsdorf, 2002) parce qu'il est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes lipidiques (Figure 17). Les transporteurs membranaires ABC (ATP-binding cassette), comme ABC1/ABCA1 (Repa et al., 2000) retrouvé au niveau de l'intestin ou des macrophages, constitue l'une des cibles de LXR α . Ce transporteur est responsable de la régulation de l'apport de cholestérol alimentaire et notamment du cholestérol contenu dans les macrophages, limitant ainsi la transformation de ces dernières en cellules spumeuses, cellules pro-athéroscléreuse. LXR α activé, stimule, aussi, la régulation de la CETP, qui est responsable du transfert des lipides entre

les différents compartiments lipidiques (Luo and Tall, 2000) tout en favorisant le transport inverse du cholestérol (le cholestérol excédentaire est estérifié et stocké dans des gouttelettes lipidiques qui seront transférées vers les HDL et acheminées jusqu'au foie où ils seront éliminés) qui a un rôle anti-athérogène. La protéine de transfert des phospholipides (PLTP) impliquée dans le métabolisme des HDL est également régulée par LXR α activé (Cao et al., 2002). De même, l'action des apo-E et apo-C régulant l'équilibre plasmatique des différentes lipoprotéines, est stimulée par LXR α activé (Laffitte et al., 2001). Enfin, LXR α activé, régule également d'une façon directe l'action de la LPL, impliquée dans le métabolisme des acides gras (Zhang et al., 2001) (Figure 17).

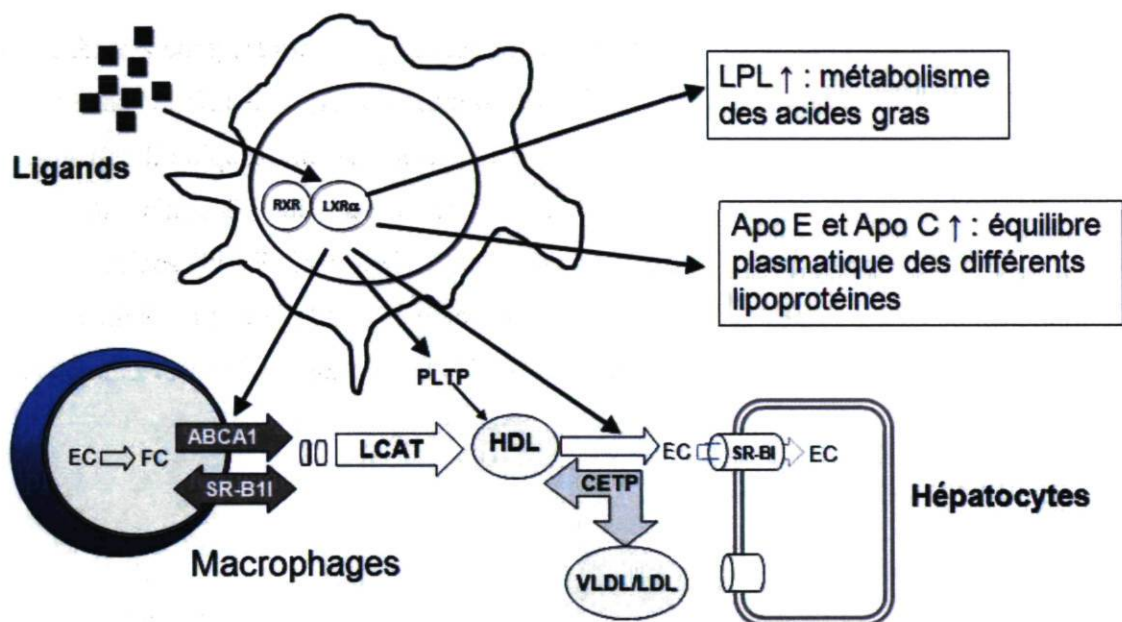


Figure 17 : Mode d'action de LXR α

On a réalisé des expérimentations préliminaires au sujet de cette nouvelle approche thérapeutique et les résultats obtenus sont représentés ci-dessous.

Similairement à l'effet observé dans les parois vasculaires dans le cas des fibrates, les activateurs de LXR α induisent significativement le niveau d'ARNm de HO-1 de façon durée-dépendante de 6 à 24h associé à une élévation maximale marquée à 6h (3,25 fois supérieures à la normale) (Figure 18A). L'induction de l'expression de HO-1 par T0901317, en *time course* a été aussi validée par immunobavardage, pour ces mêmes

durées indiquées (Figure 18B). Également, en dose réponse, T0901317 amplifie significativement l'expression de HO-1 de façon, dose-dépendante, et son expression maximale a été observée à une dose de 10 μ M pour une induction significative de 3.25 fois davantage (Figure 18C). De plus, les agonistes endogènes de LXR α , le 24S-OHcholestérol et le 27-OHcholestérol stimulent aussi l'expression de HO-1 après 12h de traitement, respectivement 3,75 et 2,6 davantage (Figure 18D).

Cependant, concernant l'expression de BVR (similairement à l'effet observé dans le cas des fibrates), selon des résultats préliminaires, aucun effet inductible significative par les agonistes de LXR α n'a été observé.

De même, similairement à l'effet observé au niveau hépatique dans le cas des fibrates, les ligands de LXR α stimulent l'expression des enzymes de métabolisme de la bilirubine. Suite aux traitements des Hep G2 à l'éthanol ou au T0901317, pour des durées variables de 12 à 72h, les niveaux d'ARNm de l'UGT1A1 et de MRP-2 ont été déterminés par PCR en temps réel. Ces expérimentations préliminaires ont montré que les activateurs de LXR α stimulent significativement l'expression de l'UGT1A1, de façon durée-dépendante, l'augmentation maximale a été marquée à 48h pour une valeur de 4.1 fois plus que le contrôle (Figure 19A). Les ligands endogènes ont aussi accru l'activité de l'UGT1A1 pour des valeurs de 3,25 et 1,75, respectivement au 24S- et au 27-OHcholestérol (Figure 19B). Cependant, comme les fibrates, les activateurs de LXR α ont légèrement modulé l'expression de MRP-2 au cours des *time course* des HepG2 (Figure 19C et Figure 19D). Des effets très variables ont été observés aux différentes durées de traitements, aussi bien pour le ligand synthétique (T0901317) que pour les oxystérols. Une induction très légère par le T0901317 a été marquée à 12, 24 et 48h, contrairement, à 72h aucune affection n'a été observée (effet non significatif) (Figure 19C).

Aussi, on a testé l'effet des activateurs de LXR α sur l'expression hépatique de l'UGT1A1 et celle du transporteur MRP-2. Des HH ont été traitées à l'éthanol ou au T0901317 (1.0 μ M), ces expérimentations soulignent également l'élévation significative du niveau d'ARNm de l'UGT1A1 chez tous les donneurs (Figure 20A). Ces inductions sont variables d'un individu à un autre, dues aux variabilités interindividuelles. La légère stimulation de l'activité de MRP-2 par T0901317 a été aussi montrée au niveau hépatique, chez ces donneurs (Figure 20B).

Donc les activateurs synthétiques et endogènes de LXR α permettent aussi une induction de l'expression des gènes responsables de la conjugaison et de l'élimination de la bilirubine afin d'éviter son accumulation à des niveaux toxiques.

