



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie*

Présentée et soutenue par *Nizar SERHAN*
Le 30 Mai 2013

Titre :
Impact du récepteur purinergique P2Y13 sur le transport retour du cholestérol et le développement de l'athérosclérose

JURY

Pr. Bruno VERGES
Dr. Olivier MEILHAC
Pr. Bertrand PERRET
Dr. Laurent MARTINEZ
Dr. Cendrine CABOU

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invitée

Ecole doctorale : *Biologie- Santé- Biotechnologie*
Unité de recherche : *INSERM U1047, équipe 5, I2MC*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. Laurent MARTINEZ, Dr. Cendrine CABOU*
Rapporteurs : *Pr. Bruno VERGES, Dr. Olivier MEILHAC*

«Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »

François RABELAIS

À mes parents et ma sœur,

À mes amis,

REMERCIEMENTS

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragé, soutenu et conforté au long de toutes ces années. Qu'elles trouvent dans ce travail l'expression de mes plus sincères remerciements.

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

Monsieur le **Professeur Bertrand Perret**, qui ma fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Messieurs le **Professeur Bruno Verges** et **Docteur Olivier Meilhac**, qui ont accepté de juger cette thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et je vous suis reconnaissant d'avoir pu bénéficier de vos conseils qui ont contribué à l'amélioration de ce manuscrit. Je suis particulièrement honoré de votre présence dans ce jury de soutenance. Je vous exprime ma plus haute considération.

Madame le Docteur **Cendrine CABOU**, Qui ma fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Sincères remerciements.

Monsieur le **Docteur Laurent Martinez**, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe et de diriger cette thèse. Je te remercie pour ta disponibilité, le partage de tes connaissances, ton esprit critiques et tes encouragements tout au long de ce travail. Soit assuré de ma profonde reconnaissance.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe 5. J'ai eu la chance de rencontrer durant ces années des personnes formidables.

Vero, il est 12:00, il fait 2°C (en réalité il fait 20°C) et j'ai faim j'ai faim j'ai faim!!! Merci pour toutes les discussions scientifiques et sur la situation géopolitique au Liban. C'était sympa, je sais que mes fautes d'orthographe vont te manquer.

Steph, la prince il parle pas à toi ! mais il aime bien les chemises qui ne sont pas à toi .

Camille, merci beaucoup pour ton aide et tes conseils dans la phase finale de la rédaction de ma thèse, je te souhaite beaucoup de courage avec ton projet top secret!

Super Michel, le champion de prélèvement du sang à l'œil (ou le vampire comme je t'appelais). Merci de m'avoir transmis ce savoir-faire et pour tous les bons moments !

Guillaume, pour toutes les discussions et les debriefs des matches autour de nos nombreuses ELISA ! J'espère que tu arriveras à résoudre ce mystère un jour.

Aurèlie, mon maître jedi qui m'a tous appris merci beaucoup pour ton aide.

Nicole, merci pour tes encouragements et tes super cannelés, je te souhaite le meilleur pour la suite.

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

Muriel, merci pour tes encouragements, ta bonne humeur et pour les moments de fous rires à la table café.

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

Audrey, la reine des western- blot, que la force soit avec toi ! bien tôt passeras tu aussi du côté obscure de la force.

Les jeunes padawans **Damien, Sara et Aurélien** (l'homme qui a envahi mon bureau) merci pour tous les moments de fous rires pendant les micros poses entre deux articles.

Souad pour tous les brownies, les taramisous et les poses cigarettes pendant ma rédactions sans oublié les petits resto libanais.

Un grand merci à:

Laetitia, ma partenaire dans «the best lab geek duo of all the time» ! J'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés, merci de m'avoir conseillée, soutenue et critiquée dans mon travail. Merci également pour ton humour noir, ta bonne humeur et pour tous les moments qu'on a à partager et j'espère qu'ils seront encore nombreux. Tu fais partie des personnes qui m'ont aidée à grandir, bon courage pour la suite et j'espère qu'un jour tu auras le poste que tu mérites et pour finir je dirais : Derrière ce grand travail se cache une « femme ».

Natalia, par où commencer ? Par le jour où on a eu le « coup de foudre amical devant le bâtiment C (paix à son âme) ? Le premier congrès NSFA ? Ou le premier russe blanc ? Merci pour tes encouragements et pour ta disponibilité dans les moments difficiles. Merci également pour ta bonne humeur et pour tous les vendredis soir qu'on a passé ensemble aux SDS et CDC, je suis très heureux d'avoir fait ta connaissance et vu que tous les chemins mènent à ST pierre, on va continuer à se croiser pour tester des nouveaux «cocktail ». je te souhaite beaucoup de courage pour ta soutenance en même temps tu es une machine tu vas tous déchirer.

Un remerciement spécial pour **mes parents**, qui sans eux, je n'aurai jamais eu l'opportunité de faire mes études en France et effectuer cette thèse.

Je remercie aussi **Jean-Claude** pour son accueil et tous les bons repas. Mes gaziers **Ben, Janbon, Mathieu et Ghadi** pour tous les week-end de rêve qu'on a passé ensemble que ce soit à Bordeaux, Toulouse, Arcachon ou au stade pour les matchs de LDC et Europa league... Merci pour votre disponibilité et votre soutien sans faille.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	5
RESUME	9
ABSTRACT	10
Avant-Propos	11
Chapitre I	13
Transport Retour de Cholestérol (RCT)	13
1-Les lipoprotéines plasmatiques	15
2-Composition et structure des HDL	17
3-Le métabolisme des HDL et le Transport Retour de Cholestérol (Figure 3)	18
3.1-Protéines impliquées dans les voies d'efflux de cholestérol des macrophages (Figure 7 et Tableau 3)	24
3.1.1-La voie dépendante d'ABCA1	25
3.1.1.1-Présentation de ABCA1	25
3.1.1.2-Implication d'ABCA1 des macrophages dans le RCT et le développement de l'athérosclérose chez la souris	26
3.1.2- La voie ABCG1 dépendante	29
3.1.2.1-Présentation de ABCG1	29
3.1.2.2-Implication de ABCG1 des macrophages dans le RCT et le développement de l'athérosclérose chez la souris	29
3.1.3-La voie SR-BI dépendante	32
3.1.3.1-Présentation de SR-BI	32
3.1.3.2-Implication de SR-BI dans l'efflux du cholestérol des macrophages et le développement de l'athérosclérose chez la souris	33
3.2-Protéines impliquées dans la composition et la maturation (remodelage) plasmatique des HDL (Figure 8)	36
3.2.1-Implication des apolipoprotéines plasmatiques dans le RCT et l'athérosclérose (Tableau 4)	36
3.2.1.1-Apolipoprotéine A-I (apoA-I)	36
3.2.1.2-Apolipoprotéine A-II (apoA-II):	38
3.2.1.3-Apolipoprotéine E (apoE):	40
3.2.2-Les enzymes plasmatiques impliquées dans le remodelage des HDL	43
3.2.2.1-La Lecithin:Cholestérol Acyltransferase (LCAT)	43
3.2.2.2-Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP)	47
3.2.2.3-La Phospholipid transfer protein (PLTP)	49
3.2.2.4-Les Lipases	50
3.2.2.4.1-La Lipase Hépatique (LH)	51
3.2.2.4.2-La Lipase Endothélial (LE)	52
3.3-Captation hépatique des HDL (Tableau 6 et Figure 10)	56
3.3.1-Le Scavenger Receptor class B- type I (SR-BI) et la captation sélective du cholestérol ester des HDL	56
3.3.2-La voie F ₁ -ATPase/P2Y ₁₃ d'endocytose des holoparticules HDL (Figure 9)	58
3.3.2.1-Le site de liaison de haute affinité pour l'apoA-I : l'ecto-F ₁ -ATPase	59
3.3.2.2-Le récepteur à l'ADP : P2Y ₁₃	60
3.3.2.3-Le récepteur P2Y ₁₃ :	60
3.3.2.4-Cascade de signalisation en aval de P2Y ₁₃	61
3.3.2.5-Implication de P2Y ₁₃ dans le RCT	62
3.4-Elimination de cholestérol par voie biliaire (Tableau 7 et Figure 13)	65

3.4.1-Biosynthèse des acides biliaires (Figure 11).....	65
Figure 11. Voie de synthèse des acides biliaires.....	66
3.4.2-Transport hépatobiliaire du cholestérol et des acides biliaires	66
3.4.2.1-ABCG5/ABCG8	66
3.4.2.2-NPC1L1 (Niemann–Pick C1-like 1) (Figure 12).....	68
3.4.2.3-ABCB11.....	70
3.4.2.4-ABCB4.....	71
3.5-Le tissu adipeux et la biogenèse des HDL.....	73
3.6-Transport intestinal du cholestérol (Figure 14)	74
3.6.1-Absorption intestinale du cholestérol	74
3.6.1.1-NPC1L1	75
3.6.1.2-ABCG5/G8	76
3.6.1.3-SR-BI	76
3.6.2-Biogenèse des HDL d'origine intestinale : Implication d'ABCA1	77
3.6.5- Excrétion Trans intestinale du cholestérol (TICE)	78
Chapitre II.....	81
Approches thérapeutiques ciblant le métabolisme des HDL et le RCT	81
1 Approches non pharmacologiques	83
1.1-Exercice physique.....	83
1.2-Composants alimentaires	84
1.2.1-L'huile de poisson.....	84
1.2.2-Le café.....	85
2- Approches pharmacologiques ciblant le métabolisme des HDL et le RCT :.....	86
2.1-Les agonistes des récepteurs nucléaires (tableau 8).....	86
2.1.1-Agoniste LXR (Liver X Receptor)	86
2.1.2-Agoniste des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors).....	87
2.1.3-Agoniste de FXR (Farnesoid X Receptor).....	92
2.1.4-Agoniste du récepteur P2Y ₁₃	94
2.2- Antagonistes.....	94
2.2.1-Antagoniste de miR-33	94
2.2.2-Niacine ou acide nicotinique.....	96
2.2.3-Inhibiteur de CETP	98
2.2.4.1-Torcetrapib.....	99
2.2.4.2-Anacetrapib	100
2.2.4.3-Evacetrapib	100
2.2.4.4-Dalcetrapib.....	101
2.3- Approches thérapeutiques utilisant l'apoA-I	102
2.3.1-Infusion d'apoA-I Milano	102
2.3.2-Peptides mimétiques d'apoA-I.....	103
2.3.3-Infusion des HDL reconstituées (rHDL)	105
Chapitre III.....	107
1. Résultats expérimentaux	109
1.1- Le rôle physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans le transport retour du cholestérol	109
1.1.1- Introduction.....	109
1.1.2- Article 1	111
1.2- Une activation chronique du récepteur P2Y₁₃ stimule le transport retour du	119
cholestérol	119
1.2.1-Introduction.....	119
1.2.2- Article 2	120

1.3- Implication du récepteur P2Y₁₃ dans le développement de l'athérosclérose (en révision dans Nutrition & Metabolism)	127
1.3.1- Article 3 : Introduction	127
1.4- Impact de l'inactivation de P2Y₁₃ sur fond apoE^{-/-} sur le développement de l'athérosclérose	143
1.4.1-Introduction.....	143
Chapitre IV.....	167
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	167
2.1-P2Y₁₃ une cible potentielle dans le traitement de l'athérosclérose	170
2.2-P2Y₁₃ et la biogenèse des HDL	171
2.3-Activation de P2Y₁₃ et RCT	172
2.4-P2Y₁₃ et le développement de l'athérosclérose	172
2.5-Etude du développement de l'athérosclérose et de RCT dans un modèle de souris « humanisées »	173
BIBLIOGRAPHIE	176
ANNEXES	202

ABREVIATIONS

ABCA1	ATP Binding Cassette A1
ABCA1^{-/-}	Souris invalidées pour le récepteur ABCA1
ABCA1^{-a/-a}	Souris invalidées pour ABCA1 spécifiquement dans le tissu adipeux
ABCA1^{-/-} x ABCG1^{-/-}	Souris doublement invalidées pour ABCA1 et ABCG1
ABCA1^{-i/-i}	Souris invalidées pour ABCA1 spécifiquement dans l'intestin
ABCA1^{-M/-M}	Souris invalidées pour ABCA1 spécifiquement dans les macrophages
ABCA1^{-M/-M} x LDLr^{-/-}	Souris doublement invalidées pour le LDLr et ABCA1 spécifiquement dans les macrophages
ABCB4	ATP Binding Cassette B4
ABCB11	ATP Binding Cassette B11
ABCG1	ATP Binding Cassette G1
ABCG5	ATP Binding Cassette G5
ABCG8	ATP Binding Cassette G8
ABCG5/8^{-/-}	Souris doublement invalidées pour l'ABCG5 et ABCG8
ADP	Adenosinediphosphate
apoA-I	apolipoprotéines A-I
apoA-I^{-/-} x LDLr^{-/-}	Souris doublement invalidées pour le LDLr et ApoA-I
apoA-I Tgh	Souris transgénique sur-exprimant l'apoA-I humain
apoA-IM	apoA-I Milano
apoA-II	apolipoprotéines A-II
apoA-II^{-/-}	Souris invalidées pour l'apoA-II
apoA-II Tgm	Souris transgéniques surexprimant l'apoA-II murin
apoB	apolipoprotéine B
apoE	apolipoprotéine E
apoE^{-/-}	Souris invalidées pour l'apolipoprotéine E
apoE^{-/-} x ABCA1^{-/-}	Souris doublement invalidées pour apoE et ABCA1
apoE^{-/-} x LCAT^{-/-}	Souris doublement invalidées pour l'apoE et la LCAT
apoE^{-/-} x LE^{-/-}	Souris doublement invalidées pour l'apoE et la LE
apoE^{-/-} x PLTP^{-/-}	Souris doublement invalidées pour l'apoE et la PLTP
apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-}	Souris doublement invalidées pour l'apoE et P2Y ₁₃
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adenosine triphosphate
BAT	Aminoacid N-acyltransferase
CE	Cholestérol estérifié
CETP	Cholestérol Ester Transfert Protein
CETP Tg	Souris transgénique exprimant la CETP
CL	Cholestérol libre
CYP7A1	Cholestérol 7 α hydroxylase CYP7A1
CYP27A1	Stérol 27 hydroxylase
CYP7B1	Oxysterol 7 hydroxylase
CYP8B1	Sterol 12 alpha hydroxylase

DMPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
ERASE	The Effect of rHDL on Atherosclerosis–Safety and efficacy
FAS	Fatty Acid Synthase
FXR	Farnesoid X Receptor
HDL	High Density Lipoproteins
HDL-C	HDL-Cholestérol
HepG2	Cellules d’hépatocarcinome humain
HSD3B7	3beta-hydroxy C27 steroïd deshydrogenase
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A
hypom SR-BI	Souris ayant le gène SR-BI floxé
hypom SR-BIKO^{LIVER}	Souris invalidées pour SR-BI spécifiquement dans le foie par le système cre lox
³H-cholestérol	Cholestérol tritié
IF1	Inhibitor Factor 1
ILLUMINATE¹²⁵I	Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact Iode 125
LCAT	Lecithin Cholesterol Acyl Transferase
LCAT^{-/-}	Souris invalidées pour la LCAT
LCAT^{+/-}	Souris hétérozygotes pour la LCAT
LCAT Tg	Souris transgéniques surexprimant la LCAT humaine
LDL	Low Density Lipoproteins
LDL-C	LDL-Cholestérol
LDLr	Récepteur des LDL
LDLr^{-/-}	Souris invalidées pour le LDLr
LDLr^{-/-} x apobec^{-/-}	Souris doublement invalidées pour le LDLr et l’enzyme catalytique de l’apoB
LDLr^{-/-} x PLTP^{-/-}	Souris doublement invalidées pour le LDLr et la PLTP
LDLr^{-/-} x LCAT^{-/-}	Souris doublement invalidées pour le LDLr et la LCAT
LE	Lipase Endothéliales
LE^{-/-}	Souris invalidées pour la LE
LH	Lipase Hépatique
LH^{-/-}	Souris invalidées pour la LH
LH Tg	Souris transgéniques surexprimants la LH humaine
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
NPC1L1	Niemann–Pick C1-like 1
NPC1L1 Tg	Souris transgéniques surexprimant le gène NPC1L1 humain spécifiquement dans le foie
NPC1L1^{-/-}	Souris invalidées pour NPC1L1
PL	Phospholipides

PLTP	Phospholipid Transfer Protein
PLTP^{-/-}	Souris invalidées pour la PLTP
PLTP Tg	Souris transgéniques surexprimant le gène PLTP humain
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
P2Y₁₃^{-/-}	Souris invalidées pour le récepteur P2Y ₁₃
RCT	Transport Retour de Cholestérol
RXR	Retinoid X Receptor
rHDL	HDL reconstitués
SHP	Small Heterodimer Partner
SREBP2	Sterol-Regulatory Element Binding Proteins 2
SREBP1c	Sterol-Regulatory Element Binding Protein 1c
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
SR-BI^{-/-}	Souris invalidées pour SR-BI
SR-BI^{-/-} x CETP Tg	Souris invalidées pour SR-BI et surexprimant la CETP
TG	Triglycerides
TICE	Transintestinal Cholesterol Efflux
t_{1/2}	Temps de demi-vie
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
VLDL-C	VLDL- Cholestérol
WT	Wild Type

RESUME

Impact du récepteur P2Y₁₃ sur le transport retour du cholestérol et le développement de l'athérosclérose

Le taux de HDL-Cholestérol (Lipoprotéine de Haute Densité, HDL-C) est inversement corrélé au risque cardiovasculaire. L'effet athéroprotecteur des HDL est principalement attribué à leur fonction métabolique dans le Transport Retour du Cholestérol (TRC), un processus par lequel le cholestérol excédentaire des cellules périphériques, et des macrophages spumeux en particulier, est pris en charge par les HDL pour être ramené vers le foie où il sera finalement éliminé *via* les sécrétions biliaires. Notre équipe a décrit à la surface des hépatocytes humains une nouvelle voie de captation des HDL dans laquelle l'apoA-I, protéine majoritaire des HDL, se lie en surface des hépatocytes à un complexe enzymatique similaire à la F₁-ATPase mitochondriale (appelé ecto-F₁-ATPase) et active l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en ADP. L'ADP ainsi généré active spécifiquement le récepteur purinergique P2Y₁₃ pour *in fine* stimuler l'endocytose des holoparticules HDL (protéines + lipides) *via* un récepteur de basse affinité, différent du récepteur SR-BI et dont l'identité reste à ce jour inconnu.

Dans ce travail, nous avons étudié la fonction du récepteur P2Y₁₃ dans le TRC et le développement de l'athérosclérose *in vivo* chez la souris.

Dans une première partie, nous avons observé que des souris déficientes pour le récepteur P2Y₁₃ (P2Y₁₃ Knockout, KO) présentent une diminution de la captation hépatique en cholestérol et des sécrétions de lipides biliaires. Ces changements sont accompagnés d'une forte diminution du TRC des macrophages vers les fèces et un régime riche en cholestérol (1.25%, HCD) accentue ce phénotype. Inversement, l'injection en bolus d'un agoniste partiel du récepteur P2Y₁₃, le cangrelor, stimule la captation hépatique et les sécrétions en lipides biliaires (cholestérol, phospholipides et acides biliaires) chez des souris sauvages (WT) et des souris invalidées pour SR-BI hépatique (SR-BI KO^{liver}) mais pas chez les souris P2Y₁₃ KO. Sur le long terme, une infusion chronique de cangrelor pendant 3 jours sur des souris WT, diminue les concentrations plasmatiques en HDL-C en augmentant leur captation hépatique. Cet effet se retrouve corrélé à une augmentation des sécrétions biliaires en acides biliaires.

Dans une deuxième partie, nous avons démontré que l'inactivation de P2Y₁₃ dans a modèle de souris d'athérosclérose, apoE KO, induit une augmentation de la plaque d'athérosclérose en corrélation avec une diminution des sécrétions de lipides (cholestérol, phospholipides et acides biliaires) dans la bile et les fèces.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que le récepteur P2Y₁₃ pourrait constituer une nouvelle cible dans les thérapies HDL, visant à prévenir et/ou faire régresser le développement de la plaque d'athérosclérose.