Finalement, ce projet sur les agonistes de LXR α , nouvelles molécules pharmacologiques en cours de développement, montre selon nos résultats préliminaires, leur capacité à stimuler simultanément la formation de bilirubine dans les cellules de la paroi vasculaire et son métabolisme au niveau hépatique. Ceci reflète également la probabilité de l'implication de l'activité antioxydante et anti-athéromateuse de la bilirubine dans le mode d'action athéro-protecteur attribué à ces agonistes de LXR α . Il serait donc intéressant de continuer ce projet et effectivement d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse de l'expression des gènes HO-1; UGT1A1 et MRP-2 aux ligands de LXR α , et enfin, vérifier ces données *in vivo*.

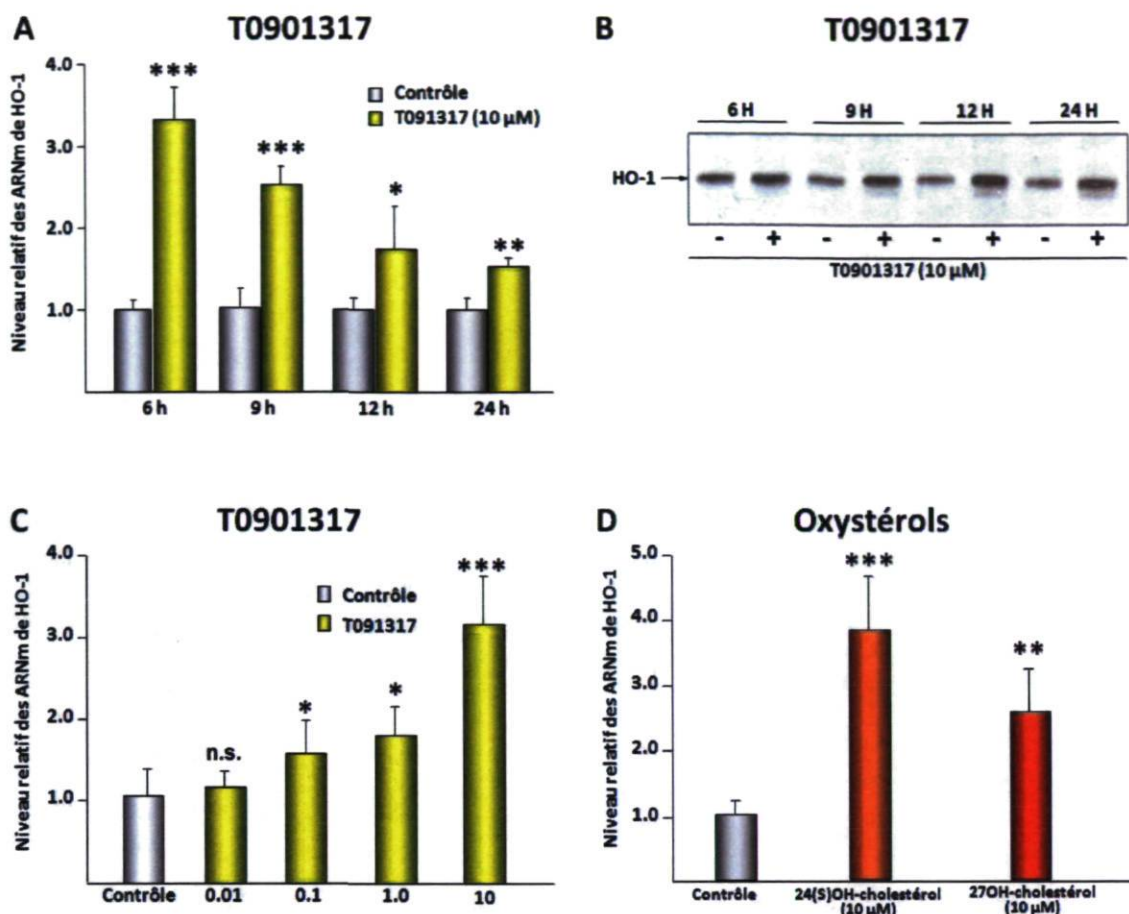


Figure 18 : Les agonistes de LXR α induisent l'expression de HO-1 dans les cellules de la paroi vasculaires.

(A et D), des HUVECs traitées, en *time course* à l'éthanol (contrôle) ou à T0901317 (10 μ M) ou à des agonistes endogènes de LXR α (10 μ M), le 24S-OHcholestérol et le 27-OHcholestérol, pour les durées indiquées : 6 à 9h dans le cas du T0901317 et 12h de traitement dans le cas des agonistes naturels. (B), des HUVEC ont été traitées, en *time course*, à l'éthanol (contrôle) ou au T0901317 (10 μ M) de 6 à 24h. Les protéines totales ont été extraites selon le protocole de l'acide phénolique, le Tri-Reagent. 20 μ g de protéines ont été séparées selon leur grandeur par un gel SDS-polyacrylamide de 12% et hybridées avec un anticorps anti-HO-1 (dilution 1:5000). La même quantité de protéines a été aussi hybridée avec l'anticorps anti-actine, considéré comme un contrôle (auquel est vérifiée l'égalité les quantités de protéines utilisées). Ensuite, le niveau relatif de protéine a été quantifié à l'aide de « BioImage Visage 110s (Genomic Solution, Ann Arbor, MI, U.S.A.) ». (C), Des cellules d'HUVEC ont été traitées, en dose réponse, à l'éthanol (contrôle) ou au T0901317 (0.01 à 10 μ M) dans le milieu EGM (Endothelial Cell Growth Medium), supplémenté à 2% de FBS (Foetal Bovin serum), pour 6h.

Le niveau d'expression de HO-1 à été analysé par PCR en temps réel et normalisé par rapport à l'expression du gène GAPDH. Les différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités a été indiquées par des astérix (Test T Student : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.001$).