ABSTRACT

Impact of P2Y₁₃ receptor on reverse cholesterol transport and atherosclerosis development

The level of High Density Lipoprotein-Cholesterol (HDL-C) is inversely correlated to the risk of atherosclerotic cardiovascular disease. The protective effect of HDL is mostly attributed to their metabolic functions in Reverse Cholesterol Transport (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up from peripheral cells and macrophages by the HDL particles, and is later delivered to the liver for elimination by bile excretion.

We have previously identified a new pathway for hepatic HDL uptake, involved in RCT. In this pathway, apoA-I, the major protein of HDL, binds an ecto-F₁-ATPase leading to ATP hydrolysis into ADP. Extracellular ADP activates the P2Y₁₃ receptor which stimulates *in fine* HDL uptake through an unknown low affinity receptor, distinct from the classical HDL receptor, SR-BI.

In this work, we have investigated on mouse models the physiological relevance of P2Y₁₃ receptor in RCT and atherosclerosis development.

In a first part, we have showed that P2Y₁₃ deficient mice fed on chow diet displayed a decrease in hepatic HDL-C uptake and biliary lipids secretions. In these conditions, P2Y₁₃ deficiency was also associated with a strong decrease in RCT, from macrophages to the faeces. Moreover, the same phenotype was found on P2Y₁₃ deficient mice fed on a high cholesterol diet (1.25%, HCD). Conversely, intravenous bolus injection of cangrelor, a partial agonist of P2Y₁₃, stimulated hepatic HDL uptake and biliary lipids secretions (cholesterol, bile acids and phospholipids) in both wild-type and scavenger receptor class B type I liver deficient mice, with no effect in P2Y₁₃ knockout mice. Furthermore, a long-term chronic treatment with cangrelor, by continuous infusion for 3 days, decreased plasma HDL-C levels as a consequence of increased hepatic HDL uptake. These effects were correlated with an increase in biliary bile acid secretion.

In a second part, we have showed that deficiency of P2Y₁₃ in a mice model for atherosclerosis, apoE knockout mice, induced an increase in atherosclerosis development. This result was correlated with a decrease in biliary lipids secretions and excretions into the faeces.

Taken together our results suggest that P2Y₁₃ receptor could be a target for therapeutic intervention on HDL ("HDL-Therapies"), aiming to prevent or reduce the development of atherosclerosis

Avant-Propos

Les pathologies cardiovasculaires associées à l'athérosclérose représentent l'une des premières causes de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation négative entre le taux plasmatique des lipoprotéines de haute densité (HDL) à l'incidence des maladies cardiovasculaires. Le rôle athéroprotecteur des HDL est principalement attribué à leur participation dans le Transport Retour du Cholestérol (RCT) dans lequel les HDL captent le cholestérol des tissus périphériques pour le ramener vers le foie où il sera éliminé par les sécrétions biliaires sous forme de cholestérol libre ou acides biliaires.

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années au métabolisme des HDL et plus précisément à la captation hépatique de ces lipoprotéines qui constitue l'une des dernières étapes du RCT. Les travaux de l'équipe ont permis d'identifier au niveau d'hépatocytes humains, une nouvelle voie d'endocytose des HDL. Dans cette voie, la liaison de l'apoA-I, la protéine majoritaire des HDL, sur une ecto-F₁-ATPase stimule son activité ATP hydrolase. L'ADP extracellulaire ainsi généré va induire l'activation du récepteur purinergique P2Y₁₃ conduisant à l'endocytose des holoparticules HDL (protéines et lipides) par un site de liaison de basse affinité d'identité encore inconnue. Cette nouvelle voie d'endocytose des HDL pourrait constituer une potentielle nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose. Ainsi, au cours de mon doctorat, je me suis intéressé à l'implication physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans le RCT et le développement de l'athérosclérose. Ainsi, l'extinction de ce récepteur chez la souris combiné à un régime riche en cholestérol résulte d'une diminution de la captation hépatique en cholestérol et une diminution de son élimination via les sécrétions biliaires. Alors que l'activation pharmacologique de ce récepteur, augmente le turn-over de HDL plasmatique et leur captation hépatique, ce qui résulte en une augmentation d'éliminations de cholestérol *via* les sécrétions biliaires sous formes d'acides biliaires. De plus, nos résultats montrent l'implication de ce récepteur dans le développement de l'athérosclérose.

Afin de mieux aborder l'ensemble de ces résultats ce mémoire est composé d'une introduction bibliographique, avec un premier chapitre décrivant l'impact de la modulation (invalidation/surexpression) des différents acteurs impliqués dans le RCT sur le métabolisme des HDL et le développement de l'athérosclérose. Le second chapitre décrira les différentes

stratégies thérapeutiques ciblant les HDL pour le traitement de l'athérosclérose. Le troisième chapitre sera consacré aux différents résultats expérimentaux obtenus au cours de ce doctorat et aux perspectives ouvertes par ces travaux.

Bonne lecture.

Chapitre I
Transport Retour de Cholestérol (RCT)

1-Les lipoprotéines plasmatiques

Les lipoprotéines plasmatiques sont des complexes macromoléculaires de haute masse moléculaire, constituées d'une membrane formée d'une monocouche contenant majoritairement de phospholipides (PL) et de cholestérol libre (CL), et d'un cœur hydrophobe constitué principalement de lipides apolaires, triglycérides (TG) et cholestérol estérifié (CE), et de protéines appelées apolipoprotéines (Figure 1). Les apolipoprotéines servent non seulement à la reconnaissance des lipoprotéines par des récepteurs spécifiques mais sont également des enzymes lipolytiques associées aux lipoprotéines. La composition des lipoprotéines en apolipoprotéines, qui diffère suivant la classe de lipoprotéine, détermine ainsi leur fonction et leur devenir métabolique. Dans la circulation, les lipoprotéines sont dans un état dynamique permanent alliant synthèse, et sécrétion des tissus, maturation plasmatique, captation tissulaire et dégradation.

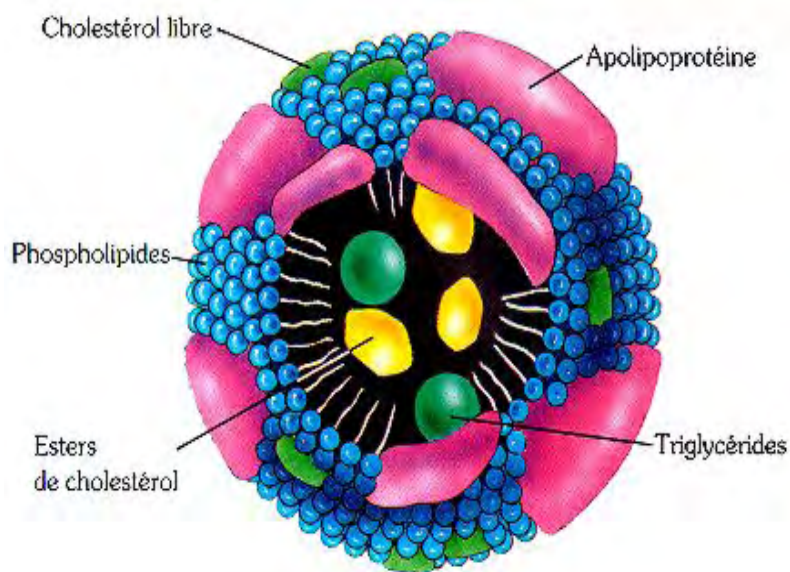


Figure 1. Structure d'une lipoprotéine plasmaticque. D'après <http://dc219.4shared.com/doc/O4ZDa9Wc/preview.html>

La fonction principale des lipoprotéines est de transporter d'un tissu à un autre les lipides hydrophobes, par nature insolubles dans plasma. Dans ce processus, les lipoprotéines subissent des modifications complexes qui affectent leur composition, leur structure et leur fonction. En dernière étape, les lipoprotéines sont captées par des récepteurs spécifiques ou non-spécifiques, afin de délivrer leur contenu aux cellules. Ce contenu est alors utilisé par la

cellule pour la production d'énergie, le stockage de composés énergétiques, la production et le maintien de la membrane cellulaire et la synthèse de différentes substances endogènes, telles que les hormones stéroïdiennes et les acides biliaires.

Les lipoprotéines peuvent être divisées selon leurs propriétés physiques (taille et densité), mais aussi selon leur composition en lipides et apolipoprotéines et selon leur fonction. De part leur densité, on distingue 5 grandes classes de lipoprotéines :

- les chylomicrons : ils transportent les triacylglycérols et le cholestérol d'origine alimentaire de l'intestin vers le foie et les autres tissus ;
- les lipoprotéines de très faible densité (VLDL : Very Low Density Lipoproteins) ;
- les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL : Intermediary Density Lipoproteins) ;
- les lipoprotéines de faible densité (LDL : Low Density Lipoproteins).

Ces 3 classes (VLDL, IDL, LDL) sont apparentées et transportent les lipides d'origine endogène du foie vers les tissus utilisateurs, les LDL assurant aussi une partie du retour du cholestérol au foie.

- les lipoprotéines de haute densité (HDL : High Density Lipoproteins). Elles transportent le cholestérol des tissus périphériques vers le foie (**Tableau 1**), et sont au centre de notre étude.

Ces différentes classes de lipoprotéines peuvent être également distinguées par leur composition en lipides et apolipoprotéines. Ainsi les chylomicrons et les VLDL sont très riches en triglycérides tandis que les IDL, les LDL et les HDL transportent majoritairement du cholestérol (**Tableau 2**).

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

Tableau 1 : Propriétés physiques des lipoprotéines

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

Tableau 2 : Composition des lipoprotéines plasmatiques

2-Composition et structure des HDL

Les lipides transportés par les lipoprotéines sont essentiellement les triacylglycérols et le cholestérol (libre et/ou estérifié) (**tableau 2**). Ils proviennent soit de l'alimentation soit de la synthèse *de novo* dans le foie.

Les particules HDL dans la circulation peuvent être divisées en trois catégories selon leur forme (naissante, discoïdale ou sphérique), leur densité (1,063 à 1,21 g/mL), leur diamètre (7 à 12 nm) ou encore leur contenu en lipides et protéines (**Tableau 1**).

Les particules HDL sont très hétérogènes (taille, composition et densité). Différentes méthodes sont proposées afin de les caractériser. Ainsi on définit différentes classes et sous-

classes de HDL en fonction de leur taille, charge ou densité (référence Rosenson, RS, 2011 dans le clinicalchemistry). Par exemple, on distingue :

- Par ultracentrifugation de densité : les HDL₂ dont la densité varie de 1,063 à 1,125 g/mL ; se séparent des HDL₃ (1,125 à 1,210 g/mL) ;
- Par résonance magnétique nucléaire : on identifie les HDL selon leur taille petite, moyenne, large. Les HDL₃ mesurent de 7 à 9 nm et sont plus petites que les HDL₂ qui mesurent 9 à 12 nm.
- Par électrophorèse en deux dimensions, les HDL sont caractérisées en fonction de leur charge et taille : les HDL₂ et les HDL₃ représentent 90% des HDL circulantes et migrent en position α . Les 10% restant sont des HDL qui migrent en pré- β ; il s'agit des HDL naissantes discoïdales faiblement lipidées, formées de 2 ou 3 molécules d'apolipoprotéines A-I (apoA-I) complexées avec une faible quantité de phospholipides et cholestérol libre ou des particules d'apoA-I délipidées (Rye & Barter, 2004).

Les apolipoprotéines présentes dans les HDL, dont les principales sont l'apoA-I (forme majoritaire représentant ~70 à 80% des protéines totales) et l'apoA-II (~20% des protéines totales) fonctionnent comme des éléments de structuration et comme des ligands pour les récepteurs.

3-Le métabolisme des HDL et le Transport Retour de Cholestérol (Figure 3)

De multiples facteurs contribuent au développement de l'athérosclérose et les dyslipidémies sont considérées comme l'une des principales causes des maladies cardiovasculaires. L'athérosclérose est une pathologie complexe, dans laquelle des plaques d'athérome se forment au niveau de la couche interne (intima) de l'artère. Pendant plusieurs années, l'athérosclérose était considérée comme la première cause de mortalité dans les pays industrialisés ; depuis elle représente la deuxième cause de mortalité après le cancer. La disproportion entre les lipoprotéines athéro-protectrices (les HDL), et les lipoprotéines athérogène (les LDL et les VLDL) dans le plasma a été décrite comme un facteur majeur dans le développement de l'athérosclérose (Di Angelantonio et al., 2009a; Gordon, Castelli, Hjortland, Kannel, & Dawber, 1977a). De nombreuses études ont démontré que le taux plasmatique des HDL et de leur protéine majeure, l'apoA-I, est inversement

associé au développement des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose (Di Angelantonio et al., 2009b; Gordon, Castelli, Hjortland, Kannel, & Dawber, 1977b). De récents travaux, publiés dans Lancet, apportent des données divergentes sur le rôle athéroprotecteur d'un taux élevé de HDL. Un variant génétique du gène de la lipase endothéliale, Asn396Ser, augmente de manière substantielle le taux de HDL circulant, mais ne réduit pas le risque d'infarctus du myocarde (Voight et al., 2012). La majorité des cellules et des tissus catabolisent peu le cholestérol mais, lorsque celui-ci est excédentaire, disposent d'un mécanisme permettant son efflux vers des accepteurs extracellulaires comme les HDL. L'effet athéroprotecteur des HDL est en grande partie attribué à ce rôle dans l'efflux de cholestérol des cellules périphériques vers le foie où il sera ensuite excrété vers la bile puis définitivement éliminé de l'organisme dans les fèces. Ce processus, qui comporte à la fois les voies de biosynthèse et de catabolisme des HDL, est appelé le Transport Retour de Cholestérol (RCT).

Ce processus, lorsqu'il est dérégulé, peut favoriser le développement de l'athérosclérose. En effet, la toute première étape dans le développement de cette pathologie est l'accumulation des LDL dans l'intima. Cette phase d'accumulation lipidique est suivie de modifications oxydatives des LDL. La deuxième phase implique les monocytes circulants qui adhèrent à la surface de l'endothélium, le traversent et évoluent en macrophages puis en captant les LDL-oxydées deviennent des cellules spumeuses gorgées de lipides. Ces macrophages présents dans l'espace sous-endothélial jouent un rôle clef dans la pathologie de l'athérosclérose. Dans ce contexte, il apparaît donc essentiel d'étudier l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL.

La voie de synthèse des HDL débute par la production et la sécrétion dans la circulation d'apoA-I (par le foie et l'intestin) et d'apoA-II (par le foie) (Figure 2). Une fois dans la circulation, ces apolipoprotéines sont capables d'interagir avec un transporteur retrouvé à la membrane plasmique des cellules, dont les macrophages tissulaires, appelé ATP Binding Cassette A1 (ABCA1). ABCA1 permet l'efflux de PL et de cholestérol vers l'apoA-I libre et vers les pré-βHDL. Il est établi que la lipidation de l'apoA-I et des pré-βHDL par ABCA1 constitue l'étape limitante dans le maintien des concentrations plasmatiques en HDL (J.-Y. Lee et al., 2005). Une fois les α-HDL formées, elles captent le cholestérol excédentaire par l'intermédiaire de deux autres transporteurs l'ATP Binding Cassette G1 (ABCG1) et le

Scavenger receptor class B type I (SR-BI) qui sont aussi présents à la membrane plasmique des macrophages. Ainsi, ABCG1 et SR-BI contribueraient à l'efflux des PL et du cholestérol cellulaire vers les particules HDL déjà lipidées de type α uniquement (Cavelier, Lorenzi, Rohrer, & Von Eckardstein, 2006).

La mesure de la capacité d'efflux du cholestérol de HDL isolées ou de apoA-I libre (dépourvue de lipides) se fait en marquant les cellules, en général des macrophages, avec du cholestérol tritié (^3H -cholestérol), qu'on expose ensuite à des HDL isolées ou apoA-I libre. Le pourcentage d'efflux est ensuite déterminé par le comptage de la radioactivité (Rothblat, De la Llera-Moya, Favari, Yancey, & Kellner-Weibel, 2002).

Dans la circulation, la maturation et le remodelage de ces particules HDL naissantes sont assurés par différents types d'enzymes :

- La Lecithin Cholesterol Acyl Transferase (**LCAT**) qui transforme le cholestérol libre des HDL naissantes en cholestérol esters (CE).

- La Phospholipid Transfer Protein (**PLTP**) qui permet le transfert des phospholipides entre les lipoprotéines riches en apoB vers les HDL.

- La Cholestérol Ester Transfert Protein (**CETP**) qui transfère le CE des HDL vers les LDL et VLDL par échange de leur TG (J. a Kuivenhoven et al., 1997). Cette enzyme est absente chez la souris.

- La Lipase Hépatique (**HL**) et la Lipase Endothéliale (**EL**) qui hydrolysent les phospholipides et les triglycérides des HDL matures (HDL₂) ce qui permet d'obtenir des particules HDL plus petites et plus denses appelées remnants de HDL₂ (Annema & Tietge, 2011).

Les concentrations plasmatiques en lipides contenus dans les HDL (cholestérol total, CE, PL et TG) ainsi que la taille des HDL peuvent être déterminées par HPLC et par dosage colorimétrique en plaques (cf. Chapitre I.2 et Chapitre III.3)

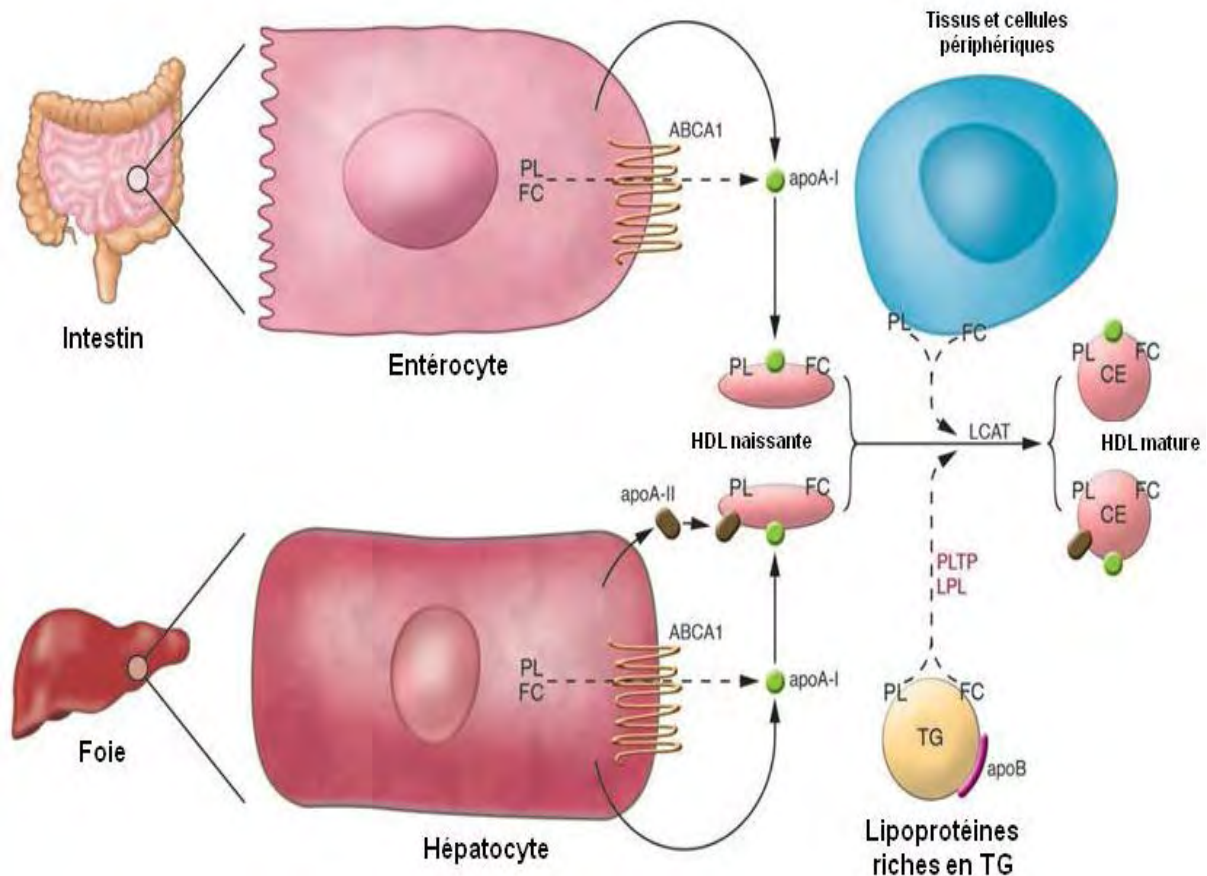


Figure 2 : Biosynthèse des HDL. Les entérocytes et les hépatocytes synthétisent de l'apoA-I faiblement lipidée, qui est sécrétée dans la circulation où elle est rapidement lipidée avec du cholestérol libre et des phospholipides *via* ABCA1 formant ainsi les HDL naissantes. Ces dernières vont accepter d'autres lipides provenant des tissus périphériques (*via* ABCG1 et SR-BI) et des lipoprotéines, et vont, se transformer en HDL matures. D'après (Rader, 2006)

Deux récepteurs sont impliqués dans la captation hépatique des HDL (Figure.3) :

- SR-BI, assure la captation sélective du cholestérol estérifié des HDL (Rigotti et al., 1997).