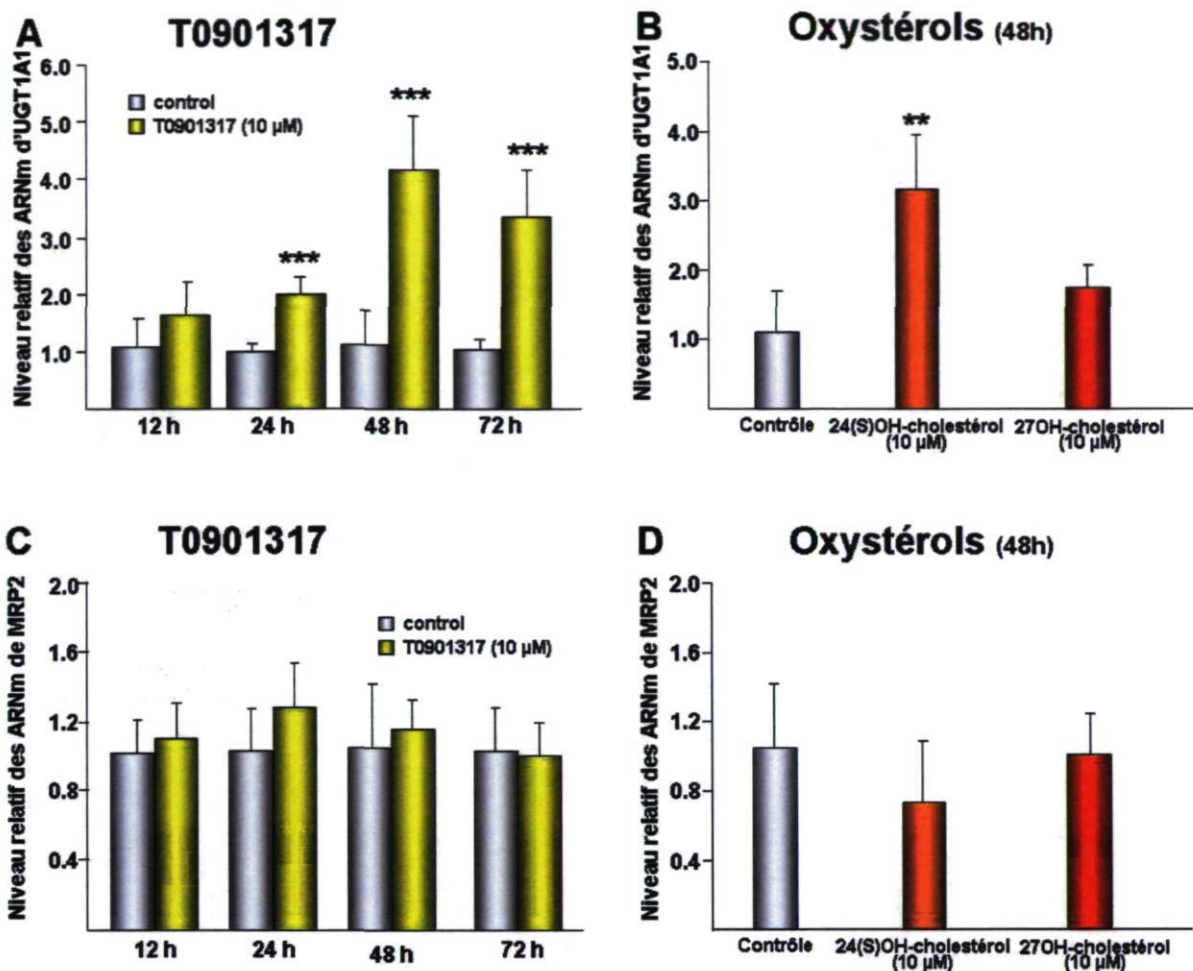


Figure 19 : Les agonistes de LXR α induisent l'expression d'UGT1A1 et légèrement celle de MRP-2 dans les cellules hepG2.

(A, B, C et D) des HUVECs traitées, en *time course* à l'éthanol (contrôle) ou à T0901317 (10 μ M) ou à des agonistes endogènes de LXR α (10 μ M), le 24(S)OH-cholestérol et le 27-OH-cholestérol, dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), pour les durées indiquées : 12 à 72 h dans le cas du T0901317 et 48h de traitement dans le cas des agonistes naturels. Après extraction des ARN, les niveaux d'expression des gènes UGT1A1 et MRP-2 ont été analysés par PCR en temps réel et normalisés par rapport à l'expression du gène 28S. Les différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités ont été indiquées par des astéris (Test T Student : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.001$).

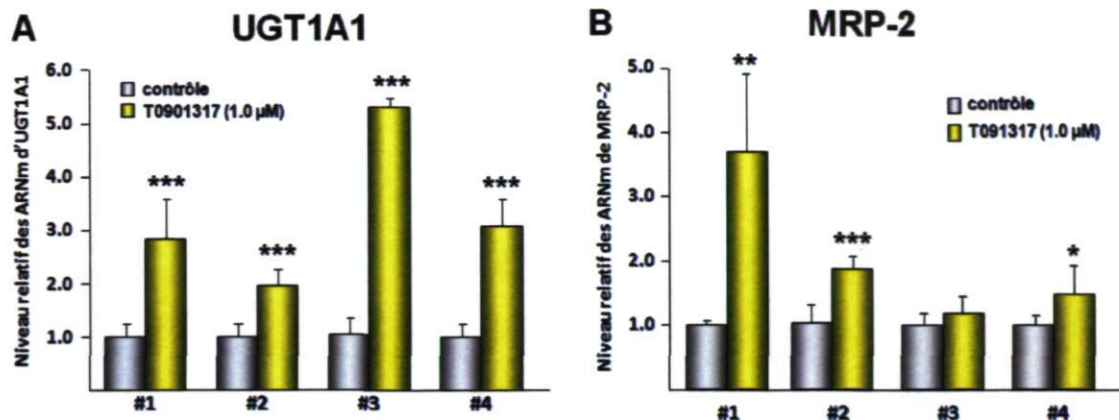


Figure 20 : Les agonistes de LXR α induisent l'expression d'UGT1A1 et faiblement celle de MRP-2 dans les hépatocytes humaines en culture primaire.

(A et B) Des cellules HH provenant de 4 donneurs différents, ont été traitées à l'éthanol (contrôle) ou au T0901317 (1.0 μ M) pour 48h dans un milieu, « in InVitroGro HI medium » pour 48h. Après extraction des ARN, les niveaux d'expression des gènes UGT1A1 et MRP-2 ont été analysés par PCR en temps réel et normalisés par rapport à l'expression du gène 28S. Les différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités ont été indiquées par des astéris (Test T Student : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.001$).

CHAPITRE V : CONCLUSION

Malgré les progrès marqués au cours de la dernière décennie, nous restons loin d'une solution complète à l'athérosclérose. Les drogues hypocholestérolémiantes sont de plus en plus prescrites dans le monde, en Amérique du Nord et notamment au Canada, où ces prescriptions comptent pour 19% de la totalité de médicaments prescrites, durant les dernières années. Ce qui indique qu'une grande proportion de la population mondiale est concernée par les propriétés thérapeutiques de ces médicaments (Entred, 2003). Ce projet a permis de valider une explication pharmacologique supplémentaire du mode d'action des fibrates, résultant en une élévation modérée de la concentration locale de la bilirubine et profitant de ses capacités antioxydantes pour agir en un effet athéro-protecteur. Donc, c'est un modèle original, initié par les fibrates et basé sur une balance entre l'induction de la synthèse de la bilirubine et celle de son métabolisme *in vitro*. Il permet aussi une meilleure compréhension de l'activité pharmacologique des fibrates et des effets cliniques observés afin d'améliorer la connaissance des mécanismes complexes qui sont à l'origine des lésions d'athérosclérose.

Également, on pourrait conclure qu'un contrôle du niveau sérique de la bilirubine pourrait être considéré comme une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des MCV et de même cette étude ouvre des voies sur la recherche de nouvelles molécules ciblant l'induction de la synthèse de la bilirubine ou de son métabolisme ou les deux effets simultanément, à titre d'exemple, les activateurs de LXR α . On pourrait également tester ces effets dans le cas des statines. Il reste aussi à vérifier ces notions sur un modèle animal.

Bibliographie

- ADA (2002) American Diabetes Association position statement: evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *J Am Diet Assoc* **102**:109-118.
- Adin CA, Croker BP and Agarwal A (2005) Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**:F778-784.
- Alam J, Igarashi K, Immenschuh S, Shibahara S and Tyrrell RM (2004) Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxid Redox Signal* **6**:924-933.
- Altschul R, Hoffer A and Stephen JD (1955) Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch Biochem* **54**:558-559.
- Amit Y and Boneh A (1993) Bilirubin inhibits protein kinase C activity and protein kinase C-mediated phosphorylation of endogenous substrates in human skin fibroblasts. *Clin Chim Acta* **223**:103-111.
- Anitschkow N and Chaladow S (1913) Ueber experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralbl Allg Pathol* **24**:1-9.
- Aono S, Yamada Y, Keino H, Hanada N, Nakagawa T, Sasaoka Y, Yazawa T, Sato H and Koiwai O (1993) Identification of defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochem Biophys Res Commun* **197**:1239-1244.
- Aschoff L (1906) Verh Deutsch Path Ges 1906; 10:166. Quoted by Schonhelmer, R. *Z Physiol Chem* 1926;160:61.
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M and Vidal H (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**:1319-1327.
- Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC and Krauss RM (1988) Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *Jama* **260**:1917-1921.
- Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL and Humphries SE (2004) Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol* **160**:407-420.
- Ayoob KT, Duyff RL and Quagliani D (2002) Position of the American Dietetic Association: food and nutrition misinformation. *J Am Diet Assoc* **102**:260-266.