Ce processus de captation sélective implique le transfert des esters de cholestérol du cœur hydrophobe des HDL aux cellules sans internalisation et sans dégradation des holoparticules, c'est à dire des particules HDL entières (Valacchi, Sticozzi, Lim, & Pecorelli, 2011).

- Une voie alternative dans la captation des HDL a été mise en évidence par notre laboratoire, c'est la voie ecto- F_1 -ATPase/ $P2Y_{13}$ qui assure la captation de l'holoparticule HDL entière (lipides + protéines) par un site de basse affinité qui reste encore à identifier (Laurent O Martinez et al., 2003).

La captation hépatique des HDL peut être mesurée en utilisant la technique de perfusion de foie, à l'aide des HDL radiomarquées soit à l'iode 125 qui marque la partie protéique, soit avec 3 H-CE qui marque la partie lipidique du cœur. On peut aussi quantifier le contenu

hépatique en cholestérol en dosant les lipides neutres hépatiques (cf. Chapitre III article 1 et 3).

Finalement, l'élimination du cholestérol se fait par la bile sous forme de cholestérol libre et d'acides biliaires. Le transport hépatobiliaire du cholestérol libre et des acides biliaires est assuré respectivement par le complexe ABCG5/ABCG8 et le transporteur ABCB11 (Figure 3) (Kosters, Kunne, & Looije, 2006). La quantification du cholestérol éliminé par la bile se fait par la technique de canulation de la vésicule biliaire. Brièvement, la bile est récoltée sur 30 min. Les concentrations en cholestérol et acides biliaires sont déterminées par un dosage fluorimétrique (cf. Chapitre III.3).

L'ensemble du RCT *in vivo* chez la souris peut être mesuré par la technique de RCT des macrophages vers les fèces. En 2003, l'équipe de Daniel RADER a développé une technique pour mesurer le transport retour du cholestérol des macrophages vers les fèces *in vivo* chez la souris (Figure 4) (Zhang, Zanotti et al. 2003). Cette technique permet, après l'injection des macrophages marqués avec ^3H -cholestérol en intra-péritonéal, de suivre le mouvement du cholestérol tritié des macrophages en passant par la circulation, le foie, et les fèces. Cette technique a permis d'élucider l'implication de divers récepteurs et enzymes précédemment cités dans le métabolisme du cholestérol. Récemment, Turner *et al.* ont développé une technique non invasive pour mesurer le RCT chez l'homme. Cette technique consiste à infusée du $^{13}\text{C}_2$ -Cholestérol à des patients pendant 32h, l'efflux et l'estérification du cholestérol dans le plasma et les fèces sont déterminés par la quantification de l'isotope (Turner et al., 2012).

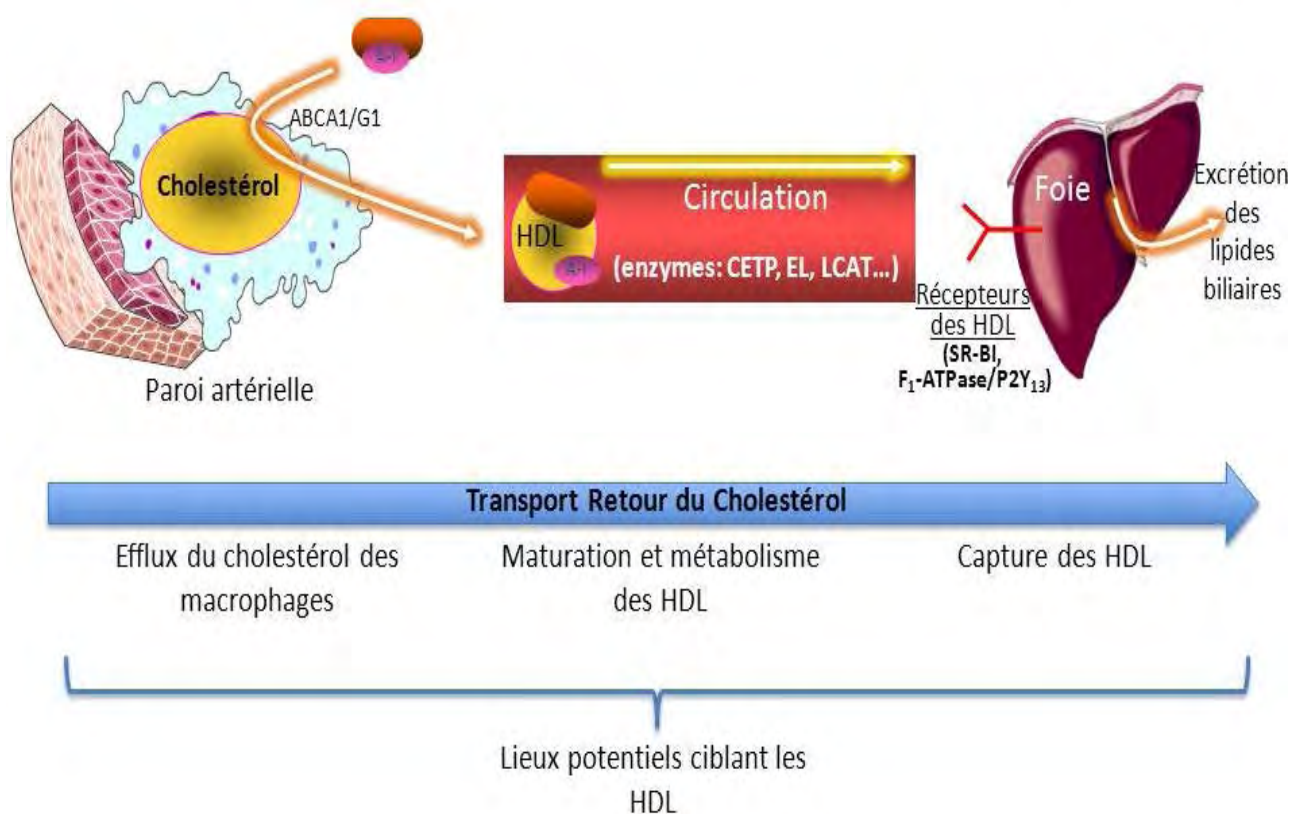


Figure 3 : Le Transport retour du Cholestérol. Les pré β -HDL acquièrent du cholestérol libre et des phospholipides à partir des tissus périphériques .Ce processus met en jeu des transporteurs d'efflux dont ABCA1, ABCG1 et SR-BI et permet la maturation des apoA-I ou pré β -HDL en HDL matures dites sphériques (HDL₃). Une fois incorporé dans ces HDL, le cholestérol est estérifié par la LCAT. Dans la circulation sanguine, les HDL₃ sont remaniées sous l'action combinée de la CETP et de la PLTP, et vont s'enrichir en triglycérides puis phospholipides pour former des HDL₂. Ces HDL₂ vont ensuite être hydrolysées par la LH et la LE pour donner des formes de HDL₂résiduelles (appelées remnants de HDL) qui seront préférentiellement captées par le foie.

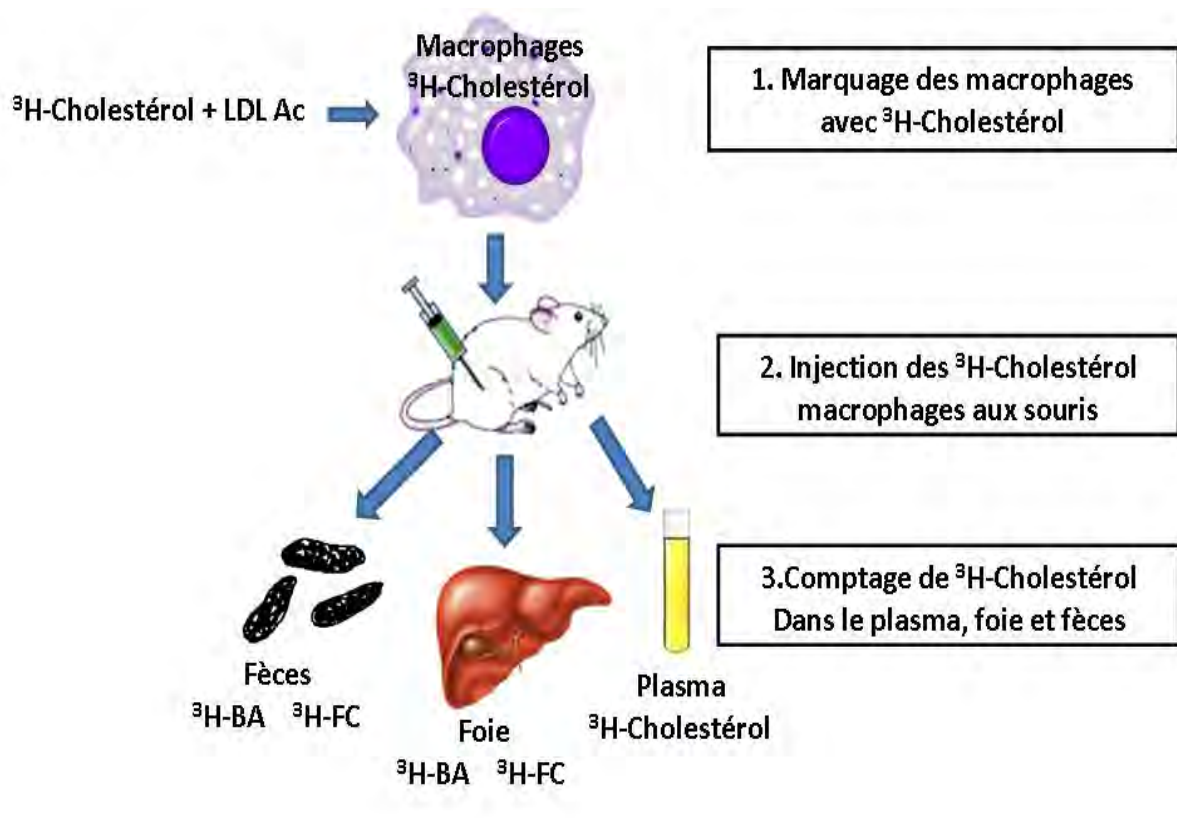


Figure 4. Principe du RCT *in vivo* chez la souris. Les macrophages marqués au ^3H -cholestérol sont injectés aux souris par voie intra-péritonéal. 48h après l’injection, la radioactivité est quantifiée dans le plasma, le foie et les fèces.

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons développer en détail l’impact de la modulation (invalidation/surexpression) des différents acteurs cités précédemment sur le métabolisme du cholestérol, le RCT et le développement de l’athérosclérose.

3.1-Protéines impliquées dans les voies d’efflux de cholestérol des macrophages (Figure 7 et Tableau 3)

Dans la pathologie de l’athérosclérose l’efflux du cholestérol des macrophages spumeux, qui constitue la première étape du RCT, met en jeu trois types de récepteurs. L’ATP Binding Cassette transporter A1 (ABCA1) assure l’efflux unidirectionnel de phospholipides et de cholestérol vers l’apoA-I libre ou faiblement lipidée (appelée pré- β HDL). Les deux autres transporteurs également impliqués, ABCG1 et SR-BI, assurent quant à eux l’efflux du cholestérol excédentaire vers ces particules d’HDL néo-formées *via* ABCA1.

3.1.1-La voie dépendante d'ABCA1

La première étape du RCT correspond à l'efflux de l'excès de phospholipides et de cholestérol des membranes cellulaires vers les particules d'HDL faiblement lipidées. Le transporteur ABCA1 est impliqué de façon cruciale dans ce processus.

3.1.1.1-Présentation de ABCA1

Le transporteur ABCA1 est une protéine ubiquitaire, exprimée de façon abondante dans les macrophages mais également dans les cellules endothéliales, adipocytes, entérocytes et hépatocytes. Ce transporteur est composé de 12 domaines transmembranaires et de deux sites intracellulaires de liaison à l'ATP (Figure 5) (Voloshyna & Reiss, 2011). Les travaux montrent qu'ABCA1 joue quantitativement un rôle crucial au niveau hépatique et intestinal dans la formation des HDL circulantes (Singaraja et al., 2006)(Brunham et al., 2006). Son rôle dans ces organes sera traité ultérieurement (cf. chapitre I 3.6.3).

En 1999, ABCA1 a été identifié comme le gène défectueux et responsable de la maladie de Tangier, qui est caractérisée par une diminution des taux plasmatiques en HDL-cholestérol (HDL-C), une accumulation des stérols dans les macrophages tissulaires, et une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires (Joyce, Freeman, Brewer, & Santamarina-Fojo, 2003). Depuis, de nombreuses études ont été réalisées pour comprendre le fonctionnement d'ABCA1 et ont évalué l'importance de l'expression d'ABCA1 sur les macrophages dans la première étape de RCT : l'efflux de cholestérol à partir de macrophages tissulaires périphériques vers l'apoA-I libre ou faiblement lipidée (pré-β HDL) (**Figure 7**). Ainsi, les souris invalidées pour ABCA1 (ABCA1^{-/-}) ont le même phénotype physiopathologique que les patients atteints de la maladie de Tangier, avec un taux de HDL circulant fortement diminué (Joyce et al., 2003). *In vitro*, l'efflux du cholestérol des macrophages est diminué vers l'apoA-I et corrélativement, *in vivo*, le RCT depuis les macrophages vers les fèces (macrophage-RCT) est altéré chez ces souris ABCA1^{-/-} (Joyce et al., 2003)(McNeish et al., 2000)(M.-D. Wang, Franklin, & Marcel, 2007). D'autres études ont

évalué la contribution spécifique d'ABCA1 exprimé dans les macrophages dans le métabolisme des HDL, le RCT et le développement de l'athérosclérose.

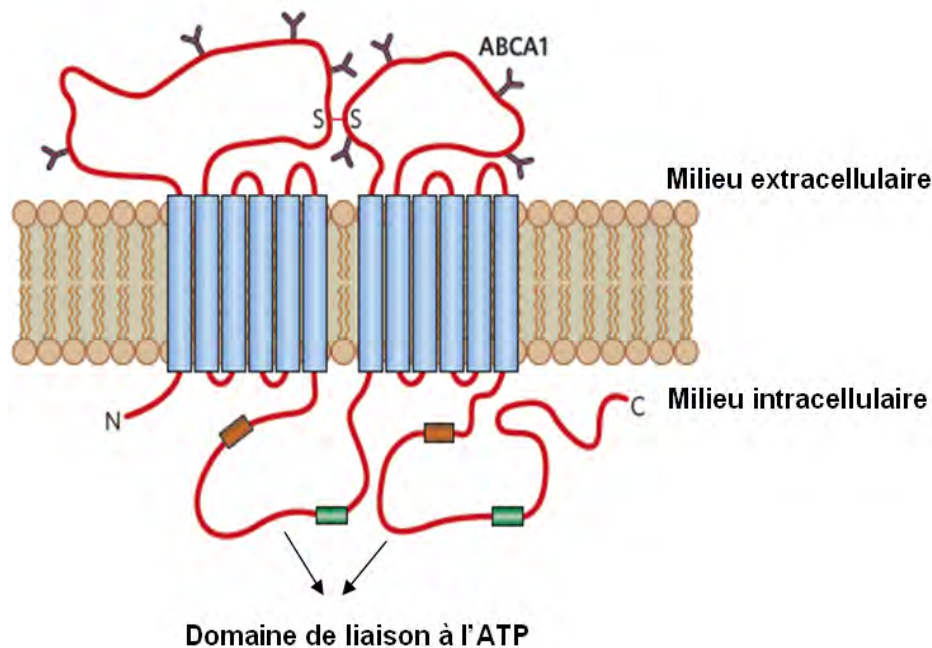


Figure 5. Structure d'ABCA1. En bleu: la partie correspondant aux domaines transmembranaires. En rouge: les boucles avec des motifs de glycosylation côté extracellulaire et des sites de liaison à l'ATP côté intracellulaire. D'après (Maxfield & Tabas, 2005).

3.1.1.2-Implication d'ABCA1 des macrophages dans le RCT et le développement de l'athérosclérose chez la souris

Le modèle de transplantation de la moelle osseuse est une technique qui consiste à injecter de la moelle osseuse issue d'un modèle de souris (donneur) à un autre modèle de souris irradiés (receveur), ce qui permet la repopulation du système immunitaire, dont les macrophages chez ces souris irradiées. En utilisant cette technique, Haghpassand et *al.* ont montré, que la repopulation des macrophages sauvages (Wild Type, WT) chez les souris ABCA1^{-/-} est associée à une légère augmentation des taux plasmatiques de HDL mais ce taux reste significativement inférieur à celui mesuré chez les souris WT. Ce résultats suggèrent que l'expression d'ABCA1 au niveau des macrophages a un faible impact sur la concentration plasmatique en HDL-C (Haghpassand, Bourassa, Francone, & Aiello, 2001). Malgré ce faible impact sur le HDL-C, Wang et *al.* ont montré que l'expression d'ABCA1 dans les macrophages contribue au RCT *in vivo*. En effet, le transport retour du cholestérol des macrophages vers les fèces est significativement diminué chez les souris sauvages ayant reçu des macrophages

marqués avec du cholestérol tritié (^3H -cholestérol) issus de souris ABCA1^{-/-} en comparaison au groupe de souris sauvages ayant reçu macrophages des souris sauvages. Sur ce même modèle, des souris sauvages transplantées avec des macrophages de souris ABCA1^{-/-} marqués au ^3H -cholestérol, une autre équipe a confirmé une diminution du RCT (-50%), associée à une diminution de la radioactivité retrouvée dans le foie (-25%), dans la bile et dans les fèces. Ainsi, ces études montrent qu'ABCA1 est un élément essentiel du RCT et prévient l'accumulation excessive de cholestérol dans les macrophages. Cette diminution du RCT des macrophages vers les fèces n'est pas totale puisqu'une quantité substantielle du traceur est toujours retrouvée dans le plasma et les fèces des souris sauvages injectées avec les macrophages de souris ABCA1^{-/-} (X. Wang & Collins, 2007). Cependant, en absence d'ABCA1 dans les macrophages, le RCT résiduel suggère que d'autres récepteurs ou transporteurs sont impliqués (M.-D. Wang et al., 2007). Aiello et al. ont étudié le rôle de ABCA1 des macrophages sur les taux des lipides plasmatiques et le développement de l'athérosclérose. Les auteurs ont montré que la transplantation de la moelle osseuse issue de souris doublement invalidées pour apoE et ABCA1 (apoE^{-/-} x ABCA1^{-/-}) à des souris apoE^{-/-}, ne modifie pas les taux plasmatiques en cholestérol, triglycérides et HDL circulants. Par contre, les auteurs ont observé, à l'âge de 24 semaines sous un régime normolipidique (chow diet), une augmentation significative de la taille des plaques d'athérome dans le groupe transplanté avec une moelle déficiente en ABCA1. L'ensemble de ces résultats démontre que ABCA1 joue un rôle athéroprotecteur en assurant l'efflux du cholestérol des macrophages, mais que ce processus essentiel n'a quantitativement aucun impact sur les concentrations de lipides plasmatiques (Aiello, 2002). Toutefois, d'autres études menées sur des souris génétiquement invalidées à la fois pour ABCA1 spécifiquement dans les macrophages (à l'aide de système cre/Lox) et pour le récepteur aux LDL (ABCA1^{-M/-M} x LDLr^{-/-}) ont donné des résultats sensiblement différents de ceux précédemment cités. En effet, sur ce modèle (ABCA1^{-M/-M} x LDLr^{-/-}), Brunham et al. ont montré que l'inactivation de ABCA1 dans les macrophages ne favorise pas le développement des plaques d'athérome par comparaison au groupe de souris LDLr^{-/-}. Ces résultats ont été mesurés sur des souris âgées entre 12 et 20 semaines, après 16 semaines de régime hypercholestérolémiant (0.25% de cholestérol et 15% de gras) (Brunham et al., 2009). La différence de résultat entre ces deux études sur le rôle d'ABCA1 dans le développement de l'athérosclérose peut être dû aux différents modèles expérimentaux utilisés. En effet, dans le modèle ABCA1^{-M/-M} x LDLr^{-/-},

l'utilisation de système cre/lox permet la délétion de ABCA1 spécifiquement dans les macrophages et les neutrophiles, mais pas dans les lymphocytes où ABCA1 est fortement exprimé, alors que dans le modèle de transfert de moelle osseuse, la transplantation de la moelle osseuse issue des souris apoE^{-/-} x ABCA1^{-/-} à des souris apoE^{-/-}, induit une délétion complète de ABCA1 dans tout le système hématopoïétique ce qui peut créer un profil pro-inflammatoire et pro-athérogène. Ainsi, le développement de l'athérosclérose chez les souris apoE^{-/-} peut être dû à la délétion d'ABCA1 dans les lymphocytes et à une augmentation de l'inflammation. De plus, l'utilisation de deux modèles de souris différents : apoE^{-/-} et LDLr^{-/-} sont deux modèles dits « humanisés » puisque comme chez l'homme, ces souris sont caractérisées par des concentrations élevées en LDL-C et VLDL-C et faibles en HDL-C. Cependant, contrairement aux souris apoE^{-/-} qui développent des plaques spontanées à partir de l'âge de 10 semaines (cf. chapitre I 3.2.1.3), les souris LDLr^{-/-} développent des plaques dites « induites » après un régime hypercholestérolémiant.