- Bailey A, Robinson D and Dawson AM (1977) Does Gilbert's disease exist? *Lancet* **1**:931-933.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD and Snyder SH (2002) Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16093-16098.
- Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C and Staels B (2002) Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:717-726.
- Barrett-Connor EL, Cohn BA, Wingard DL and Edelman SL (1991) Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *Jama* **265**:627-631.
- Benallaoua M, Francois M, Batteux F, Thelier N, Shyy JY, Fitting C, Tsagris L, Boczkowski J, Savouret JF, Corvol MT, Poiraudou S and Rannou F (2007) Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum* **56**:2585-2594.
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, 3rd, Tracy RE and Wattigney WA (1998) Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* **338**:1650-1656.
- Berg CL, Radomska A, Lester R and Gollan JL (1995) Membrane translocation and regulation of uridine diphosphate-glucuronic acid uptake in rat liver microsomal vesicles. *Gastroenterology* **108**:183-192.
- Berk PD, Howe RB, Bloomer JR and Berlin NI (1969) Studies of bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest* **48**:2176-2190.
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD and Lusis AJ (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91**:2488-2496.
- Berthou L, Duverger N, Emmanuel F, Langouet S, Auwerx J, Guillouzo A, Fruchart JC, Rubin E, Deneffe P, Staels B and Branellec D (1996) Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest* **97**:2408-2416.
- Bonetti PO, Lerman LO and Lerman A (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:168-175.
- Bonser RS, Pagano D, Lewis ME, Rooney SJ, Guest P, Davies P and Shimada I (2000) Clinical and patho-anatomical factors affecting expansion of thoracic aortic aneurysms. *Heart* **84**:277-283.
- Borghesi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U and Novarini A (2002) Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* **346**:77-84.
- Bosma PJ (2003) Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* **38**:107-117.
- Bosma PJ, Goldhoorn B, Oude Elferink RP, Sinaasappel M, Oostra BA and Jansen PL (1993) A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase isoform 1 causing Crigler-Najjar syndrome type II. *Gastroenterology* **105**:216-220.

- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR and Jansen PL (1994) Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* **269**:17960-17964.
- Bouvenot G, Devulder B, Guillevin L, Queneau P and Schaeffer A (1995) *Pathologie médicale: Pneumologie, néphrologie, oncologie, nutrition*. Elsevier Masson, paris.
- Breimer LH, Wannamethee G, Ebrahim S and Shaper AG (1995) Serum bilirubin and risk of ischemic heart disease in middle-aged British men. *Clin Chem* **41**:1504-1508.
- Brodersen R (1979) Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid. *J Biol Chem* **254**:2364-2369.
- Bruckert E and Chapman J (1994) Récepteur des lipoprotéines de basse densité et hypercholestérolémie. *La Revue du praticien* **44**:1287-1293.
- Buchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T and Keppler D (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* **271**:15091-15098.
- Buckley DB and Klaassen CD (2009) Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Drug Metab Dispos* **37**:847-856.
- Campbell SD, de Morais SM and Xu JJ (2004) Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP 1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chem Biol Interact* **150**:179-187.
- Cao G, Beyer TP, Yang XP, Schmidt RJ, Zhang Y, Bensch WR, Kauffman RF, Gao H, Ryan TP, Liang Y, Eacho PI and Jiang XC (2002) Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J Biol Chem* **277**:39561-39565.
- CDC (2004) Preventing Heart Disease and Stroke. Addressing the Nation's Leading Killers, Atlanta, GA. Available at <http://www.cdc.gov/nccdphp> (Prevention CfDCA ed.
- Chalasani N, Chowdhury NR, Chowdhury JR and Boyer TD (1997) Kernicterus in an adult who is heterozygous for Crigler-Najjar syndrome and homozygous for Gilbert-type genetic defect. *Gastroenterology* **112**:2099-2103.
- Chambolle M (2002) L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments : évolutions scientifiques et réglementaires. *Med Nutr* **38**:15-23.
- Chapman MJ (2003) Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* **171**:1-13.
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V and Staels B (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* **7**:53-58.

- Chlouchi A, Girard C, Bonet A, Viollon-Abadie C, Heyd B, Manton G, Martin H and Richert L (2007) Effect of chrysin and natural coumarins on UGT1A1 and 1A6 activities in rat and human hepatocytes in primary culture. *Planta Med* **73**:742-747.
- Choinière R (2003) La mortalité au Québec :une comparaison internationale, INSPQ, Institut national de santé publique du Québec, Québec.
- Cohen A (1997) *Cardiologie et pathologie vasculaire*, Paris
- Cohen L, Lewis C and Arias IM (1972) Pregnancy, oral contraceptives, and chronic familial jaundice with predominantly conjugated hyperbilirubinemia (Dubin-Johnson syndrome). *Gastroenterology* **62**:1182-1190.
- Cohn JS (2002) Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **13**:19-24.
- Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, Davignon J and Steiner G (2004) Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:3949-3955.
- Coulston AM and Johnson RK (2002) Sugar and sugars: myths and realities. *J Am Diet Assoc* **102**:351-353.
- Dagenais GR, Yi Q, Mann JF, Bosch J, Pogue J and Yusuf S (2005) Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease. *Am Heart J* **149**:54-60.
- DAIS (2001) Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet* **357**:905-910.
- Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR and Mann J (1993) Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* **69**:377-381.
- De Gennes JL (1971) [Idiopathic hyperlipemia. Proposition of a simplified classification]. *Presse Med* **79**:791-795.
- de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM and Hofker MH (2000) Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:290-297.
- Dejager S, Mietus-Snyder M and Pitas RE (1993) Oxidized low density lipoproteins bind to the scavenger receptor expressed by rabbit smooth muscle cells and macrophages. *Arteriosclerosis and thrombosis* **13**:371-378.
- Dejager S and Turpin G (1998) Hétérogénéité des LDL et potentiel athérogène. *Sang Thrombose Vaisseaux* **10**:5-14.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G and Staels B (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* **274**:32048-32054.