Inversement, d'autres travaux ont étudié l'effet de la surexpression d'ABCA1 au niveau des macrophages murins sur les lipides plasmatiques et le développement de l'athérosclérose. Pour cela, des souris LDLr^{-/-} ont été transplantées avec de la moelle osseuse issue de souris transgéniques (Tg) surexprimant le gène humain de ABCA1 (ABCA1Tg→LDLr^{-/-}). Les auteurs n'ont pas observé de modifications des concentrations en lipides plasmatiques entre les souris ABCA1Tg→LDLr^{-/-} et les souris WT→LDLr^{-/-}. La surexpression d'ABCA1 au niveau des macrophages n'a pas inhibé la formation des cellules spumeuses mais a inhibé la progression de la plaque d'athérome après 15 semaines de régime hypercholestérolémiant (0.25% de cholestérol et 15% de gras). En effet, la composition de la plaque était différente entre les souris WT→LDLr^{-/-} (40% de macrophages et 15% de collagène) et les souris ABCA1Tg→LDLr^{-/-} (53% de macrophages et 9% de collagène). Les macrophages et le collagène sont deux facteurs indicatifs de la progression de la lésion d'athérome (Van Eck et al., 2006). Ces observations suggèrent qu'une surexpression d'ABCA1 au niveau des macrophages, ne bloque pas l'initiation de l'athérosclérose mais inhibe sa progression.

En conclusion l'ensemble de ces résultats montre le rôle prépondérant d'ABCA1 au niveau des macrophages dans l'efflux de cholestérol, ce qui va limiter l'accumulation de cholestérol dans les macrophages et éviter ainsi la formation des cellules spumeuses au sein de la paroi artérielle. ABCA1 dans le macrophage semble donc être une protéine à effet antiathérogène.

3.1.2- La voie ABCG1 dépendante

3.1.2.1-Présentation de ABCG1

ABCG1 appartient également à la famille des ABC transporteurs, il est principalement exprimé sur les cellules endothéliales, les macrophages et les hépatocytes. Comme ABCA1, il constitue une cible des LXR mais contrairement à ABCA1, ABCG1 est un semi-transporteur qui a besoin d'être sous forme d'homodimère pour être fonctionnel. À l'inverse d'ABCA1, ABCG1 contribue à l'efflux de cholestérol et des phospholipides cellulaires vers les particules HDL déjà lipidées de type α (**Figure 7**). Il semblerait donc que ABCA1 et ABCG1 puissent agir de façon synergique, ABCG1 lipidant les particules HDL néo-formées sous l'action d'ABCA1 (Oram & Vaughan, 2006).

3.1.2.2-Implication de ABCG1 des macrophages dans le RCT et le développement de l'athérosclérose chez la souris

Wang *et al.* ont injecté des macrophages marqués avec du ^3H -cholestérol, issus de souris déficientes en ABCG1 à des souris sauvages. Les taux plasmatiques en ^3H -cholestérol ont été diminués de 20% et l'excrétion du ^3H -cholestérol dans les fèces de 25% comparé aux souris du groupe contrôle ayant reçu des macrophages exprimant ABCG1. Ces résultats suggèrent que l'expression de ABCG1 dans les macrophages pourrait être athéroprotecteur, en favorisant l'efflux de cholestérol des macrophages et le RCT (X. Wang & Collins, 2007).

Cependant, plusieurs études ont fourni des résultats contradictoires sur l'implication d'ABCG1 présents dans les macrophages sur le développement de l'athérosclérose chez la souris. Out *et al.* ont reporté une augmentation significative (+33-36%) du développement des lésions d'athérosclérose chez des souris LDLr^{-/-} transplantées avec de la moelle osseuse issue des souris ABCG1^{-/-} et nourries pendant 12 semaines avec un régime hypercholestérolémiant (0.25% de cholestérol et 15% de gras) (Out *et al.*, 2006). Deux autres équipes rapportent des résultats opposés à ces travaux. Baldan *et al.* montrent une diminution du développement de la plaque d'athérome chez les souris LDLr^{-/-} (-40%) et apoE^{-/-} (-60%) transplantées avec de la moelle osseuse provenant des souris ABCG1^{-/-} en comparaison avec des souris LDLr^{-/-} et apoE^{-/-} transplantées avec de la moelle osseuse

provenant des souris sauvages après 16 semaines d'un régime hypercholestérolémiant (1.25% de cholestérol et 21% de gras). De façon similaire, Ranalletta et *al.* ont observé une diminution du développement de la plaque d'athérome chez des souris LDLr^{-/-} transplantées avec de la moelle osseuse issue de souris ABCG1^{-/-} et nourries pendant 11 semaines avec un régime hypercholestérolémiant (0.2% de cholestérol et 21% de gras). Chaque groupe a fourni une explication mécanistique différente pour interpréter la différence par rapport à la première étude. Ranalletta et *al.* suggèrent qu'une augmentation de l'expression de ABCA1 et de la sécrétion d'apoE par les macrophages pourrait compenser l'absence de l'efflux de cholestérol *via* ABCG1 chez les souris LDLr^{-/-} (Ranalletta et al., 2006). Baldán et *al.* ont observé une accélération de l'apoptose au niveau des macrophages ABCG1^{-/-} et ont émis l'hypothèse que cela pourrait être à l'origine de la diminution de l'athérosclérose chez ces souris (Baldán et al., 2006).

L'effet de l'inactivation d'ABCG1 dans les macrophages sur les concentrations plasmatiques en lipides et lipoprotéines a été étudié, avec encore une fois des résultats contradictoires entre les trois études. En effet, Out et *al.* n'ont pas trouvé de différence significative dans les taux plasmatiques en lipides et lipoprotéines chez les souris LDLr^{-/-} transplantées avec de la moelle osseuse issue des souris ABCG1^{-/-} que ce soit sous un régime normolipidique ou hypercholestérolémiant. Au contraire, dans l'étude de Ranalletta et *al.* la concentration plasmatique en cholestérol total baisse significativement chez les souris LDLr^{-/-} transplantées avec de la moelle osseuse issue des souris ABCG1^{-/-}, alors que seule la concentration plasmatique en HDL-C baisse significativement dans l'étude de Baldán et *al.* Dans les trois publications, les souris ont la même origine mais le temps de récupération après l'irradiation avant la mise sous régime, ainsi que la composition des régimes sont différents et pourraient être à l'origine des variations de résultats.

De même, d'autres modèles de souris ont été utilisés pour déterminer l'impact de la surexpression d'ABCG1 dans les macrophages sur l'efflux de cholestérol *in vivo* et le développement de la plaque d'athérosclérose. Basso et *al.* ont montré sur des souris LDLr^{-/-} surexprimant ABCG1 murin, une augmentation de l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL matures et de la taille des lésions d'athérosclérose (+40-50%), sans modification de la taille ou de la composition lipidique des HDL circulantes par rapport au groupe contrôle (LDLr^{-/-}). L'augmentation de l'athérosclérose dans cette étude peut être due à l'augmentation des taux de VLDL, IDL et LDL plasmatiques connue pour leurs effets pro-

athérogènes (Basso et al., 2006). Inversement, une autre étude menée sur des souris apoE^{-/-} montre que la surexpression de ABCG1 humain n'a aucun effet sur l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL, ni sur le développement de la plaque d'athérome (Burgess et al., 2008), ces souris étant nourries avec un régime hypercholestérolémiant (0.2% de cholestérol et 21.2% de gras) pendant 14 semaines. La différence d'origine du gène ABCG1 (murin *versus* humain) et le fond génétique des souris utilisées (LDLr^{-/-} *versus* apoE^{-/-}) pourraient être à l'origine de ces deux résultats contradictoires.

En conclusion, l'ensemble de ces différents résultats ne permet pas de conclure formellement sur le rôle d'ABCG1 des macrophages sur le métabolisme lipidique et le développement de l'athérosclérose.

Les résultats contradictoires au niveau du développement de l'athérosclérose chez les souris ABCA1^{-/-} et ABCG1^{-/-} au niveau des macrophages suggèrent que les effets de l'invalidation d'un transporteur (ABCA1 ou ABCG1) sont compensés par une régulation à la hausse de l'autre transporteur. Pour tester cette hypothèse Yvan-Charvet *et al.*, ont injectés de la moelle osseuse issus des souris doublement invalidées pour ABCA1 et ABCG1 (ABCA1^{-/-} x ABCG1^{-/-}) à des souris LDLr^{-/-} (ABCA1^{-/-} x ABCG1^{-/-} → LDLr^{-/-}). Leurs résultats montrent une augmentation de l'athérosclérose et une accumulation massive des cellules spumeuses dans le myocarde en comparaison avec les souris ABCA1^{-/-} → LDLr^{-/-} et ABCG1 → LDLr^{-/-}. De plus, les macrophages issus des souris ABCA1^{-/-} x ABCG1^{-/-} présentent un défaut majeur de l'efflux de cholestérol, une diminution de sécrétion de l'apoE, et une augmentation de l'apoptose en contact de LDL oxydées, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes inflammatoires et des chimiokines. Cette étude suggère que les activités combinées d'ABCA1 et d'ABCG1 au niveau des macrophages ont un impact majeur sur les effets anti-athérogènes des HDL (Yvan-Charvet et al., 2007).

Récemment, il a été montré que les HDL et leurs transporteurs ABCA1 et ABCG1 inhibent la prolifération des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse et qui donnent naissance aux leucocytes et aux monocytes, en induisant l'efflux du cholestérol (Westerterp et al., 2012). De ce fait, un nombre élevé de leucocytes et en particulier de monocytes représente un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires (Coller, 2005). Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 sont hautement exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices multipotentes (HSPCs) (De Grouw et al., 2006; Peeters et al., 2006). Yvan-Charvet *et al.* ont montré que les souris ABCA1^{-/-} x

ABCG1^{-/-}, sous un régime normolipidique, présentent une augmentation de cellules myéloïdes et développent une monocytose et de la neutrophilie dans le sang et la moelle osseuse. De plus, ces souris développent une hepato-splénomégalie et une hypertrophie des plaques de Peyer intestinales avec une infiltration importante de macrophages spumeux et de neutrophiles. Ce phénotype suggère une maladie myéloproliférative et pourrait être médié par une augmentation de l'expression des récepteurs IL-3/GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages) à la surface cellulaire, qui va à son tour stimuler la voie de signalisation en aval Ras/Erk et augmenter les réponses prolifératives de l'IL3 et le GM-CSF suite à l'invalidation des transporteurs ABC et l'accumulation du cholestérol au niveau de la membrane (Yvan-Charvet et al., 2010). De manière intéressante, l'infiltration de différents organes par les cellules myéloïdes est complètement supprimée par l'expression de l'apoA-I humaine. Une importante réduction de la splénomégalie ainsi qu'une normalisation de l'hypercellularité ont également été observés (Yvan-Charvet et al., 2010). Toutes ces données suggèrent que la suppression de la prolifération des cellules myéloïdes, de la leucocytose et de la monocytose représenterait un mécanisme de l'effet antiathérogène des HDL en agissant de manière précoce dans le cycle de vie des leucocytes.

3.1.3-La voie SR-BI dépendante

Un certain nombre d'études suggère qu'il y aurait une voie d'efflux du cholestérol des macrophages vers les HDL matures (HDL₂ ou HDL₃), médiée par SR-BI et qui serait complémentaire aux voies précédemment décrites, médiées par ABCA1 et ABCG1 (**Figure 7**).

3.1.3.1-Présentation de SR-BI

SR-BI est une glycoprotéine qui contient deux domaines transmembranaires et cytoplasmiques et un domaine extracellulaire avec plusieurs sites de glycosylation (**Figure 6**). SR-BI est exprimé dans de nombreux organes et types cellulaires comme le cerveau, le rein, l'intestin, les macrophages, les cellules vasculaires endothéliales et le foie (Van Eck, Pennings, Hoekstra, Out, & Van Berkel, 2005). Contrairement à ABCA1/G1, SR-BI assure un

flux bidirectionnel du cholestérol non estérifié entre les cellules et les lipoprotéines, principalement les HDL (Rosenson et al., 2012).

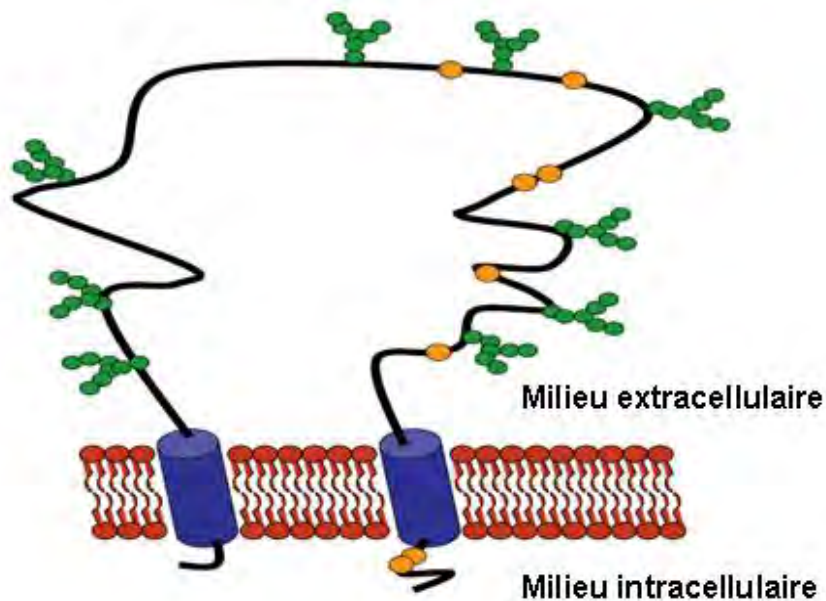


Figure 6. Structure de SR-BI. SR-BI est formé par une large boucle extracellulaire glycosylée, insérée dans la membrane plasmique par 2 domaines transmembranaires et deux courtes extensions cytoplasmiques N-terminale et C-terminale. D'après (Hoekstra, Berkel, & Eck, 2010).

3.1.3.2-Implication de SR-BI dans l'efflux du cholestérol des macrophages et le développement de l'athérosclérose chez la souris

Des travaux *in vitro* sur des macrophages en culture ont montré que SR-BI permet l'influx ou l'efflux du cholestérol non estérifié (flux dit « bidirectionnel ») entre les macrophages et les HDL (Rosenson et al., 2012). Toutefois, l'implication *in vivo* de SR-BI dans le processus d'efflux du cholestérol des macrophages spumeux est moins claire. En effet, après l'injection de macrophages issus de souris invalidées pour SR-BI (SR-BI^{-/-}), marqués avec du ³H-cholestérol, à des souris sauvages aucune différence significative du niveau de traceur radiomarqué n'a été observée dans le plasma et les fèces de ces souris en comparaison avec les souris contrôles ayant reçu des macrophages sauvages (X. Wang & Collins, 2007). Ce résultat suggère que, physiologiquement, seuls ABCA1 et ABCG1 participeraient à l'efflux du cholestérol des macrophages. Toutefois, l'expression de SR-BI dans les macrophages jouerait un rôle athéroprotecteur. En effet, des souris LDLr^{-/-} (Covey, Krieger, Wang, Penman, & Trigatti, 2003) ou apoE^{-/-} (W. Zhang et al., 2003) transplantées avec de la moelle osseuse

issue des souris SR-BI^{-/-} développent des plaques d'athérome de taille environ 2 fois plus importante que le groupe contrôle, ces souris ayant été nourries pendant deux mois sous régime hypercholestérolémiant pour les LDLr^{-/-} et pendant 12 semaines sous régime normolipidique pour les apoE^{-/-}. Dans ces travaux, les auteurs n'ont observé aucune modification des paramètres lipidiques ni du taux circulant de HDL-C. De plus, l'efflux du cholestérol des macrophages vers les HDL matures (*in vitro*) reste également inchangé.

L'effet de la surexpression de SR-BI dans les macrophages sur le RCT et le développement de l'athérosclérose n'a pas été étudié.

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'expression de SR-BI au niveau des macrophages joue un rôle athéroprotecteur *in vivo* mais les mécanismes antiathérogènes sont indépendants de son rôle dans l'efflux de cholestérol cellulaire.

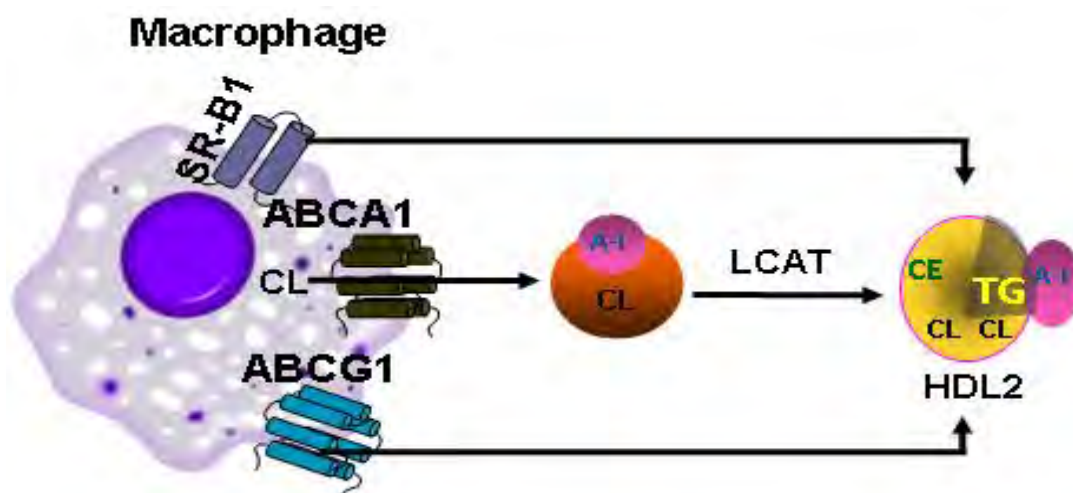


Figure 7. Implication d'ABCA1, ABCG1 et SR-BI dans l'efflux de cholestérol au niveau des macrophages. Au niveau des tissus périphériques et des macrophages ABCA1 va permettre la lipodation d'apoA-I faiblement lipidée. Les HDL matures sont formées par l'action de la LCAT et favorisent l'efflux de cholestérol des macrophages *via* ABCG1 et SR-BI.