- Desvergne B and Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**:649-688.
- Devine A, Wilson SG, Dick IM and Prince RL (2002) Effects of vitamin D metabolites on intestinal calcium absorption and bone turnover in elderly women. *Am J Clin Nutr* **75**:283-288.
- Djousse L, Levy D, Cupples LA, Evans JC, D'Agostino RB and Ellison RC (2001) Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. *Am J Cardiol* **87**:1196-1200; A1194, 1197.
- Drummond GS and Kappas A (2004) Chemoprevention of severe neonatal hyperbilirubinemia. *Semin Perinatol* **28**:365-368.
- Dudnik LB and Khrapova NG (1998) Characterization of bilirubin inhibitory properties in free radical oxidation reactions. *Membr Cell Biol* **12**:233-240.
- Dutton GJ (1980) *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Elias SL and Innis SM (2002) Bakery foods are the major dietary source of trans-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. *J Am Diet Assoc* **102**:46-51.
- Endo A (1992) The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* **33**:1569-1582.
- English DR, Holman CDJ, Milne E, Winter MG, Hulse GK, Codde JP, Bower CI, Corti B, de Klerk N, Knuiman MW, Kurinczuk JJ, Lewin GF and Ryan GA (1995) The quantification of drug caused morbidity and mortality in Australia, 1995 edition. (Health CCDoHSa ed.
- Enmark E and Gustafsson JA (2001) Comparing nuclear receptors in worms, flies and humans. *Trends Pharmacol Sci* **22**:611-615.
- Entred (2003) Prise en charge thérapeutique du risque cardiovasculaire des personnes ayant un diabète de type 2 (DT2), diaporama construit par Anne Fagot-Campagna, Isabelle Romon, et Claire Marant, de l'Institut de Veille Sanitaire (programme diabète), et validé par le comité scientifique d'Entred (Mise à jour le 15.12.2006). [http : //www.invs.sante.fr/entred](http://www.invs.sante.fr/entred).
- ErratumPublished (2001) Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet* **357**:905-910.
- Escher P and Wahli W (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* **448**:121-138.
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G and Jurgens G (1990) Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol* **3**:77-92.
- Etgen GJ and Mantlo N (2003) PPAR ligands for metabolic disorders. *Curr Top Med Chem* **3**:1649-1661.
- Falk E (1999) Stable versus unstable atherosclerosis: clinical aspects. *Am Heart J* **138**:S421-425.

- Farnier M (2002) Ezetimibe in hypercholesterolaemia. *Int J Clin Pract* **56**:611-614.
- Fdmcd (2003) Le fardeau croissant des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada (Canada Fdmcd ed, Ottawa.
- Feverly J (2008) Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int* **28**:592-605.
- Feverly J, Blanckaert N, Heirwegh KP, Preaux AM and Berthelot P (1977) Unconjugated bilirubin and an increased proportion of bilirubin monoconjugates in the bile of patients with Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar disease. *J Clin Invest* **60**:970-979.
- Feverly J, Vanstapel F and Blanckaert N (1989) Bile pigment metabolism. *Baillieres Clin Gastroenterol* **3**:283-312.
- Ford I, Murray H, Packard CJ, Shepherd J, Macfarlane PW and Cobbe SM (2007) Long-term follow-up of the West of Scotland Coronary Prevention Study. *N Engl J Med* **357**:1477-1486.
- Fredrickson DS, Levy RI and Lees RS (1967) Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* **276**:273-281 concl.
- Fremann D, Linseisen J and Wolfram G (2002) Dietary conjugated linoleic acid (CLA) intake assessment and possible biomarkers of CLA intake in young women. *Public Health Nutr* **5**:73-80.
- Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V and et al. (1987) Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* **317**:1237-1245.
- Fruchart JC (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and high-density lipoprotein metabolism. *Am J Cardiol* **88**:24N-29N.
- Gagne C, Bays HE, Weiss SR, Mata P, Quinto K, Melino M, Cho M, Musliner TA and Gumbiner B (2002a) Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* **90**:1084-1091.
- Gagne C, Gaudet D and Bruckert E (2002b) Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* **105**:2469-2475.
- Galis ZS, Alavi MZ and Moore S (1993) Co-localization of aortic apolipoprotein B and chondroitin sulfate in an injury model of atherosclerosis. *Am J Pathol* **142**:1432-1438.
- Gall WE, Zawada G, Mojarrabi B, Tephly TR, Green MD, Coffman BL, Mackenzie PI and Radominska-Pandya A (1999) Differential glucuronidation of bile acids, androgens and estrogens by human UGT1A3 and 2B7. *J Steroid Biochem Mol Biol* **70**:101-108.
- Gantla S, Bakker CT, Deocharan B, Thummala NR, Zweiner J, Sinaasappel M, Roy Chowdhury J, Bosma PJ and Roy Chowdhury N (1998) Splice-site mutations: a

- novel genetic mechanism of Crigler-Najjar syndrome type 1. *Am J Hum Genet* **62**:585-592.
- Giral P (1998) Athérome : Anatomie pathologique, physiopathologie, épidémiologie et facteurs de risque, prévention. *La Revue du praticien* **48**: 99-106.
- Glass CK and Ogawa S (2006) Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **6**:44-55.
- Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS and Popescu NC (2001) Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* **11**:357-368.
- Gretebeck RJ, Gretebeck KA and Tittelbach TJ (2002) Glycemic index of popular sport drinks and energy foods. *J Am Diet Assoc* **102**:415-417.
- Guillemette C (2003) Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* **3**:136-158.
- Gupta S (2004) Does aggressive statin therapy offer improved cholesterol-independent benefits compared to conventional statin treatment? *Int J Cardiol* **96**:131-139.
- Haberland ME, Fong D and Cheng L (1990) Malondialdehyde, modified lipoproteins, and atherosclerosis. *Eur Heart J* **11 Suppl E**:100-104.
- Hashimoto K, Uchiumi T, Konno T, Ebihara T, Nakamura T, Wada M, Sakisaka S, Maniwa F, Amachi T, Ueda K and Kuwano M (2002) Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **36**:1236-1245.
- Haubenwallner S, Essenburg AD, Barnett BC, Pape ME, DeMattos RB, Krause BR, Minton LL, Auerbach BJ, Newton RS, Leff T and et al. (1995) Hypolipidemic activity of select fibrates correlates to changes in hepatic apolipoprotein C-III expression: a potential physiologic basis for their mode of action. *J Lipid Res* **36**:2541-2551.
- Hellemans K, Michalik L, Dittie A, Knorr A, Rombouts K, De Jong J, Heirman C, Quartier E, Schuit F, Wahli W and Geerts A (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **124**:184-201.
- Hertz R, Bishara-Shieban J and Bar-Tana J (1995) Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* **270**:13470-13475.
- Hoekstra M, Kruijt JK, Van Eck M and Van Berkel TJ (2003) Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J Biol Chem* **278**:25448-25453.
- Hoekstra M, Out R, Kruijt JK, Van Eck M and Van Berkel TJ (2005) Diet induced regulation of genes involved in cholesterol metabolism in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Hepatol* **42**:400-407.
- Holt PR, Arber N, Halmos B, Forde K, Kissileff H, McGlynn KA, Moss SF, Kurihara N, Fan K, Yang K and Lipkin M (2002) Colonic epithelial cell proliferation decreases