Manipulation génétique au niveau du macrophage	Effet sur HDL-C	Effet sur le RCT	Effet sur l'athérosclérose	Référence
Invalidation ABCA1	Diminution	Diminution	Augmentation (apoE ^{-/-}) Pas d'effet (LDLr ^{-/-})	(X. Wang & Collins, 2007)(M.-D. Wang et al., 2007)(Haghsassand et al., 2001)(Aiello, 2002)
Surexpression ABCA1	Pas d'effet	ND	Diminution (LDLr ^{-/-})	(Van Eck et al., 2006)
Invalidation ABCG1	Diminution	Diminution	Diminution (apoE ^{-/-}) Augmentation Diminution (LDLr ^{-/-})	(X. Wang & Collins, 2007)(Baldán et al., 2006)(Ranalletta et al., 2006)
Surexpression ABCG1	Pas d'effet	ND	Augmentation (LDLr ^{-/-}) Pas d'effet (apoE ^{-/-})	(Basso et al., 2006)(Burgess et al., 2008)
Invalidation SR-BI	Pas d'effet	Pas d'effet	Augmentation (LDLr ^{-/-}) (apoE ^{-/-})	(X. Wang & Collins, 2007)(W. Zhang et al., 2003)

Tableau 3. Relations entre les taux plasmatiques de HDL-C, le RCT et le développement de l'athérosclérose en réponse à la manipulation génétique d'ABCA1, ABCG1 et SR-BI au niveau des macrophages.

3.2-Protéines impliquées dans la composition et la maturation (remodelage) plasmatique des HDL (Figure 8).

3.2.1-Implication des apolipoprotéines plasmatiques dans le RCT et l'athérosclérose (Tableau 4)

3.2.1.1-Apolipoprotéine A-I (apoA-I)

L'apolipoprotéine A-I (apoA-I) est la protéine majoritaire des HDL. Elle est principalement synthétisée par le foie et l'intestin. Son expression est activée par les récepteurs nucléaires comme Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α et δ (PPAR α et δ), Retinoid X Receptor (RXR) (Dullens, Plat, & Mensink, 2007).

Le rôle de l'apoA-I sur le métabolisme du cholestérol a été étudié en invalidant l'expression de l'apoA-I chez la souris. L'extinction de l'expression de cette protéine diminue fortement les taux plasmatiques en cholestérol total, HDL-C, LDL-C, et VLDL-C par comparaison au groupe de souris contrôles. Cependant, cette diminution n'a aucun effet sur la composition lipidique du foie, ni sur l'expression de ARNm des gènes hépatiques impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, comme l'HMG-CoA réductase, ABCA1, SR-BI. De plus, l'invalidation de l'apoA-I ne modifie ni les sécrétions de lipides biliaires ni l'excrétion de cholestérol dans les fèces par comparaison au groupe de souris sauvages. Des résultats comparables ont été obtenus en mettant ces souris sous régime hypercholestérolémiant (2% de cholestérol) (Amigo et al., 2011). Ces observations suggèrent que l'apoA-I joue un rôle important dans le maintien des taux plasmatiques en HDL-C que ce soit sous un régime normolipidique (chow diet) ou sous un régime hypercholestérolémiant mais qu'elle ne modifie pas le RCT.

Le rôle de l'apoA-I dans le développement de l'athérosclérose a été étudié chez les souris doublement invalidées pour l'apoA-I et le LDLr (apoA-I^{-/-} x LDLr^{-/-}). On observe chez ces souris une augmentation significative de la taille des lésions d'athérome, de l'ordre de 3 fois en comparaison avec des souris LDLr^{-/-}. Cette augmentation est due à une diminution de taux plasmatiques de HDL-C (R. E. Moore et al., 2003). Ce résultat suggère que l'apoA-I joue un rôle athéroprotecteur en maintenant les concentrations plasmatiques en HDL-C. Pour

confirmer ce rôle athéroprotecteur, les mêmes auteurs ont développé un autre modèle de souris susceptibles à l'athérosclérose ($LDLr^{-/-}$ x $apobec^{-/-}$). Ces souris, qui n'expriment ni le LDL récepteur ni les apoB, ont la particularité de présenter un profil similaire aux patients hypercholestérolémiques coronariens (concentration élevée en cholestérol total et LDL-C). De plus, l'inactivation de l'apoA-I dans ce modèle ($apoA-I^{-/-}$ x $LDLr^{-/-}$ x $apobec^{-/-}$) ne modifie pas les taux plasmatiques en HDL-C ; cependant ces HDL sont plus large et plus riche en apoE que les HDL contrôles. La taille des lésions d'athérosclérose a été étudiée sous régime normolipidique (chow diet), à l'âge de 10 mois. Les résultats montrent que la taille des lésions est augmentée d'un facteur 2 chez ces souris par comparaison aux souris contrôles $LDLr^{-/-}$ x $apobec^{-/-}$. De plus, ces souris présentent une diminution de l'activité plasmatique de la LCAT (enzyme responsable de la conversion de cholestérol libre en cholestérol estérifié) ainsi qu'une diminution du RCT des macrophages vers les fèces. En effet, après injection de macrophages marqués avec du 3H -cholestérol, la quantité de traceur dans le plasma est diminuée ainsi que sa forme estérifiée (3H -cholestéryl ester) traduisant une diminution de l'activité de LCAT. Le défaut de RCT se traduit par une diminution de l'excrétion dans les fèces de stérols neutres et d'acides biliaires radiomarqués. Ces résultats suggèrent que l'apoA-I peut inhiber le développement de l'athérosclérose en stimulant le RCT et en stimulant l'activité de la LCAT (Moore et al., 2005).

L'effet de la surexpression de l'apoA-I humaine (par le biais d'adénovirus ou méthode transgénique) sur le métabolisme des lipoprotéines a été étudié chez la souris sauvage (C57BL/6). Il a été observé que la surexpression d'apoA-I augmente le taux plasmatique de HDL-C d'un facteur 2 (méthode adénovirus) à 3 (méthode transgénique). Aucun effet n'a été observé sur les taux plasmatiques des autres classes de lipoprotéines (De Geest et al., 2000). Chez la souris surexprimant l'apoA-I (méthode adénovirus), le RCT des macrophages vers les fèces est augmenté. En effet, après l'injection des macrophages marqués avec du 3H -cholestérol, on observe une augmentation du traceur dans le plasma, le foie (+35%) et les fèces (+65%) (Zhang et al., 2003). Ces modifications corrèlent avec la diminution du développement de la plaque dans les aortes (-42%) et dans les crosses aortiques (- 44%) (Kawashiri et al., 2002; Valenta et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'apoA-I joue un rôle important dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose en stimulant le RCT des macrophages vers les fèces, avec comme conséquence une diminution de développement de l'athérosclérose.

3.2.1.2-Apolipoprotéine A-II (apoA-II):

Chez l'homme et la souris, l'apoA-II est la deuxième apolipoprotéine la plus abondante (~20%) des HDL, elle est synthétisée par le foie et sa forme mature dans la circulation chez l'homme est dimérique, contrairement à la forme mature de l'apoA-II de souris qui est monomérique. Son expression est activée par les récepteurs nucléaires RXR/PPAR α et δ et SREBP2. Contrairement à l'apoA-I, le rôle spécifique de l'apoA-II dans le métabolisme des HDL et le développement de l'athérosclérose est peu connu (Tailleux, Duriez, Fruchart, & Clavey, 2002).

Cependant, le rôle de l'apoA-II a été étudié chez la souris invalidée pour le gène apoA-II (apoA-II^{-/-}). On observe chez ces souris une diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol total (-67%), qui est due en grande partie à une diminution de la concentration en HDL-C (-73%), avec également une diminution de la taille des HDL. Aucun effet de cette invalidation n'a été observé au niveau des concentrations plasmatiques en triglycérides. La diminution des concentrations plasmatiques en HDL-C est associée à une augmentation de catabolisme des particules HDL. En effet, après injection par voie intra-veineuse des HDL issues des souris sauvages doublement marquées, sur la partie protéique avec de ¹²⁵I et sur la partie lipidique avec du ³H-cholestéryl éther, on observe une diminution des deux traceurs dans le plasma (-57% pour ³H et -41% pour ¹²⁵I) ainsi qu'une augmentation du catabolisme de ³H (+68%) et de ¹²⁵I (+80%) (Weng & Breslow, 1996). Pour étudier le rôle de apoA-II dans l'athérosclérose, les auteurs ont généré des souris doublement invalidées pour l'apoA-II et l'apoE (apoA-II^{-/-} x apoE^{-/-}). Bien que l'apoA-II ne soit pas l'apolipoprotéine majoritaire des HDL (~20% contre 80% pour l'apoA-I), son invalidation chez la souris apoE^{-/-} entraîne d'importants changements au niveau des profils des lipoprotéines plasmatiques. En effet, on observe chez ces souris une diminution en CT (-66%) ainsi qu'une diminution importante en HDL-C et non-HDL-C. Cette diminution de la fraction non HDL-C peut s'expliquer par une augmentation de catabolisme des VLDL. En effet, après injection de VLDL issus des souris apoE^{-/-} marquées avec ³H-cholestérol oleoyl éther, on observe une diminution de traceur dans le plasma des souris apoA-II^{-/-} x apoE^{-/-} en comparaison avec les souris contrôles apoE^{-/-} (Weng & Breslow, 1996). L'ensemble de ces résultats montre que l'apoA-II joue un rôle dans le catabolisme des lipoprotéines pro-athérogène et donc son

absence pourrait diminuer le développement de l'athérosclérose. Cependant les auteurs n'ont pas étudié cet effet chez les souris apoA-II^{-/-} x apoE^{-/-}.

D'autre part, de nombreuses équipes ont étudié l'impact de la surexpression de l'apoA-II murine chez la souris (apoA-II Tgm). Chez ces souris, les concentrations plasmatiques en CT et HDL-C sont doublées. De plus, les profils de ces souris sont caractérisés par une accumulation de CE dans les lipoprotéines larges (LDL et VLDL), et une association de l'apoA-II et apoE avec les VLDL. Malgré les taux relativement faibles en VLDL et LDL (pro-athérogène) et élevés en HDL (anti-athérogène), ces souris développent des lésions d'athérome qui sont 18 fois supérieures en comparaison avec les souris contrôles après 6 mois d'un régime normolipidique (chow diet). Un résultat similaire a été observé après 11 semaines de régime hypercholestérolémiant (1.25% de cholestérol, 15% de gras) (Warden & Hedrick, 1993a).

Castellani *et al.* ont étudié le mécanisme par lequel l'apoA-II murin exerce son rôle pro-athérogènes. Dans un premier temps, ils ont étudié l'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL issues de souris transgéniques surexprimant l'apoA-II murine (apoA-II Tgm) et des souris transgéniques surexprimant l'apoA-I humaine (apoA-I Tgh), en comparaison, avec les HDL issues de souris contrôles (WT). Les résultats *in vitro* montrent une augmentation de l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL issues des souris apoA-I Tgh en comparaison avec les HDL de souris contrôles, alors qu'aucune différence d'efflux n'a été trouvée entre les HDL issues de souris apoA-II Tgm et de souris contrôles. Dans un deuxième temps, ils ont comparé les propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires de ces HDL. Contrairement aux HDL issues de souris apoA-I Tgh et de souris contrôles, les HDL de souris apoA-II Tgm sont incapables de protéger contre l'oxydation des LDL dans des expériences de co-culture avec des cellules de la paroi artérielle. Ce résultat est associé à une perte de l'activité de la paraoxanase (enzyme protectrice contre l'oxydation des LDL). L'oxydation des LDL induit la sécrétion de MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), une chimiokine qui stimule la migration et l'adhésion des monocytes sur la paroi artérielle. Dans des expériences de co-culture avec des cellules de la paroi artérielle, en présence des LDL, les HDL issues des souris apoA-II Tgm sont les seules à stimuler la migration des monocytes (Castellani et al., 1997a). Ainsi, la surexpression d'apoA-II murine chez la souris semble modifier les propriétés des HDL : passage d'un statut anti-oxydant/anti-inflammatoire vers un statut pro-oxydant/pro-

inflammatoire qui pourrait expliquer l'augmentation de la taille de la plaque d'athérome alors que l'apoA-II est surexprimée.

En conclusion, l'apoA-II semble jouer un rôle ambivalent dans le métabolisme des lipoprotéines et le développement de l'athérosclérose : alors que, une quantité suffisante d'apoA-II semble nécessaire pour maintenir un taux élevé de HDL-C, d'autre part, un excès d'apoA-II pourrait provoquer l'accumulation des lipoprotéines pro-athérogènes, une modification des propriétés des HDL (pro-athérogène) conduisant à une augmentation du développement de la plaque.

3.2.1.3-Apolipoprotéine E (apoE):

L'apolipoprotéine E (apoE) est principalement synthétisée par le foie et les macrophages. C'est un constituant majeur de nombreuses lipoprotéines plasmatiques comme les chylomicrons, VLDL et LDL. L'apoE est le principal ligand du récepteur aux LDL (LDLr) et est donc essentielle à la captation de ces lipoprotéines pro-athérogènes (S. H. Zhang, Reddick, Piedrahita, & Maeda, 1992a). Elle est également retrouvée dans certaines sous-classes de HDL comme les α -HDL, HDL₁ et HDL₂ (Mahley & Innerarity, 1984).

Deux équipes ont créé des souris déficientes en apoE (apoE^{-/-}), pour étudier le rôle de cette protéine dans le métabolisme du cholestérol et le développement de l'athérosclérose (Piedrahita, Zhang, Hagaman, Oliver, & Maeda, 1992a; Plump AS et al., 1992a). Chez les souris apoE^{-/-}, le contenu plasmatique en cholestérol total est 20 fois supérieur par comparaison aux souris contrôles. L'analyse en cholestérol des lipoprotéiques chez ces souris montre une diminution spectaculaire en HDL-C (-80%) corrélé à une forte augmentation en chylomicrons et VLDL-C, plus précisément en β VLDL-C, qui constituent une classe de VLDL enrichie en cholestérol ester très athérogène. Parallèlement, le taux de triglycérides est 68% supérieurs à celui des souris contrôles (Hayek, Oiknine, Brook, & Aviram, 1994; Piedrahita, Zhang, Hagaman, Oliver, & Maeda, 1992b; Plump AS et al., 1992b). Au niveau hépatique, les concentrations en cholestérol libre et triglycérides sont augmentées respectivement de 56% et 232%, alors que les concentrations en cholestérol estérifié et phospholipides restent inchangées. De plus, l'expression en ARNm et l'activité hépatique de l'HMG-CoA réductase sont fortement diminués chez les souris apoE^{-/-} (Amigo et al., 2000; Kuipers et al., 1996). Ces résultats montrent que l'inactivation de l'apoE crée un

profil pro-athérogène avec des lipoprotéines riches en cholestérol qui s'accumulent dans la circulation (LDL et VLDL) et un taux de HDL fortement diminué.

Ce profil favorise l'apparition de plaques d'athérome sur une période de temps relativement courte (10 semaines) sous un régime normolipidique (chow diet). Une analyse chronologique du développement de l'athérosclérose chez les souris apoE^{-/-} montre qu'à partir de l'âge de 10 semaines, la plupart des souris développent naturellement des lésions riches en lipides composées principalement de macrophages spumeux et de cellules musculaires lisses. Dès l'âge de 15 semaines, ces lésions deviennent hétérogènes, constituées d'un cœur nécrotique entouré de cellules musculaires lisses prolifératrices et d'une matrice extracellulaire composée de collagène et d'élastine. Cet effet est accentué en régime hypercholestérolémiant (Nakashima, Plump, Raines, Breslow, & Ross, 1994).

Zanotti *et al.* ont étudié l'impact de la suppression totale d'apoE *versus* la suppression d'apoE spécifiquement dans les macrophages sur le RCT des macrophages vers les fèces *in vivo*. Dans un premier temps, l'impact de l'absence totale de l'apoE sur le RCT a été étudié chez les souris apoE^{-/-} recevant des macrophages chargés en ³H-cholestérol issus des souris apoE^{-/-} (apoE^{-/-}→apoE^{-/-}). Ce groupe a été comparé au groupe de souris sauvages recevant des macrophages sauvages (WT→WT). Chez les souris apoE^{-/-}→apoE^{-/-}, il a été observé, une augmentation de la radioactivité (³H) dans le plasma, corrélée à une diminution de la radioactivité dans le foie (-40%) et les fèces (-43%) en comparaison aux souris WT→WT, démontrant qu'une extinction totale de l'apoE altère fortement le RCT. Dans un 2^{ème} temps, sur des souris WT injectées avec des macrophages chargés en ³H-cholestérol issus des souris apoE^{-/-} (apoE^{-/-}→WT), il a été mesuré une diminution significative de la quantité de radioactivité (³H) dans le plasma (-51%), le foie (-17%) et les fèces (-25%) par comparaison au groupe de souris contrôles (WT→WT) (Zanotti *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que l'apoE joue un rôle important dans RCT et le développement de l'athérosclérose et que la délétion d'apoE spécifiquement dans les macrophages est suffisante pour altérer le RCT.

Amigo *et al.* ont étudié les sécrétions de lipides biliaires chez les souris apoE^{-/-}. Sous un régime normolipidique (chow diet), les sécrétions de lipides biliaires ne sont pas affectées par l'absence d'apoE. Par contre, sous 4 semaines de régime hypercholestérolémiant (2% de cholestérol), les sécrétions biliaires se retrouvent diminuées de plus d'un facteur 2 pour le cholestérol et d'un facteur 1.5 pour les acides biliaires (Amigo *et al.*, 2000), suggérant une

fonction importante de l'apoE dans le transport du cholestérol d'origine alimentaire et son impact sur le métabolisme hépatique et l'élimination biliaire du cholestérol.

Plusieurs équipes ont aussi étudié l'effet de la surexpression de l'apoE humaine au niveau du foie, par infection d'une construction adénovirale exprimant l'apoE humaine. Ainsi, sur des souris apoE^{-/-}, la surexpression de l'apoE humaine ramène les concentrations de lipoprotéines plasmatiques à des niveaux similaires à ceux de souris sauvages, avec une disparition presque totale des LDL et VLDL et une réapparition des HDL. Ce phénotype métabolique est associé à une régression de la plaque d'athérosclérose (Kitajima et al., 2006)(Tsukamoto, Tangirala, Chun, Pure, & Rader, 1999).

La surexpression d'apoE humaine par adénovirus chez des souris sauvages, n'a elle aucun effet sur les taux plasmatiques en cholestérol total, libre et estérifié ni sur les taux plasmatiques en phospholipides et triglycérides (Annema et al., 2012). Cependant, l'analyse des profils lipoprotéiques montre une diminution de la fraction HDL-C et l'apparition de particules HDL plus larges en comparaison avec les souris contrôles. Au niveau hépatique, cette surexpression augmente la concentration en cholestérol total de 26% qui est probablement due à une augmentation de la concentration en CE (+150%). Pour vérifier si l'augmentation de CE hépatique est due à une augmentation de la captation sélective en CE, les auteurs ont injecté des particules HDL doublement marquées avec de la ¹²⁵I-Tyramine cellobiose sur la partie protéique et du ³H-cholesteryl éther sur la partie lipidique. Dans ces conditions, ils ont observé chez les animaux surexprimant l'apoE, une augmentation significative de la quantité du traceur ³H-cholesteryl éther dans le foie mais pas du traceur ¹²⁵I-Tyramine cellobiose, ce qui traduit une augmentation de la captation sélective de cholestérol (calculé par la différence entre ³H-cholesteryl éther et ¹²⁵I-Tyramine cellobiose). Cependant, cette surexpression n'a eu aucun effet sur les sécrétions en lipides biliaires. Chez ces animaux, l'expression d'ARNm des gènes hépatiques impliqués dans la synthèse, SREBP2, et le transport du cholestérol biliaire, ABCB11 et ABCG5/G8, est diminué. Le RCT des macrophages vers les fèces *in vivo* reste inchangé, avec un niveau de traceur ³H dans les fèces (fraction stérols neutres et acides biliaires) comparables aux souris contrôles (Annema et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la surexpression de l'apoE augmente la captation sélective de HDL-CE hépatique sans impacter le RCT.

L'ensemble de ces résultats montre un rôle important de l'apoE dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides et cholestérol. De plus, l'absence de cette protéine est

associée à un risque élevé de développement des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose.

Manipulation génétique	Effet sur HDL-C	Effet sur le RCT	Effet sur l'athérosclérose	Référence
Invalidation apoA-I	Diminution	Diminution	Augmentation (LDLr ^{-/-})	(Amigo et al., 2011)(R. E. Moore et al., 2005)
Surexpression apoA-I	Augmentation	Augmentation	Diminution (LDLr ^{-/-})	(YuZhen Zhang et al., 2003)(Kawashiri, Zhang, Puré, & Rader, 2002)(Stengel et al., 2000)(Valenta, Bulgrien, Banka, & Curtiss, 2006)
inactivation apoE	Diminution	Diminution	Augmentation	(Amigo et al., 2000)(Zanotti et al., 2011)(Nakashima et al., 1994)(S. H. Zhang, Reddick, Piedrahita, & Maeda, 1992b)
Surexpression apoE	Diminution	Pas d'effet	ND	(Annema et al., 2012)
Invalidation apoA-II	Diminution	ND	ND	(Weng & Breslow, 1996)
Surexpression apoA-II	Augmentation	Pas d'effet	Augmentation apoA-II Tg	(Castellani et al., 1997b)(Warden & Hedrick, 1993b)

Tableau.4 Relations entre le taux plasmatique des HDL-C, le RCT et le développement de l'athérosclérose en réponse à la manipulation génétique des lipoprotéines plasmatiques apoA-I, apoA-II et apoE.

3.2.2-Les enzymes plasmatiques impliquées dans le remodelage des HDL

3.2.2.1-La Lecithin:Cholestérol Acyltransferase (LCAT)

La Lecithin:Cholestérol Acyltransferase (LCAT) est une enzyme plasmatique associée principalement aux HDL et dont l'activité assure la conversion de cholestérol libre en

cholestérol estérifié. La LCAT joue ainsi un rôle important dans le RCT en favorisant l'efflux de cholestérol des tissus périphériques vers les HDL en maintenant un gradient de cholestérol entre les cellules périphériques et les HDL plasmatiques. Les individus déficients en LCAT présentent une hypoalphalipoprotéïnémie, qui se caractérise par une baisse importante de la concentration plasmatique en HDL-C, et une hypertriglycéridémie.

Pour mieux comprendre le rôle de cette enzyme dans le métabolisme des HDL, le RCT et le développement de l'athérosclérose, différentes équipes ont créé des souris déficientes en LCAT. En comparaison avec les souris contrôles, l'analyse des lipides plasmatiques chez les souris LCAT^{-/-} montrent une réduction importante dans les concentrations en cholestérol total, HDL-C et apoA-I, alors que les concentrations en triglycérides et préβ-HDL sont significativement augmentées. Cependant, les concentrations en non HDL-C et en apoB restent inchangées (Lambert et al., 2001; Sakai, Vaisman, & Koch, 1997)

Afin d'évaluer la contribution de la LCAT dans le RCT, des souris sauvages, hétérozygotes pour la LCAT (LCAT^{+/-}), et déficientes pour la LCAT (LCAT^{-/-}) ont été générées par Tanigawa et al. L'étude du RCT (³H-cholestérol-macrophage vers fèces) chez ces souris, après l'injection des macrophages marqué avec du ³H-cholestérol, montre une diminution significative du ³H-HDL-CE dans le plasma des souris LCAT^{-/-} (-73%) en comparaison avec les souris sauvages, avec une diminution moins marquée chez les souris hétérozygotes LCAT^{+/-}. Alors qu'aucune différence en ³H-stérols dans le foie et la bile n'a été observée entre les trois groupes, l'excrétion de ³H-stérols dans les fèces est réduite de 50% chez les souris LCAT^{-/-} par rapport aux souris sauvages et hétérozygotes, ces deux derniers modèles présentant des niveaux de sécrétions identiques (Tanigawa et al., 2009). Ainsi, l'estérification de cholestérol par la LCAT est une composante importante dans la voie du RCT. Toutefois, il existe un RCT résiduel des macrophages vers les fèces en absence de LCAT qui fait vraisemblablement intervenir la composante cholestérol libre (non estérifié) des HDL.

En outre, le rôle de la LCAT dans la modulation du développement de l'athérosclérose n'est pas clair. Malgré la diminution des taux plasmatiques en HDL, qui constitue un facteur pro-athérogène, le risque cardiovasculaire ne semble pas augmenté chez certains des patients déficients en LCAT (J. a Kuivenhoven et al., 1997). Plusieurs études ont été réalisées sur des modèles murins afin de déterminer le rôle pro- ou anti-athérogène de la LCAT. Notamment, le déficit en LCAT a été étudié sur 4 fonds génétiques : des animaux sauvages, LDLr^{-/-}, apoE^{-/-} et CETP transgéniques. Les souris LCAT^{-/-}, LDLr^{-/-} x LCAT^{-/-} et CETP Tg x LCAT^{-/-}

ont été mises sous un régime hypercholestérolémiant (1.25% de cholestérol, 15% de gras et 0.5% d'acide cholique) pendant 16 semaines, tandis que les souris apoE^{-/-} x LCAT^{-/-} ont été nourries avec un régime normolipidique. L'absence de la LCAT a entraîné une diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol total, CE, HDL-C, non HDL-C, apoA-I, apoA-II et apoB alors que les concentrations plasmatiques en triglycérides restent inchangées. Cependant, malgré les taux diminués en HDL-C, les différents modèles de souris invalidées pour la LCAT ont développé moins d'athérosclérose par rapport à leurs contrôles respectifs (Lambert et al., 2001). La déficience en LCAT semble donc ralentir le développement de l'athérosclérose induite par un régime hypercholestérolémiant chez la souris. Cette diminution de l'athérosclérose peut être expliquée par une augmentation des taux plasmatiques de pré-β HDL, favorisant le RCT, ainsi que la diminution d'apoB (apolipoprotéine pro-athérogène).

Cependant, dans une autre étude, Furbee et al. ont montré que la déficience en LCAT augmente l'athérosclérose chez les souris LDLr^{-/-} et apoE^{-/-} en utilisant un régime hypercholestérolémiant (0.1% de cholestérol et 10% de gras.) En effet, la déficience en LCAT chez ces souris augmente l'accumulation de cholestérol total, libre et estérifié dans l'aorte des souris LDLr^{-/-} x LCAT^{-/-} et apoE^{-/-} x LCAT^{-/-} par rapport à leurs contrôles respectifs (Furbee, Sawyer, & Parks, 2002). En conclusion, dans cette étude, la déficience en LCAT conduit à une augmentation de l'athérosclérose probablement due à une diminution dans les concentrations plasmatiques en HDL-C et une augmentation d'apoB.

Il existe une explication possible à la différence des résultats entre les deux études. La différence de régime utilisé entre les deux études conduirait à différentes réponses de lipides plasmatiques. En effet, Lambert et al. ont utilisé un régime hypercholestérolémiant (1.25% de cholestérol, 10% de gras et 0.5% d'acide cholique) pour les souris sauvages et LDLr^{-/-} et un régime normolipidique pour les souris apoE^{-/-}. La diminution dans les concentrations de HDL-C, est à l'origine de leur conclusion que la déficience en LCAT conduit à une diminution de l'athérosclérose. Dans l'étude de Furbee et al., les souris ont été mises sous un régime dépourvu de cholate avec une quantité faible en cholestérol 0.1% et modérée en graisse (10%). Sous ce régime les concentrations en cholestérol et lipoprotéines plasmatiques étaient similaires chez les souris LDLr^{-/-} et LDLr^{-/-} x LCAT^{-/-}, mais chez les souris apoE^{-/-} x LCAT^{-/-} on observe une augmentation des taux plasmatiques en cholestérol et apoB par rapport aux souris apoE^{-/-}. Ainsi, la différence entre les deux études peut être expliquée

par la différence de changement des paramètres plasmatiques en réponse aux différents régimes athérogènes avec une diminution d'apoB dans l'étude de Lambert et *al.* et son augmentation dans l'étude de Furbee et *al.*

D'autre part, l'effet de la surexpression de LCAT sur le métabolisme des lipoprotéines plasmatique a été étudié chez des souris transgéniques surexprimant la LCAT humaine. Cette surexpression induit une forte perturbation du métabolisme des lipides et des apolipoprotéines plasmatiques. L'effet le plus important est la diminution de plus de 50% des triglycérides plasmatiques. Les concentrations plasmatiques en cholestérol total et libre restent inchangées alors qu'on observe une augmentation en CE qui se traduit par une augmentation de la fraction HDL-CE, ainsi qu'une augmentation d'apoA-I plasmatique et une diminution des fractions LDL-CE et VLDL-CE (Mehlum et al., 1995). Ces résultats montrent que la surexpression de la LCAT humaine chez la souris conduit à l'apparition d'un profil lipoprotéique anti-athérogène avec une diminution des fractions LDL-C et VLDL-C et une augmentation du HDL-C.

Pour étudier un éventuel effet de la surexpression de LCAT sur le développement de l'athérosclérose, les souris transgéniques surexprimant la LCAT humaine (LCAT Tg) ont été mises sous un régime hypercholestérolémiant (5% de cholestérol, 2% de cholate) pendant 16 semaines. Comme sous un régime normolipidique, sous un régime hypercholestérolémiant les concentrations plasmatiques en cholestérol total et HDL-C sont significativement supérieures chez les souris LCAT Tg. Cependant, aucun effet de cette surexpression n'a été observé sur le développement des lésions d'athérosclérose (Mehlum, Gjernes, Solberg, Hagve, & Prydz, 2000).

Foger et *al.* ont montré que les souris LCAT Tg ont un défaut de captation de HDL-CE par le foie *via* SR-BI avec comme conséquence une augmentation des lésions d'athérosclérose après un régime hypercholestérolémiant (1.25% de cholestérol, 15% de gras et 0.5% de cholate). En effet, après l'injection par voie intraveineuse de ³H-HDL, on observe un défaut de captation hépatique de HDL-³H-CE, avec seulement 35% de la radioactivité initiale retrouvée dans le foie de ces souris LCAT Tg alors que les souris contrôles ont capté 65%; ce défaut de captation se traduit par une diminution de clairance plasmatique en HDL-CE par rapport aux souris contrôles. De plus, les lésions dans la crosse aortique sont trois fois supérieures chez les souris LCAT Tg en comparaison avec les souris contrôles (Föger et al., 1999). Le changement dans les propriétés de ces HDL, qui deviennent dysfonctionnelles avec

une perte de la capacité d'efflux du cholestérol et d'interaction avec les enzymes plasmatiques, entraîne un défaut dans leur captation hépatique avec comme conséquence, une altération du RCT et une augmentation de développement de l'athérosclérose.

L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression de la LCAT augmente les concentrations plasmatiques en HDL-C mais ne protège pas contre l'athérosclérose. Par ailleurs dans le modèle de Foger *et al.* cette surexpression conduit à un défaut de RCT avec comme conséquence une augmentation de l'athérosclérose.

3.2.2.2-Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP)

La CETP est une glycoprotéine hydrophobe qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme des HDL en transférant le cholestérol estérifié des HDL vers les lipoprotéines contenant de l'apoB, conduisant à une déplétion en cholestérol ester et un enrichissement du cœur des HDL en triglycérides. En transférant le cholestérol ester des HDL vers les lipoprotéines à l'apoB, la CETP diminue la concentration des particules anti-athérogènes (HDL) et augmente la concentration des particules pro-athérogènes (LDL) (Barter & Kastelein, 2006).

Ces dernières années, de nombreuses études *in vivo* ont été réalisées pour déterminer le rôle de la CETP dans le métabolisme des lipoprotéines et le développement de l'athérosclérose. L'introduction du gène humain de la CETP chez la souris (CETP Tg), naturellement dépourvue de la CETP, diminue la concentration plasmatique, principalement au niveau du HDL-C, et augmente les taux de triglycérides (El Bouhassani et al., 2011; Harada et al., 2007). Il a été démontré que l'expression de la CETP chez la souris augmente le catabolisme du cholestérol. En effet, après injection de ³H-cholestérol en intraveineuse à des souris CETP Tg, on observe une diminution de la concentration plasmatique en cholestérol ester radiomarqué (³H-CE) dans le plasma et une augmentation de sa captation par le foie (~47%) et le tissu adipeux (~42%) par rapport au souris sauvages. Cette augmentation s'accompagne d'une diminution d'expression d'ARNm de la HMG-CoA réductase et du LDLr. Cependant, aucun effet de l'expression de la CETP n'a été observé sur le flux et les sécrétions des lipides biliaires, ni sur l'excrétion de stérols et d'acides biliaires dans les fèces (Harada et al., 2007). Toutefois, d'autres études montrent que l'expression de la CETP chez la souris permet d'augmenter le RCT des macrophages vers les fèces. En effet, en comparaison aux souris sauvages il a été observé une augmentation du traceur radiomarqué, provenant des

macrophages marqué avec du ^3H -cholestérol, dans le plasma, le foie et les acides biliaires fécaux (Tanigawa et al., 2007; Tchoua et al., 2008). Le développement de l'athérosclérose chez les souris CETP Tg a été étudié après un régime hypercholestérolémiant (1.25% de cholestérol) pendant 20 semaines. Ce régime entraîne une augmentation modérée des taux plasmatiques en cholestérol total par rapport à un régime normolipidique avec notamment une augmentation du cholestérol dans les VLDL. Sur ce modèle, il a été observé une augmentation de la taille des lésions de 1,7 fois par rapport aux souris sauvages (El Bouhassani et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats montre que l'introduction de la CETP chez la souris induit des modifications au niveau de catabolisme des HDL-C et crée un profil lipidique athérogène caractérisé par une diminution de la concentration en HDL-C et une augmentation des triglycérides qui se traduit par une augmentation de l'athérosclérose chez ces souris.

L'expression de la CETP a été également étudiée chez les souris SR-BI^{-/-} (adénovirus et souris transgéniques). Sur ce modèle, il a été observé une diminution d'environ 50% de la concentration plasmatique en HDL-C par rapport aux souris SR-BI^{-/-} (Tanigawa et al., 2007) (El Bouhassani et al., 2011). L'impact de l'expression de la CETP sur le RCT a été étudié sur des souris SR-BI^{-/-}. En effet, Tanigawa et al. ont montré que la surexpression de la CETP par adénovirus stimule le RCT en observant une augmentation d'environ 50% de l'excrétion fécale en ^3H -stérol en comparaison avec les souris contrôles SR-BI^{-/-} (Tanigawa et al., 2007). Inversement, El Bouhassani et al. n'ont trouvé aucune différence du niveau de traceur radiomarqué, dans le foie et les fèces, entre les souris SR-BI^{-/-} x CETP Tg et les souris SR-BI^{-/-} (El Bouhassani et al., 2011). Cette différence pourrait être due à des différences techniques entre les deux études: surexpression de la CETP par adénovirus et utilisation d'une lignée de macrophages (Tanigawa et al., 2007) *versus* souris transgéniques surexprimant la CETP humaine et utilisation de macrophages issus de la moelle osseuse (El Bouhassani et al., 2011). De façon intéressante, l'expression de la CETP chez des souris n'exprimant plus SR-BI atténue l'effet délétère de la perte d'expression de SR-BI sur l'athérosclérose (El Bouhassani et al., 2011), suggérant que sous certaines conditions la CETP peut avoir un rôle athéroprotecteur.

Contrairement à la souris, le lapin, comme l'homme, possède une forte activité CETP et constitue un modèle pour l'étude des effets d'une inhibition de cette enzyme. Une inhibition de la CETP par l'utilisation d'oligodéoxynucléotides anti-sens ou d'un vaccin induit une

augmentation des taux de HDL-C (+40%) et une diminution des taux de LDL-C (-20%) et de la formation de la plaque d'athérome (-40%) chez des lapins placés sous régime hypercholestérolémiant (Sugano et al., 1998) (Rittershaus et al., 2000). Les effets de ces inhibiteurs chez l'homme seront développés dans le chapitre II.

3.2.2.3-La Phospholipid transfer protein (PLTP)

La PLTP est une glycoprotéine ubiquitaire principalement exprimée dans le thymus, les poumons, le foie, l'intestin et les macrophages (X.-C. Jiang, Jin, & Hussain, 2012). Elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines en transférant les phospholipides des VLDL et LDL vers les HDL plasmatiques. Ainsi, elle permet la génération des particules de HDL plus larges et des pré β -HDL (Albers & Cheung, 2004).

L'importance de la PLTP dans le métabolisme de cholestérol a été démontrée *in vivo* chez les souris invalidées pour la PLTP (PLTP^{-/-}). En effet, on observe chez ces souris une diminution des concentrations plasmatiques en phospholipides CE et CL associées aux HDL, respectivement de 63% et 64% en comparaison avec les souris contrôles. Les concentrations plasmatiques en apoA-I, pré β -HDL et pré α -HDL sont également significativement diminuées. Cette diminution de HDL plasmatiques peut s'expliquer par un hyper-catabolisme des particules HDL (X. C. Jiang et al., 1999)(Qin et al., 2000). 4h après injection par voie intraveineuse de HDL doublement marquées avec ¹²⁵I et ³H-cholestérol, on observe une diminution significative des deux traceurs dans le plasma des souris PLTP^{-/-} en comparaison avec les souris sauvages (Qin et al., 2000). Ces résultats montrent un rôle important de la PLTP dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques en particulier au niveau du catabolisme des HDL. Cao et al. ont mesuré l'efflux de cholestérol *in vitro* des macrophages isolés des souris PLTP^{-/-}; leurs résultats montrent que l'absence de la PLTP n'a pas d'effet sur l'efflux de cholestérol des macrophages vers l'apoA-I (Cao et al., 2002).

Le rôle de la PLTP dans le développement de l'athérosclérose a été étudié en croisant des souris PLTP^{-/-} avec des souris apoE^{-/-} (apoE^{-/-} x PLTP^{-/-}) ou LDLr^{-/-} (LDLr^{-/-} x PLTP^{-/-}). Trois mois après un régime normolipidique, les souris apoE^{-/-} x PLTP^{-/-} présentent une diminution des lésions d'athérome de 5 fois en comparaison avec les souris apoE^{-/-}, cette diminution n'était que de deux fois chez les souris LDLr^{-/-} x PLTP^{-/-} en comparaison avec les souris LDLr^{-/-} après 8 semaines d'un régime hypercholestérolémiant (X. C. Jiang et al., 2001). Ce résultat est

associé à une diminution de la sécrétion en apoB, ce qui suggère que l'absence de la PLTP peut protéger contre le développement de l'athérosclérose.

D'autre part, la surexpression du gène humain de la PLTP chez la souris (PLTP Tg) et par adénovirus, entraîne une diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol total, phospholipides et apoA-I respectivement de 62%, 72% et 69%. L'analyse des lipoprotéines plasmatiques montre une diminution de la fraction HDL-C (-40%). Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans les fractions LDL et VLDL entre les souris PLTP Tg et les souris contrôles. De plus, on observe chez ces souris une génération plus importante des pré β -HDL en comparaison avec les souris sauvages (R. van Haperen et al., 2000). L'ensemble de ces résultats montre un rôle important de la PLTP dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques, sa surexpression induit un profil anti-athérogène qui se caractérise par l'augmentation des pré β -HDL plasmatiques. Van Haperen et al. ont montré par deux méthodes différentes, croisement des souris PLTP Tg avec LDLr^{-/-} et par transfert de moelle osseuse PLTP Tg \rightarrow LDLr^{-/-}, que la surexpression de la PLTP entraîne une augmentation des lésions d'athérome (+300%) en comparaison avec les souris contrôles après 9 semaines de régime hypercholestérolémiant. Ce résultat est probablement dû à une diminution des concentrations plasmatiques en HDL-C et une augmentation des concentrations plasmatiques en non HDL-C et en triglycérides (Rien van Haperen et al., 2008). En conclusion, ces résultats montrent que la surexpression de la PLTP contribue au développement de l'athérosclérose, malgré l'augmentation des pré β -HDL, et que son inhibition peut être un choix dans le traitement de cette pathologie. L'ensemble de ces résultats amène à penser qu'une dérégulation de cette enzyme dans un sens ou dans l'autre est dangereuse, et suggère une certaine prudence à tenir vis à vis de la PLTP. Des études plus approfondies apparaissent nécessaires avant de développer des médicaments ciblant cette enzyme.

3.2.2.4-Les Lipases

Les lipases hépatiques (LH) et endothéliales (LE) sont des membres de la famille des lipases extracellulaires. Ces lipases se trouvent à la surface de l'endothélium et hydrolysent les triglycérides et les phospholipides des lipoprotéines circulantes. La LE hydrolyse principalement les phospholipides, alors que la LH a une activité intermédiaire et hydrolyse des triglycérides et des phospholipides. Indépendamment de leur activité lipolytique, ces

lipases sont capables de rapprocher les lipoprotéines de leur récepteur à la surface cellulaire.