- with increasing levels of serum 25-hydroxy vitamin D. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**:113-119.
- Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM and Williams RR (1996) Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**:250-255.
- Huff MW, Telford DE, Edwards JY, Burnett JR, Barrett PH, Rapp SR, Napawan N and Keller BT (2002) Inhibition of the apical sodium-dependent bile acid transporter reduces LDL cholesterol and apoB by enhanced plasma clearance of LDL apoB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:1884-1891.
- Hum DW, Belanger A, Levesque E, Barbier O, Beaulieu M, Albert C, Vallee M, Guillemette C, Tchernof A, Turgeon D and Dubois S (1999) Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**:413-423.
- Hunt SC, Kronenberg F, Eckfeldt JH, Hopkins PN, Myers RH and Heiss G (2001) Association of plasma bilirubin with coronary heart disease and segregation of bilirubin as a major gene trait: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* **154**:747-754.
- Ishikawa K, Sugawara D, Goto J, Watanabe Y, Kawamura K, Shiomi M, Itabe H and Maruyama Y (2001a) Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* **104**:1831-1836.
- Ishikawa K, Sugawara D, Wang X, Suzuki K, Itabe H, Maruyama Y and Lusis AJ (2001b) Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice. *Circ Res* **88**:506-512.
- Issemann I and Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**:645-650.
- Ito M, Yamamoto K, Maruo Y, Sato H, Fujiyama Y and Bamba T (2002) Effect of a conserved mutation in uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 on glucuronidation of a metabolite of flutamide. *Eur J Clin Pharmacol* **58**:11-14.
- Iyanagi T, Emi Y and Ikushiro S (1998) Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1407**:173-184.
- Jalouli M, Carlsson L, Ameen C, Linden D, Ljungberg A, Michalik L, Eden S, Wahli W and Oscarsson J (2003) Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression: influence of pituitary and gonadal hormones. *Endocrinology* **144**:101-109.
- James RW (1993) L'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) *Médecine et hygiène* **51**:2894-2896.
- Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ and Mangelsdorf DJ (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:266-271.
- Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ, Koning JH, De Jager-Krieken A, Kuipers F, Stellaard F, Bijleveld CM, Gouw A, Van Goor H, Thompson RJ and Muller M (1999) Hepatocanalicular bile salt export pump

- deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **117**:1370-1379.
- Kadacol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR and Chowdhury NR (2000) Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* **16**:297-306.
- Kahle W, Leonhardt H and Platzer W (1990) *Anatomie*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris
- Kapitulnik J (2004) Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol* **66**:773-779.
- Kaplan M, Muraca M, Hammerman C, Rubaltelli FF, Vilei MT, Vreman HJ and Stevenson DK (2002) Imbalance between production and conjugation of bilirubin: a fundamental concept in the mechanism of neonatal jaundice. *Pediatrics* **110**:e47.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R and Keppler D (1996) Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **23**:1061-1066.
- Katori M, Busuttill RW and Kupiec-Weglinski JW (2002) Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* **74**:905-912.
- Kemp F, DeCandia J, Li W, Bruening K, Baker H, Rigassio D, Bendich A and Bogden J (2002) Relationships between immunity and dietary and serum antioxidants, trace metals, B vitamins, and homocysteine in elderly men and women. *Nutrition Research* **22**:45-53.
- Keshavan P, Deem TL, Schwemberger SJ, Babcock GF, Cook-Mills JM and Zucker SD (2005) Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. *J Immunol* **174**:3709-3718.
- Kieffer N and Phillips DR (1990) Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* **6**:329-357.
- Kitamura Y, Matsuoka Y, Nomura Y and Taniguchi T (1998) Induction of inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat glial cells. *Life Sci* **62**:1717-1721.
- Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM and Kooistra T (2003) Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood* **101**:545-551.
- Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA and Evans RM (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**:771-774.
- Knopp RH, Alagona P, Davidson M, Goldberg AC, Kafonek SD, Kashyap M, Sprecher D, Superko HR, Jenkins S and Marcovina S (1998) Equivalent efficacy of a time-release form of niacin (Niaspan) given once-a-night versus plain niacin in the management of hyperlipidemia. *Metabolism* **47**:1097-1104.
- Knopp RH, Ginsberg J, Albers JJ, Hoff C, Ogilvie JT, Warnick GR, Burrows E, Retzlaff B and Poole M (1985) Contrasting effects of unmodified and time-release forms of

- niacin on lipoproteins in hyperlipidemic subjects: clues to mechanism of action of niacin. *Metabolism* **34**:642-650.
- Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Charles MA, Nelson RG, Howard BV, Bogardus C and Bennett PH (1991) Obesity in the Pima Indians: its magnitude and relationship with diabetes. *Am J Clin Nutr* **53**:1543S-1551S.
- Kobayashi K, Sogame Y, Hayashi K, Nicotera P and Orrenius S (1988) ATP stimulates the uptake of S-dinitrophenylglutathione by rat liver plasma membrane vesicles. *FEBS Lett* **240**:55-58.
- Kockx MM and Herman AG (2000) Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* **45**:736-746.
- Konig J, Rost D, Cui Y and Keppler D (1999) Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **29**:1156-1163.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F and Borst P (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **57**:3537-3547.
- Krauss R (1991) Low density lipoprotein subclasses and risk of coronary artery disease. *Curr Op Lipid* **2**:248-252. .
- Kronke G, Kadl A, Ikonomu E, Bluml S, Furnkranz A, Sarembock IJ, Bochkov VN, Exner M, Binder BR and Leitinger N (2007) Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:1276-1282.
- Labrune P, Myara A, Hadchouel M, Ronchi F, Bernard O, Trivin F, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Munnich A and Odievre M (1994) Genetic heterogeneity of Crigler-Najjar syndrome type I: a study of 14 cases. *Hum Genet* **94**:693-697.
- Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ and Tontonoz P (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:507-512.
- Larifla L (2002) *Athérosclérose Hypertension Thrombose*. Masson, Paris.
- Liao F, Berliner JA, Mehrabian M, Navab M, Demer LL, Lusis AJ and Fogelman AM (1991) Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest* **87**:2253-2257.
- Lightner DA, Person R, Peterson B, Puzicha G, Pu Y-M and Bojadziev S (1991) Conformational analysis and circular dichroism of bilirubin, the yellow pigment of jaundice, in: *Biomolecular Spectroscopy II* (II BS ed, pp 2-13, Los Angeles, CA, USA.
- Lin JP, O'Donnell CJ, Schwaiger JP, Cupples LA, Lingenhel A, Hunt SC, Yang S and Kronenberg F (2006) Association between the UGT1A1*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Circulation* **114**:1476-1481.
- Lin Y, Vreman HJ, Wong RJ, Tjoa T, Yamauchi T and Noble-Haeusslein LJ (2007) Heme oxygenase-1 stabilizes the blood-spinal cord barrier and limits oxidative stress and

- white matter damage in the acutely injured murine spinal cord. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**:1010-1021.
- Lindenblatt N, Bordel R, Schareck W, Menger MD and Vollmar B (2004) Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:601-606.
- Lobaccaro JM, Repa JJ, Lu TT, Caira F, Henry-Berger J, Volle DH and Mangelsdorf DJ (2001) [Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors]. *Ann Endocrinol (Paris)* **62**:239-247.
- Lobstein JF (1833) *Traité d'anatomie pathologique* F. G. Levrault, Paris.
- Luo Y and Tall AR (2000) Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest* **105**:513-520.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS and Nebert DW (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* **15**:677-685.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF and Nebert DW (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**:255-269.
- Madhavan M, Wattigney WA, Srinivasan SR and Berenson GS (1997a) Serum bilirubin distribution and its relation to cardiovascular risk in children and young adults. *Atherosclerosis* **131**:107-113.
- Madhavan S, Amonkar MM, Elliott D, Burke K and Gore P (1997b) The gift relationship between pharmaceutical companies and physicians: an exploratory survey of physicians. *J Clin Pharm Ther* **22**:207-215.
- Maglich JM, Sluder A, Guan X, Shi Y, McKee DD, Carrick K, Kamdar K, Willson TM and Moore JT (2001) Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol* **2**:RESEARCH0029.
- Maines MD (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:517-554.
- Maines MD and Panahian N (2001) The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol* **502**:249-272.
- Maines MD, Trakshel GM and Kutty RK (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* **261**:411-419.
- Malmendier CL and Delcroix C (1985) Effects of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **55**:161-169.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**:835-839.