3.2.2.4.1-La Lipase Hépatique (LH)

Dans le métabolisme des HDL, la LH permet la lipolyse des HDL₂ enrichies en triglycérides par la CETP et en phospholipides par la PLTP. Sous l'action de la LH, les HDL₂ sont remodelées en particules appauvries en triglycérides (-60%) appelées remnants de HDL₂ qui sont préférentiellement captés par les hépatocytes humains (HepG₂). Ce remodelage est associé à la libération de pré β -HDL, accepteurs préférentiels pour l'efflux de cholestérol (Karim Guendouzi, Collet, & Perret, 1998)

Le rôle de la LH a été étudié sur des souris déficientes pour la LH (LH^{-/-}). L'analyse des lipoprotéines plasmatiques de ces souris montre une augmentation en cholestérol total de 30% ainsi qu'une augmentation du HDL-C et des phospholipides mais pas des triglycérides. De plus, l'analyse des sous classes des HDL montre une augmentation des taux de HDL larges qui migrent en position α (Homanics et al., 1995). Ce résultat montre que la LH joue un rôle important dans la conversion des grandes en petites HDL, suggérant que chez les souris LH^{-/-}, la capacité des HDL dans l'efflux du cholestérol cellulaire et le RCT pourraient être modifiée. Cette hypothèse a été étudiée par Brown et al., qui ont observé, après injection de macrophages radiomarqué avec ³H-cholestérol, que la quantité de traceur ³H augmente dans le plasma mais pas dans les fèces, par rapport aux souris contrôles (Brown et al., 2010). D'autre part, alors que l'extinction de la LH n'a aucun effet sur les concentrations hépatiques en cholestérol total, estérifié et en phospholipides, il a été observé une baisse des concentrations hépatiques en triglycérides. La déficience de la LH n'a aucun effet sur le flux et les sécrétions des lipides biliaires, ni sur l'expression des gènes hépatiques qui contrôlent la synthèse des acides biliaires comme la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) et la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1). Après un régime hypercholestérolémiant (2% de cholestérol), aucune différence majeure n'a été observée entre les souris contrôles et les souris LH^{-/-} (Amigo et al., 2003). L'ensemble de ces résultats suggère que la LH module le métabolisme des HDL mais que son activité n'a que peu d'influence sur le RCT.

Inversement, des souris transgénique surexprimant la LH humaine (LH Tg) ont été générées. Chez ces souris, sous un régime normolipidique, les concentrations plasmatiques en cholestérol total et triglycérides sont diminuées respectivement d'environ 80% et 35%,

avec une baisse à la fois en HDL-C et LDL-C. Ce phénotype est associé à une baisse de 75% des concentrations en apoA-I et apoE circulante et une augmentation d'environ 15% de la clairance plasmatique des 125 I-HDL (Braschi et al., 1998), suggérant que l'activité de la LH pourrait avoir un impact positif sur le RCT.

Le rôle de la LH dans le développement de l'athérosclérose a été étudié sur des souris $LH^{-/-}$ x $LDLR^{-/-}$. Sur ce modèle, l'absence de la LH entraîne l'apparition d'un profil lipidique pro-athérogène avec une augmentation des concentrations plasmatiques en TC, TG et PL, VLDL-C et LDL-C avec pour conséquence une accélération de la formation des lésions dans les aortes (Barcat et al., 2006).

3.2.2.4.2-La Lipase Endothélial (LE)

L'extinction de la LE chez la souris ($LE^{-/-}$) entraîne, comme chez les souris $LH^{-/-}$, une augmentation de cholestérol total, HDL-C et des phospholipides. Ces souris présentent également une augmentation des concentrations plasmatiques en apoB, apoE et apoA-I plasmatiques. L'augmentation des concentrations plasmatiques en cholestérol chez les souris $LE^{-/-}$ est corrélée à une diminution du catabolisme des HDL, avec principalement une diminution de la captation sélective en cholestérol estérifié des HDL, à la différence des souris $LH^{-/-}$. Concernant le RCT des macrophages vers les fèces, après injection de macrophages radiomarqués avec du 3 H-cholestérol, la quantité de traceur dans le plasma des souris $LE^{-/-}$ est supérieure à celle retrouvée chez les souris $LH^{-/-}$ et les souris sauvages, mais l'excrétion fécale en 3 H-stérol reste cependant identique chez les 3 modèles de souris ($LE^{-/-}$, $LH^{-/-}$ et sauvages) (Brown et al., 2010). Ces résultats montrent clairement un rôle important de la LE dans le catabolisme des HDL, en particulier la captation sélective des ester de cholestérol, mais comme pour la LH, l'impact de son activité sur le RCT n'est pas clair.

L'effet de la LE sur le développement de l'athérosclérose reste à définir, car bien que de nombreuses études aient été réalisées, la multiplicité des modèles et les différents résultats obtenues ne permettent pas d'aboutir à une conclusion claire. Ishida et al. ont montré que, sous régime normolipidique, la suppression de la LE chez des souris $apoE^{-/-}$ diminue de 70% le développement des lésions ; cet effet est encore plus important sous un régime hypercholestérolémiant (0.15% de cholestérol, 21% de gras). On remarque chez ces souris une augmentation des concentrations plasmatiques à la fois en HDL-C et en LDL-C. Pour expliquer leur résultats, les auteurs ont proposé la réduction d'adhésion des monocytes à la

surface vasculaire comme mécanisme par lequel les souris apoE^{-/-} x LE^{-/-} sont mieux protégées de l'athérosclérose. En effet, les auteurs ont observé une diminution significative d'adhésion des monocytes sur des biopsies issues d'aortes de souris apoE^{-/-} x LE^{-/-} par rapport à des biopsies d'aortes de souris apoE^{-/-} (Ishida et al., 2004). Inversement, une autre étude réalisée sur des souris apoE^{-/-} et LDLr^{-/-} montre que la suppression de la LE n'a aucun effet sur le développement de la plaque d'athérosclérose (Ko, Paul, Ma, Li, & Chan, 2005). Cette différence entre ces deux études s'explique difficilement car les deux études montrent des effets similaires sur le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Néanmoins, cette différence pourrait s'expliquer par l'âge différent des souris au moment de l'analyse des plaques 12 (Ishida et al., 2004) *versus* 26 semaines (Ko et al., 2005).

L'effet de la surexpression de la LE humaine a été également étudié chez la souris. Sa surexpression par adénovirus entraîne une diminution importante des concentrations plasmatiques en cholestérol total, se traduisant par une absence totale de HDL-C, ainsi que d'une diminution des taux plasmatiques en triglycérides (Wiersma, Gatti, Nijstad, Kuipers, & Tietge, 2009a). Parallèlement, la concentration hépatique en cholestérol total est augmentée de 61%, avec une concentration en cholestérol libre qui est doublée alors que la concentration en cholestérol estérifié n'est que faiblement augmentée. Cette augmentation du contenu hépatique en cholestérol est accompagnée d'une diminution de l'expression des gènes hépatiques impliqués dans l'homéostasie du cholestérol comme l'HMG-CoA réductase, le LDLr et SREBP2. Cependant, le flux et les sécrétions des lipides biliaires ainsi que l'excrétion fécale en acides biliaires et stérols neutres restent inchangés chez les souris surexprimant la LE par rapport aux souris sauvages (Wiersma, Gatti, Nijstad, Kuipers, et al., 2009a). Ces résultats montrent un rôle important de la LE dans le remodelage plasmatique des HDL et la captation hépatique du cholestérol. Cependant, il semblerait que la surexpression de la LE n'impacte pas l'excrétion de cholestérol, possiblement du fait de la réduction de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse endogène du cholestérol (SREBP et HMG-CoA réductase), ce qui compenserait l'accumulation du cholestérol hépatique.

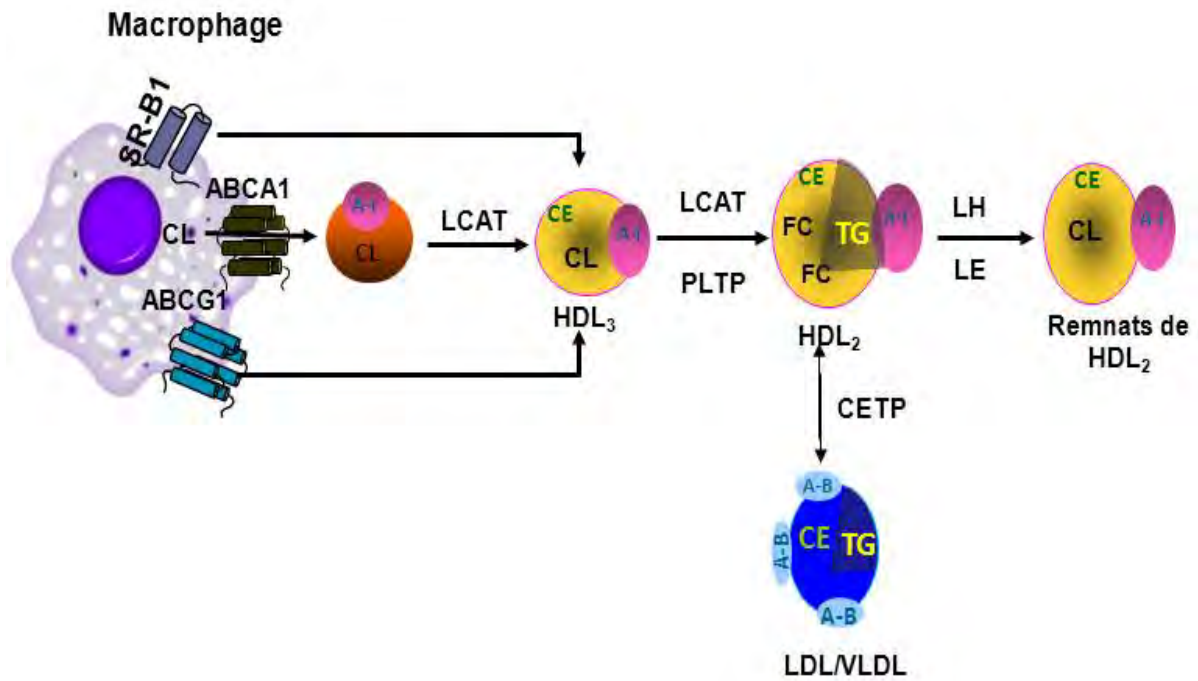


Figure 8. Remodelage plasmatique des HDL. Les pré β -HDL acquièrent du cholestérol libre à partir des tissus périphériques pour devenir des HDL₃ puis des HDL₂ après leur estérification par la LCAT. Sous l'action de la CETP et de la PLTP, les HDL₂ vont s'enrichir en triglycérides et phospholipides qui vont être ensuite hydrolysés par la HL et LE pour donner des HDL résiduelles.

Manipulation génétique	Effet sur HDL-C	Effet sur le RCT	Effet sur l'athérosclérose	référence
Invalidation de LCAT	Diminution	Diminution	Diminution (LDLr ^{-/-} , apoE ^{-/-} , CETP ^{-/-} , LCAT ^{-/-}) Augmentation (LDLr ^{-/-} , apoE ^{-/-})	(Lambert et al., 2001)(Tanigawa et al., 2009)(Sakai et al., 1997)(Mehlum et al., 1995)
Surexpression de LCAT	Augmentation	ND	Augmentation (LCAT Tg) Pas d'effet (LCAT Tg)	(Mehlum et al., 2000)(Föger et al., 1999)
Surexpression de CETP	Diminution	Augmentation	Augmentation (CETP Tg)	(Harada et al., 2007)(El Bouhassani et al., 2011)(Tanigawa et al., 2007)(Tchoua et al., 2008)
Invalidation de LH	Augmentation	Pas d'effet	Augmentation (LDLr ^{-/-})	(Homanics et al., 1995)(Brown et al., 2010)
Surexpression de LH	Diminution	ND	Diminution (LDLr ^{-/-})	(Barcat et al., 2006)(Annema & Tietge, 2011)(Dichek, Qian, & Agrawal, 2004)
Invalidation de LE	Augmentation	Pas d'effet	Diminution (apoE ^{-/-}) Pas d'effet (LDLr ^{-/-} , apoE ^{-/-})	(Brown et al., 2010)(Ko et al., 2005)(Ishida et al., 2004)
Surexpression de LE	Diminution	Pas d'effet	ND	(Wiersma, Gatti, Nijstad, Kuipers, & Tietge, 2009b)
Invalidation de PLTP	Diminution	ND	Diminution (LDLr ^{-/-} , apoE ^{-/-})	(X. C. Jiang et al., 1999)(X. C. Jiang et al., 2001)(Qin et al., 2000)(Cao et al., 2002)
Surexpression de PLTP	Diminution	ND	Augmentation (LDLr ^{-/-})	(Föger et al., 1999)(R. van Haperen et al., 2000)(Rien van Haperen et al., 2008)

Tableau.5 Relations entre les taux plasmatiques en HDL-C, le RCT et le développement de l'athérosclérose en réponse à la manipulation génétique des enzymes plasmatiques LCAT, CETP, LH, LE et PLTP.

3.3-Captation hépatique des HDL (Tableau 6 et Figure 10)

3.3.1-Le Scavenger Receptor class B- type I (SR-BI) et la captation sélective du cholestérol ester des HDL

En 1997, Rigotti *et al.* ont mis en évidence que le scavenger récepteur de classe BI (SR-BI) était un récepteur aux HDL (Rigotti et al., 1997). SR-BI assure la captation sélective du cholestérol estérifié contenu dans les lipoprotéines, et en particulier dans les HDL. Ce mécanisme de captation sélective implique, le transfert des esters de cholestérol du cœur hydrophobe de la lipoprotéine aux cellules sans l'internalisation ni dégradation de la lipoprotéine entière (Valacchi et al., 2011).

Plusieurs équipes ont montré que les souris déficientes pour SR-BI (SR-BI^{-/-}) présentent une augmentation de 50 à 70% du cholestérol total plasmatique, due principalement à une augmentation des taux de HDL d'environ 50%. Les HDL sont également beaucoup plus larges que les HDL des souris sauvages, mais cela ne s'accompagne pas d'une augmentation plasmatique de la concentration en apoA-I (Rigotti et al., 1997)(Varban et al., 1998). Varban *et al.* ont montré, après l'injection par voie intraveineuse des HDL doublement marquées avec de ¹²⁵I et du ³H-CE, que l'inactivation de SR-BI chez la souris est associé à une diminution de la captation sélective de CE par le foie (-47%) et une réduction de l'élimination sélective de HDL-CE à partir de plasma (-53%) (Varban et al., 1998). Ces résultats montrent un rôle central de SR-BI hépatique dans la régulation de la concentration des HDL plasmatiques et que SR-BI est le principal récepteur qui assure la captation sélective de CE par le foie.

Huby *et al.* ont développé un modèle de souris déficiente pour SR-BI principalement au niveau hépatique en utilisant le système CreAlb/lox. De façon inattendue, dans leur modèle, le ciblage du gène SR-BI entre deux sites lox P entraîne une réduction de l'expression de SR-BI dans tous les tissus (souris hypom SR-BI). Le croisement de ces souris avec des souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine (spécifique du foie), entraîne une inactivation spécifique du gène SR-BI dans le foie (hypom SR-BI KO^{Liver}). Cette réduction d'expression de SR-BI chez les souris (hypom SR-BI) ou son inactivation au niveau hépatique (souris hypom SR-BI KO^{Liver}) entraîne dans les deux cas, une

augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol par rapport au souris sauvage, atteignant un taux équivalent à celui mesuré chez les souris SR-BI^{-/-}. Cette augmentation du cholestérol plasmatique reflète essentiellement une augmentation du HDL-C, avec des particules HDL plus larges et plus riches en apoE par rapport aux souris sauvages. Par contre, aucune différence n'a été observée dans les concentrations hépatiques en cholestérol estérifié et libre entre les souris sauvages et les souris SR-BI^{-/-}, hypom SR-BI et hypom SR-BI KO^{Liver} (Huby et al., 2006).

Dans les conditions physiologiques, SR-BI pourrait faciliter la sécrétion de cholestérol biliaire soit indirectement, en favorisant la captation hépatique des HDL soit en participant directement à la sécrétion biliaire de cholestérol depuis les membranes canaliculaires, soit les deux. Mardones *et al.* ont montré que les sécrétions biliaires en cholestérol étaient diminuées chez les souris SR-BI^{-/-} sans modification du flux biliaires et des sécrétions biliaires en acides biliaires et phospholipides, ni de l'excrétion d'acides biliaires dans les fèces par rapport souris sauvages (Mardones et al., 2001a). Dans ce sens, Ji *et al.* après l'injection du ³H-cholestérol en intraveineuse, ont montré que les sécrétions biliaires en traceur ³H sont diminuées chez les souris SR-BI KO hépatique (Ji et al., 1999).

La diminution de la sécrétion en cholestérol biliaire observée chez les souris SR-BI^{-/-} peut se traduire par une diminution de RCT. Zhang *et al.* ont étudié l'impact de l'inactivation de SR-BI sur le RCT : après l'injection de macrophages radiomarqués avec du ³H-cholestérol, les taux plasmatiques en traceur ³H sont supérieurs chez les souris SR-BI^{-/-} par rapport aux souris sauvages ce qui est corrélé avec une diminution de traceur ³H dans le foie et dans les fèces (YuZhen Zhang et al., 2005). Ainsi, l'absence de SR-BI réduit significativement l'excrétion fécale de cholestérol dérivé des macrophages, ce qui reflète un ralentissement de RCT.

Pour étudier un éventuel rôle du récepteur SR-BI dans le développement de l'athérosclérose, les différents modèles de souris créés par Huby *et al.* (SR-BI^{-/-}, hypom SR-BI et hypom SRBI KO^{Liver}) ont été mis sous régime hypercholestérolémiant riche en acide cholique pendant 11 semaines. Ce régime entraîne une augmentation de la taille des lésions d'athérosclérose chez les souris hypom SR-BI KO^{Liver} et SR-BI^{-/-} par rapport aux souris sauvages. L'augmentation de la taille des lésions chez les souris hypom SRBI KO^{Liver} confirme le rôle athéroprotecteur de SR-BI au niveau hépatique. Cependant, l'analyse des lésions chez les souris SR-BI^{-/-} a révélé une susceptibilité accrue au développement de l'athérosclérose par rapport aux souris hypom SR-BI-KO^{Liver} *via* notamment une augmentation de

l'inflammation dans les lésions vasculaires chez les souris SR-BI^{-/-} par rapport aux souris hypom SR-BI-KO^{Liver} (Huby et al., 2006). Ce dernier résultat met donc en évidence un rôle extra-hépatique de SR-BI, lui aussi athéroprotecteur.

D'autre part, la surexpression hépatique de SR-BI, soit par transgénèse soit par infection adénovirale entraîne une diminution de 90% des taux plasmatiques en cholestérol total et phospholipides. L'analyse des lipoprotéines plasmatiques montre une disparition des fractions HDL et LDL. Cette diminution s'accompagne d'une diminution de la concentration plasmatique d'apoA-I (-70 %) et d'apoB (-40%) (Out et al., 2005);(Ueda et al., 1999) et d'une augmentation de la clairance plasmatique en HDL et non-HDL (Ueda et al., 1999). Parallèlement, le contenu hépatique en cholestérol ainsi que le flux et les sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides sont augmentées alors que les sécrétions en acides biliaires restent inchangées par rapport aux souris sauvages (Wiersma, Gatti, Nijstad, Oude Elferink, et al., 2009). L'ensemble de ces résultats montre un rôle majeur de SR-BI chez la souris dans le métabolisme des lipoprotéines HDL et non-HDL, en contribuant à leur captation hépatique et à l'élimination biliaire du cholestérol.

L'effet de la surexpression de SR-BI sur le développement de l'athérosclérose a été étudié chez les souris LDLr^{-/-}, par l'injection d'un adénovirus permettant la surexpression de SR-BI au niveau hépatique, après un régime hypercholestérolémiant. Cette surexpression entraîne une diminution du développement des lésions par rapport aux souris sauvages après 6 et 16 semaines de régime (Kozarsky, Donahee, Glick, Krieger, & Rader, 2000). L'ensemble de ces résultats montre que l'expression hépatique de SR-BI protège contre le développement de l'athérosclérose, possiblement *via* son rôle dans la captation hépatique des lipoprotéines HDL et non-HDL.