- Marcus BH, Emmons KM, Simkin-Silverman LR, Linnan LA, Taylor ER, Bock BC, Roberts MB, Rossi JS and Abrams DB (1998) Evaluation of motivationally tailored vs. standard self-help physical activity interventions at the workplace. *Am J Health Promot* **12**:246-253.
- Matsui T, Nakajima A, Fujii H, Matera KM, Migita CT, Yoshida T and Ikeda-Saito M (2005) O(2)- and H(2)O(2)-dependent verdoheme degradation by heme oxygenase: reaction mechanisms and potential physiological roles of the dual pathway degradation. *J Biol Chem* **280**:36833-36840.
- Mayer M (2000) Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* **46**:1723-1727.
- McDonagh AF (1979) Bile pigments: Bilatrienes and 5,15-biladienes. *Dolphin, D., The porphyrins, Academic Press, New York VI*:294-491.
- Miralem T, Hu Z, Torno MD, Lelli KM and Maines MD (2005) Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *J Biol Chem* **280**:17084-17092.
- Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF, Jr., Motomura K, Anania FA, Willson TM and Tsukamoto H (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* **275**:35715-35722.
- Mol MJTM and Stalenhoef AFH (1993) HMG-CoA reductase inhibitors. *Current Opinion in Lipidology: Nutrition and Therapeutics* **4**:41-48.
- Morita T, Imai T, Yamaguchi T, Sugiyama T, Katayama S and Yoshino G (2003) Induction of heme oxygenase-1 in monocytes suppresses angiotensin II-elicited chemotactic activity through inhibition of CCR2: role of bilirubin and carbon monoxide generated by the enzyme. *Antioxid Redox Signal* **5**:439-447.
- Murray CJ and Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**:1498-1504.
- Murray CJL, Lopez AD and Brown P (1996) *The global burden of disease : a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020*. Harvard School of Public Health on behalf of the World Health Organization and the World Bank, Cambridge, Massachusetts.
- Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T and Morisawa S (1993) A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta* **1158**:189-193.
- NCEP (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* **285**:2486-2497.
- Neuzil J and Stocker R (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* **269**:16712-16719.
- Niaspan®LP (2006) Résumé des caractéristiques du produit Niaspan® LP.

- Nisa AU and Ahmad Z (2008) Dubin-Johnson syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak* **18**:188-189.
- Nishida T, Gatmaitan Z, Roy-Chowdhry J and Arias IM (1992) Two distinct mechanisms for bilirubin glucuronide transport by rat bile canalicular membrane vesicles. Demonstration of defective ATP-dependent transport in rats (TR-) with inherited conjugated hyperbilirubinemia. *J Clin Invest* **90**:2130-2135.
- Nordestgaard BG and Nielsen LB (1994) Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **5**:252-257.
- Novotny L and Vitek L (2003) Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: a meta-analysis of published studies. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**:568-571.
- O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB and Schwartz SM (1993) Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* **73**:223-231.
- O'Loughlin J, Paradis G, Renaud L and Sanchez Gomez L (1998) One-year predictors of smoking initiation and of continued smoking among elementary schoolchildren in multiethnic, low-income, inner-city neighbourhoods. *Tob Control* **7**:268-275.
- Olefsky JM (2001) Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* **276**:36863-36864.
- OMS (2004) Rapport sur la santé dans le monde 2004: Changer le cours de l'histoire, pp 188 p., Organisation mondiale de la santé, Genève, Suisse.
- Opal SM and DePalo VA (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest* **117**:1162-1172.
- Ostrow JD, Mukerjee P and Tiribelli C (1994) Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function. *J Lipid Res* **35**:1715-1737.
- Otterbein LE and Choi AM (2000) Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L1029-1037.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K and Bach FH (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* **24**:449-455.
- Ounpuu S, Anand S and Yusuf S (2000) The impending global epidemic of cardiovascular diseases. *Eur Heart J* **21**:880-883.
- Pacifici GM, Franchi M, Bencini C, Repetti F, Di Lascio N and Muraro GB (1988) Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica* **18**:849-856.
- Pacifici GM, Franchi M, Gervasi PG, Longo V, di Simplicio P, Temellini A and Giuliani L (1989) Profile of drug-metabolizing enzymes in human ileum and colon. *Pharmacology* **38**:137-145.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**:1126-1128.
- Peet DJ, Janowski BA and Mangelsdorf DJ (1998) The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* **8**:571-575.

- Peters JM, Rusyn I, Rose ML, Gonzalez FJ and Thurman RG (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is restricted to hepatic parenchymal cells, not Kupffer cells: implications for the mechanism of action of peroxisome proliferators in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**:823-826.
- Pownall H and Gotto AMJ (1999) Structure and dynamics of human plasma lipoproteins. *Oxford University Press Inc, New York*.
- Praillet C, Grimaud JA and Lortat-Jacob H (1998a) Les protéoglycannes. I, Molécules aux multiples fonctions : futures molécules thérapeutiques ? *Med Sci* **14**:412-420.
- Praillet C, Grimaud JA and Lortat-Jacob H (1998b) Les protéoglycannes. II, Rôles en pathologie. *Med Sci* **14**:421-428.
- Radomska-Pandya A, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S and Magdalou J (2005) Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes. *Methods Enzymol* **400**:116-147.
- Repa JJ and Mangelsdorf DJ (2002) The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* **8**:1243-1248.
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM and Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289**:1524-1529.
- Ritter JK, Crawford JM and Owens IS (1991) Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells. *J Biol Chem* **266**:1043-1047.
- Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M and Laudet V (2001) How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* **17**:554-556.
- Rokitansky C, M.D. (1855) *A manual of pathological anatomy. (Translate from the German by Charles Hewitt Moore)*. Blanchard and Lea, Philadelphia.
- Rosenson RS and Tangney CC (1998) Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *Jama* **279**:1643-1650.
- Rosenthal P, Keefe MT, Henton D, Cheng M, Lee CR, Hall RL and Newton MK (1990) Total and direct-reacting bilirubin values by automated methods compared with liquid chromatography and with manual methods for determining delta bilirubin. *Clin Chem* **36**:788-791.
- Ross G (2003) Hyperbilirubinemia in the 2000s: what should we do next? *Am J Perinatol* **20**:415-424.
- Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**:801-809.
- Ruffer M (1911) On arterial lesions found in Egyptian mummies. *Journal of Pathology & Bacteriology* **15** 453-462.
- Salim M, Brown-Kipphut BA and Maines MD (2001) Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation. *J Biol Chem* **276**:10929-10934.
- SantéCanada (2002) Le fardeau économique de la maladie au Canada, 1998., Santé Canada, Ottawa, Canada.

- Schieffer B and Drexler H (2003) Role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* **91**:12H-18H.
- Schmid R (1956) Direct-reacting bilirubin, bilirubin glucuronide, in serum, bile and urine. *Science* **124**:76-77.
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B and Auwerx J (1996a) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* **15**:5336-5348.
- Schoonjans K, Staels B and Auwerx J (1996b) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1302**:93-109.
- Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE and Freeman BA (2005) Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2340-2345.
- Schreiner PJ, Morrisett JD, Sharrett AR, Patsch W, Tyroler HA, Wu K and Heiss G (1993) Lipoprotein[a] as a risk factor for preclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* **13**:826-833.
- Schwertner HA, Jackson WG and Tolan G (1994) Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin Chem* **40**:18-23.
- Scott JR, Chin BY, Bilban MH and Otterbein LE (2007) Restoring HOmeostasis: is heme oxygenase-1 ready for the clinic? *Trends Pharmacol Sci* **28**:200-205.
- Senafi SB, Clarke DJ and Burchell B (1994) Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J* **303** (Pt 1):233-240.
- Senekeo-Effenberger K, Chen S, Brace-Sinnokrak E, Bonzo JA, Yueh MF, Argikar U, Kaeding J, Trottier J, Rimmel RP, Ritter JK, Barbier O and Tukey RH (2007) Expression of the human UGT1 locus in transgenic mice by 4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthioacetic acid (WY-14643) and implications on drug metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *Drug Metab Dispos* **35**:419-427.
- Shapiro SM (2003) Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol* **29**:410-421.
- Sinaasappel M and Jansen PL (1991) The differential diagnosis of Crigler-Najjar disease, types 1 and 2, by bile pigment analysis. *Gastroenterology* **100**:783-789.
- Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY and Bach FH (2004) Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol* **172**:3553-3563.
- Staels B (2003) Modulation of the PPAR-alpha signalling pathway: relevance for the metabolic syndrome and atherosclerosis, in: *Second International Symposium on PPARs: From Basic Science to Clinical Applications. Florence (Italy)*

- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E and Fruchart JC (1998) Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* **98**:2088-2093.
- Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, 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. *J Clin Invest* **95**:705-712.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **92**:1355-1374.
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* **14**:840-856.
- Steinberg D (1997) Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* **95**:1062-1071.
- Stocker R (1990) Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun* **9**:101-112.
- Stocker R (2004) Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* **6**:841-849.
- Stocker R and Keaney JF, Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* **84**:1381-1478.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN and Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**:1043-1046.
- Stoll MS, Vicker N, Gray CH and Bonnett R (1982) Concerning the structure of photobilirubin II. *Biochem J* **201**:179-188.
- Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH and Manns MP (2000) Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* **275**:36164-36171.
- Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP and Tukey RH (1997) Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol* **52**:212-220.
- Strassburg CP, Strassburg A, Nguyen N, Li Q, Manns MP and Tukey RH (1999) Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J* **338** (Pt 2):489-498.
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T and et al. (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* **386**:292-296.

- Taille C, El-Benna J, Lanone S, Dang MC, Ogier-Denis E, Aubier M and Boczkowski J (2004) Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J Biol Chem* **279**:28681-28688.
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S and Kuwano M (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* **56**:4124-4129.
- Tate G, Li M, Suzuki T and Mitsuya T (2002) A new mutation of the ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 (ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Genes Genet Syst* **77**:117-121.
- Tedgui A and Mallat Z (2000) Smooth muscle cells : another source of tissue factor-containing microparticles in atherothrombosis? *Circ Res* **87**:81-82.
- Tiribelli C and Ostrow JD (2005) The molecular basis of bilirubin encephalopathy and toxicity: report of an EASL Single Topic Conference, Trieste, Italy, 1-2 October, 2004. *J Hepatol* **43**:156-166.
- Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S and Kuwano M (1999) Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet* **64**:739-746.
- Toussaint J-F (2003) *L'athérosclérose - Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques* Masson, paris.
- Tsujii H, Konig J, Rost D, Stockel B, Leuschner U and Keppler D (1999) Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* **117**:653-660.
- Tugwood JD, Holden PR, James NH, Prince RA and Roberts RA (1998) A peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) cDNA cloned from guinea-pig liver encodes a protein with similar properties to the mouse PPARalpha: implications for species differences in responses to peroxisome proliferators. *Arch Toxicol* **72**:169-177.
- Turpin G and Bruckert E (1999) *Hypercholestérolémie*. Editions Masson Paris.
- Turpin G, Bruckert E, Fossati P and Paillard F (1998) *Hyperlipidémies, Traitement médicamenteux*. Editions Masson Paris.
- Utermann G, Vogelberg KH, Steinmetz A, Schoenborn W, Pruin N, Jaeschke M, Hees M and Canzler H (1979) Polymorphism of apolipoprotein E. II. Genetics of hyperlipoproteinemia type III. *Clin Genet* **15**:37-62.
- van Dijk KW, Rensen PC, Voshol PJ and Havekes LM (2004) The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr Opin Lipidol* **15**:239-246.
- van Kuijck MA, Kool M, Merckx GF, Geurts van Kessel A, Bindels RJ, Deen PM and van Os CH (1997) Assignment of the canalicular multispecific organic anion transporter

- gene (CMOAT) to human chromosome 10q24 and mouse chromosome 19D2 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **77**:285-287.
- Victor VM and Rocha M (2007) Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* **13**:845-863.
- Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C and Tyrrell RM (1994) Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:2607-2610.
- Vile GF and Tyrrell RM (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* **268**:14678-14681.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A and Schwartz SM (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:1262-1275.
- Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V, Novotny L and Kotal P (2002) Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* **160**:449-456.
- Vitek L, Kraslova I, Muchova L, Novotny L and Yamaguchi T (2007) Urinary excretion of oxidative metabolites of bilirubin in subjects with Gilbert syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* **22**:841-845.
- Vitek L and Schwertner HA (2007) The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* **43**:1-57.
- Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, Staels B, Pennacchio LA, Rubin EM, Fruchart-Najib J and Fruchart JC (2003) Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem* **278**:17982-17985.
- Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y and Kuwano M (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* **7**:203-207.
- Weber C, Erl W, Weber KS and Weber PC (1997) HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* **30**:1212-1217.
- Who (1958) Classification of atherosclerotic lesions: report of a study group. *World Health Organization Techn Rep Ser* **143**:1-20.
- Williams KJ and Tabas I (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**:551-561.
- Willis D, Moore AR, Frederick R and Willoughby DA (1996) Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* **2**:87-90.
- Willson TM and Wahli W (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* **1**:235-241.

- Wilson DM, Killen JD, Hayward C, Robinson TN, Hammer LD, Kraemer HC, Varady A and Taylor CB (1994) Timing and rate of sexual maturation and the onset of cigarette and alcohol use among teenage girls. *Arch Pediatr Adolesc Med* **148**:789-795.
- Windaus A (1910) Ueber den Gehalt normaler und atheromatoeser Aorten an Cholesterol and Cholesterinester. *Zeitschrift Physiol Chem* **67**:174-176.
- Witztum JL and Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* **88**:1785-1792.
- Wolinsky H and Glagov S (1967) A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res* **20**:99-111.
- Wolkoff AW, Wolpert E, Pascasio FN and Arias IM (1976) Rotor's syndrome. A distinct inheritable pathophysiologic entity. *Am J Med* **60**:173-179.
- Wolpert E, Pascasio FM, Wolkoff AW and Arias IM (1977) Abnormal sulfobromophthalein metabolism in Rotor's syndrome and obligate heterozygotes. *N Engl J Med* **296**:1099-1101.
- Wu TW, Fung KP, Wu J, Yang CC and Weisel RD (1996) Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins. *Biochem Pharmacol* **51**:859-862.
- Xu C, Zarins CK and Glagov S (2001) Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *J Vasc Surg* **33**:91-96.
- Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K and Mangelsdorf DJ (2001) Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem* **276**:43018-43024.
- Zimmet P and Thomas CR (2003) Genotype, obesity and cardiovascular disease--has technical and social advancement outstripped evolution? *J Intern Med* **254**:114-125.
- Zucker SD, Goessling W and Hoppin AG (1999) Unconjugated bilirubin exhibits spontaneous diffusion through model lipid bilayers and native hepatocyte membranes. *J Biol Chem* **274**:10852-10862.
- Zucker SD, Horn PS and Sherman KE (2004) Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology* **40**:827-835.