3.3.2-La voie F₁-ATPase/P2Y₁₃ d'endocytose des holoparticules HDL (Figure 9)

La théorie d'existence d'une voie unique impliquée dans la captation sélective du cholestérol estérifié transporté par les HDL présente certaines limites. Wustner *et al.*, ont suggéré l'existence d'autres voies impliquées dans l'endocytose des HDL, notamment de fait

de la présence de protéines provenant des HDL dans des différents compartiments intracellulaires des hépatocytes, tels que les endosomes de tri (Wüstner, 2006).

Dans ce contexte, notre laboratoire a précédemment montré sur des hépatocytes humaines l'existence d'une voie d'endocytose de la particule HDL entière, appelée également holoparticule HDL (lipides + protéines) dépendant de la formation des vésicules mantelées de clathrine (Garcia et al., 1996). Ce mécanisme implique la collaboration entre deux types de récepteurs : le premier de haute affinité (10^{-9} M) pour l'apoA-I libre ou associée aux HDL et le second de basse affinité mais de grande capacité pour les HDL entières (10^{-7} M), responsable de l'endocytose de l'holoparticule HDL (Barbaras et al. 1994)(L O Martinez et al., 2000)(K Guendouzi, Collet, Perret, Chap, & Barbaras, 1998).

3.3.2.1-Le site de liaison de haute affinité pour l'apoA-I : l'ecto-F₁-ATPase

La liaison spécifique de l'apoA-I sur des sites de liaison haute affinité a permis d'identifier à partir des membranes plasmiques de foie de porc par résonance plasmonique de surface (Biacore) et chromatographie d'affinité la chaîne β de l'ATP synthase comme récepteur (Laurent O Martinez et al., 2003). Contrairement au complexe mitochondrial, cette ATP synthase présente à la surface des hépatocytes humains n'a pas d'activité de synthèse d'ATP mais possède uniquement une activité ATP hydrolase, d'où son nom d'ecto-F₁-ATPase. L'activité ATP hydrolase (ATPasique) est stimulée par la liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F₁-ATPase et est essentielle à la régulation de l'endocytose des HDL. L'ADP, le composé d'hydrolyse de l'enzyme, produit sous l'action de la liaison de l'apoA-I, est capable à lui seul de stimuler la captation hépatique de l'holoparticule HDL (Holo-HDL). De plus, une protéine mitochondriale de 10kDa, l'Inhibitor Factor 1 (IF1), inhibitrice de l'activité hydrolase de l'enzyme (**Figure 9**), est capable d'inhiber cette voie de captation des holo-HDL sur des hépatocytes humains en culture. Notre équipe a également montré, *in situ* sur des foies perfusés de rat, que l'IF1 est capable d'inhiber la captation hépatique des HDL radiomarquées (-50%). Ces résultats montrent une relevance physiologique de cette nouvelle voie d'endocytose des HDL (Laurent O Martinez et al., 2003). Récemment Giorgio *et al*, ont montré que l'ecto-F₁-ATPase et IF1 sont présentent à la surface de la membrane plasmique des foies de rats. Dans ce travail, les auteurs ont montré que la diminution

d'activité de l'ecto- F_1 -ATPase, dans le cas d'une cholestase hépatique, n'est pas due à une diminution de son expression à la surface mais à une augmentation de taux et d'activité d'IF1 (Giorgio et al., 2010). De plus, notre équipe a montré la présence de l'IF1 circulante dans le sérum humain et qu'elle est positivement corrélée avec les taux de HDL-C (Genoux et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que l'IF1 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'endocytose des HDL-C. Ainsi, la régulation de son expression en surface pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour stimuler le RCT et amplifier l'effet protecteur des HDL dans le développement de l'athérosclérose.

3.3.2.2-Le récepteur à l'ADP : P2Y₁₃

La stimulation de l'endocytose hépatique des HDL par un nucléotide extracellulaire, l'ADP, a suggéré l'intervention d'un récepteur purinergique ayant pour agoniste l'ADP (**Figure 9**). Notre laboratoire a montré la présence d'ARNm des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₃ dans des hépatocytes humains et murins et l'absence de messagers du récepteur P2Y₁₂. En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et par interférence d'ARN, l'équipe a démontré que le récepteur P2Y₁₃ est le partenaire de la F_1 -ATPase dans cette cascade de régulation d'endocytose de l'holoparticule d'HDL. De plus, notre laboratoire a démontré que l'AR-C69931MX (cangrelor), un antagoniste du récepteur P2Y₁₂ et un agoniste partiel du récepteur P2Y₁₃, est capable de stimuler l'endocytose des HDL par des hépatocytes en culture et sur des foies de souris perfusés avec des HDL (Jacquet et al., 2005). L'implication physiologique du récepteur a ensuite été confirmée chez des souris invalidées pour le récepteur P2Y₁₃ (cf. 3.3.2.4 et 1^{ère} partie expérimentale du chapitre III, article 1). De plus, l'identification du cangrelor comme un agoniste partiel du P2Y₁₃, a fait de cette molécule un composé de choix dans l'étude de l'impact du récepteur P2Y₁₃ dans le métabolisme des HDL et dans le transport retour du cholestérol qui correspond à la première et deuxième partie de mes travaux expérimentaux (cf. deuxième partie expérimentale du chapitre III).

3.3.2.3-Le récepteur P2Y₁₃ :

Le récepteur P2Y₁₃ appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs présentent tous une structure similaire avec sept segments transmembranaires organisés en hélice reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles

intracellulaires, une extrémité amino-terminale externe et une extrémité carboxy-terminale cytoplasmique. La queue intra-cytoplasmique est impliquée notamment dans la régulation de l'expression, de la localisation et de l'internalisation du récepteur. Le récepteur P2Y₁₃ appartient à la famille 1 qui comprend la majorité des RCPG et notamment la rhodopsine.

Chez l'homme et la souris, le récepteur P2Y₁₃ est exprimé dans divers tissus, dont la rate, le foie et le cerveau (Marteau et al., 2003) et semble être le seul récepteur P2Y exprimé dans les globules rouges et les réticulocytes humains (M. Wang et al., 2005). Le récepteur P2Y₁₃ joue un rôle dans la dégranulation des mastocytes (Gao, Ding, & Jacobson, 2010). De plus, il a été impliqué dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline (Amisten et al., 2010) et des travaux récents montrent qu'il participerait à la régulation du métabolisme de l'os (Orriss et al., 2011) et de la différenciation neuronale (Yano, Tsukimoto, Harada, & Kojima, 2012).

3.3.2.4-Cascade de signalisation en aval de P2Y₁₃

L'équipe du Pr. Boeynaems a été la première à identifier le récepteur P2Y₁₃ comme étant un RCPG. P2Y₁₃ est très proche de P2Y₁₂ et possède des propriétés fonctionnelles similaires telles que le couplage à Gi et la réactivité à l'ADP (Communi et al., 2001) mais ces fonctions ainsi que les mécanismes de signalisation en aval ne sont pas encore bien déterminés. Notre équipe a démontré sur des hépatocytes humains l'implication de la petite GTPase RhoA et de son effecteur ROCK1 dans la signalisation en aval du récepteur P2Y₁₃. En effet, ces deux protéines sont activées en aval de la stimulation du récepteur P2Y₁₃ par l'ADP ou le cangrelor mais également en aval de la stimulation de l'ecto-F₁-ATPase par l'apoA-I. (Malaval et al., 2009).

Ainsi les différents travaux de l'équipe ont mis en évidence sur des hépatocytes humains l'existence d'une nouvelle voie d'endocytose hépatique de l'holoparticule HDL (protéines+lipides) impliquant un couplage l'ecto-F₁-ATPase et le récepteur purinergique P2Y₁₃ (**Figure 9**).

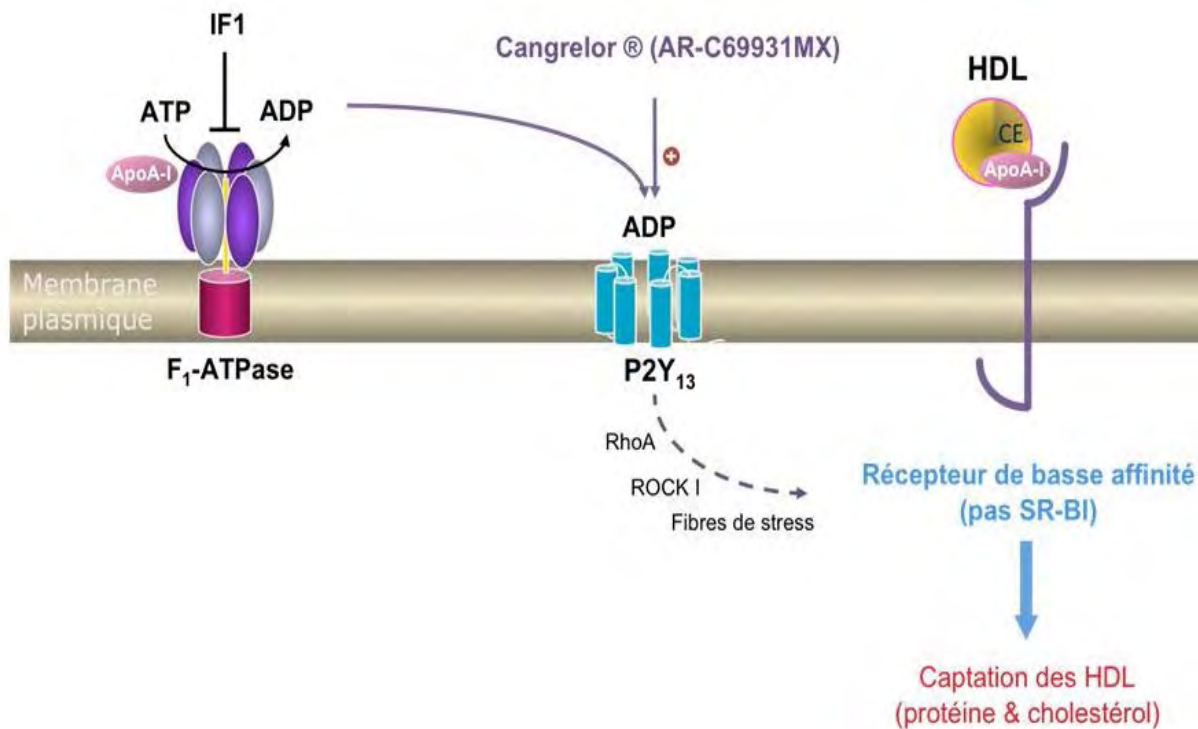


Figure.9 : Voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ d'endocytose des HDL. Au niveau des hépatocytes humains, la liaison de l'apoAI sur l'ecto-F₁-ATPase active l'activité ATP hydrolase de l'enzyme. L'ADP extra-cellulaire ainsi généré va activer le récepteur P2Y₁₃, ce qui induit une cascade de signalisation intracellulaire permettant *in fine* l'endocytose de la particule HDL entière par le récepteur de basse affinité *via* la formation des vésicules de clathrine.

3.3.2.5-Implication de P2Y₁₃ dans le RCT

Des souris invalidées pour le récepteur P2Y₁₃ (P2Y₁₃^{-/-}) ont été générées par l'équipe du Pr. JM Boeynaems et Pr. B. Robaye (Université Libre de Bruxelles) et à l'aide de ces souris, notre équipe a étudié l'implication physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans le métabolisme de HDL-C et le RCT. L'analyse des paramètres lipidiques chez ces souris ne montrent aucune différence significative dans les concentrations en cholestérol total, HDL-C, non-HDL-C et triglycérides par rapport aux souris sauvages, cependant la concentration hépatique en cholestérol libre est significativement diminuée chez les souris P2Y₁₃^{-/-}. De plus, par rapport aux souris sauvages, les souris P2Y₁₃^{-/-} présentent une diminution de la captation hépatique des HDL, marquées à l'iode 125 sur leur composante protéique (¹²⁵I-HDL), ainsi qu'une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides et également une baisse, mais non significative, du flux biliaire et des sécrétions biliaires en acides biliaires (Fabre et al., 2010).

Nous avons ensuite étudié l'impact de ce phénotype métabolique sur le RCT des macrophages marqués au ^3H -cholestérol vers les fèces et nous avons observé chez les souris $\text{P2Y}_{13}^{-/-}$ une forte diminution de traceur ^3H dans les stérols neutres et les acides biliaires contenus dans les fèces (Fabre et al., 2010). L'ensemble de ce travail montre que l'inactivation du récepteur $\text{P2Y}_{13}^{-/-}$ chez la souris altère fortement le transport hépatobiliaire du cholestérol (Fabre et al., 2010). Parallèlement à ce travail, Bolm *et al.* ont également généré des souris de $\text{P2Y}_{13}^{-/-}$ et ont montré que l'inactivation du récepteur P2Y_{13} entraîne une légère diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol total et HDL-C ainsi qu'une diminution du RCT, avec notamment une diminution de l'excrétion des stérols neutres dans les fèces (Blom et al., 2010).

La différence observée au niveau des lipides plasmatique entre notre étude et l'étude de Blom *et al.* peut être expliquée par des légères différences trouvées au niveau de l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme de cholestérol. Dans notre étude, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de la captation hépatique des HDL induite par l'inactivation du récepteur P2Y_{13} pourrait donner lieu à une diminution dans la production des HDL par le foie. En effet, sur notre modèle de souris $\text{P2Y}_{13}^{-/-}$, nous avons observé une diminution de l'expression génique de ABCA1 et ABCG1 hépatiques qui sont connus pour contribuer à la production hépatique des HDL. Blom *et al.* proposent deux hypothèses pour expliquer l'effet de l'inactivation de P2Y_{13} sur les lipides plasmatiques. Tout d'abord, par la possibilité que l'inactivation du récepteur P2Y_{13} entraîne un changement compensatoire au niveau de certains gènes liés à l'absorption des lipoprotéines. Une deuxième possibilité est que P2Y_{13} ne modifie pas directement le métabolisme des HDL, mais plutôt modifie le catabolisme des métabolites dans les tissus hépatiques et extra-hépatiques qui à leur tour modifient le métabolisme des lipoprotéines. L'ensemble de ces résultats montre pour la première fois un rôle important de récepteur P2Y_{13} dans le métabolisme des HDL et le RCT. L'impact de ce rôle métabolique du récepteur P2Y_{13} sur le développement de l'athérosclérose a été étudié dans la partie expérimentale.

D'autre part, l'effet de surexpression de P2Y_{13} chez la souris n'a pas été encore étudié.

Manipulation génétique	Effet sur HDL-C	Effet sur RCT	Effet sur l'athérosclérose	Référence
Invalidation SR-BI	Augmentation	Diminution	Augmentation (SR-BI ^{-/-})	(Huby et al., 2006)(YuZhen Zhang et al., 2005)(Varban et al., 1998)(Rigotti et al., 1997)
Surexpression SR-BI	Diminution	ND	Diminution (LDLr ^{-/-})	(Out et al., 2005)(Ueda et al., 1999)(Kozarsky et al., 2000)
Invalidation de P2Y ₁₃	Pas d'effet Diminution	Diminution	Augmentation (cf. chapitre III article 3)	(Fabre et al., 2010)(Blom et al., 2010)

Tableau.6 Relations entre les taux plasmatiques de HDL-C, le RCT et le développement de l'athérosclérose en réponse à la manipulation génétique des récepteurs impliqués dans le catabolisme hépatique des HDL.

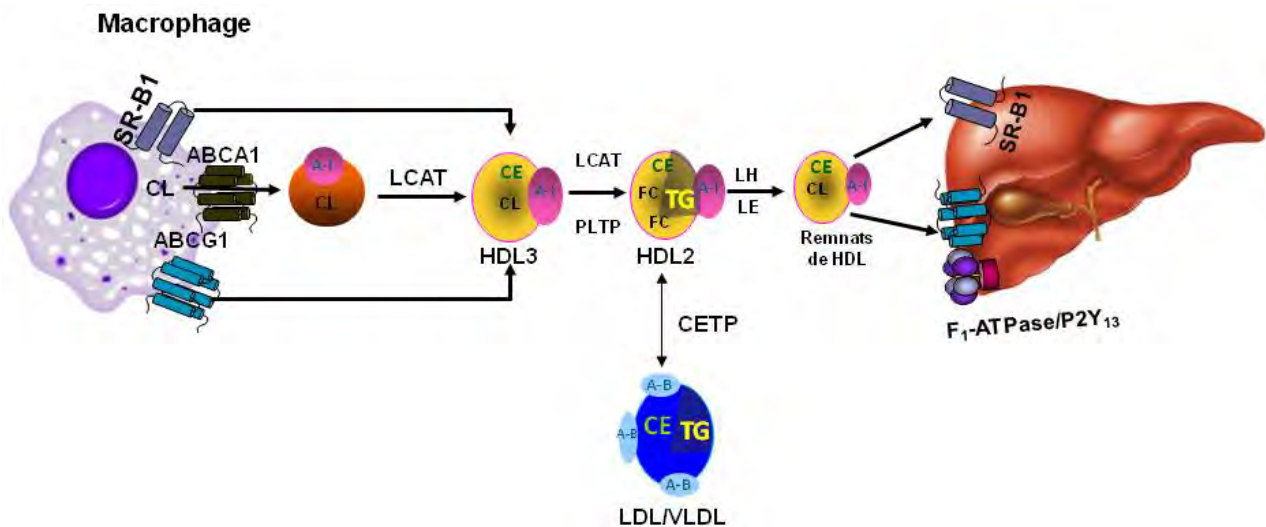


Figure 10. Captation hépatique des HDL. Après avoir subi les différents processus de maturation plasmatique, les HDL sont captés au niveau hépatique soit par SR-BI qui capte préférentiellement le CE des HDL soit par la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ qui capte la particule HDL entière (holoparticule).

3.4-Elimination de cholestérol par voie biliaire (Tableau 7 et Figure 13)

L'élimination biliaire du cholestérol se fait soit sous la forme de cholestérol libre soit après sa conversion en acides biliaires. Cette voie constitue la dernière étape du RCT. La biosynthèse des acides biliaires constitue un processus catabolique par lequel le cholestérol (composé hydrophobe insoluble) est converti en molécules solubles d'acides biliaires qui seront facilement sécrétés.

3.4.1-Biosynthèse des acides biliaires (Figure 11)

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

Il existe deux voies de biosynthèse des acides biliaires : la voie classique (ou neutre) et la voie alternative (ou acide). La voie neutre débute par la réaction de 7α hydroxylation du noyau stérol par la cholestérol 7α -hydroxylase (CYP7A1) au niveau du réticulum endoplasmique (Ishibashi, Schwarz, Frykman, Herz, & Russell, 1996). La voie alternative (ou acide) débute par la réaction d'hydroxylation de la chaîne latérale du cholestérol à la position C27 par la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) au niveau de la mitochondrie (Cali and Russell, 1991). Le produit de la réaction catalysée par CYP27A1 pourra être hydroxylé par CYP7B1 au niveau du réticulum endoplasmique pour former un intermédiaire 7α -hydroxycholestérol. A partir de cette étape, les deux voies se regroupent. Les intermédiaires formés par CYP7A1 ou CYP7B1 vont subir l'action de la 3β -hydroxy C27 steroid deshydrogenase /isomérase (HSD3B7). Le produit de l'activité de HSD3B7 pourra ensuite emprunter 2 voies différentes. Dans le cas où il interagit avec la stérol 12α -hydroxylase (CYP8B1), il formera l'acide cholique. Par contre, l'acide chénodésoxycholique sera formé si le produit de HSD3B7 n'interagit pas avec la CYP8B1. Ainsi, l'activité de CYP8B1 détermine la proportion dans laquelle les acides biliaires primaires sont formés (Li-Hawkins et al., 2002). Avant leur sécrétion dans la lumière du canalicule biliaire, les acides biliaires primaires sont conjugués au niveau de leur chaîne latérale avec une molécule de taurine ou de glycine.

Cette réaction est catalysée au niveau du péroxisome par la Bile Acid Coenzyme A : aminoacid N-acyltransferase, (BAT) (Falany, Johnson, Barnes, & Diasio, 1994). La conjugaison des acides biliaries augmente leur solubilité et les rend donc imperméables aux membranes cellulaires ce qui implique l'intervention de transporteurs transmembranaires pour leur sécrétion.

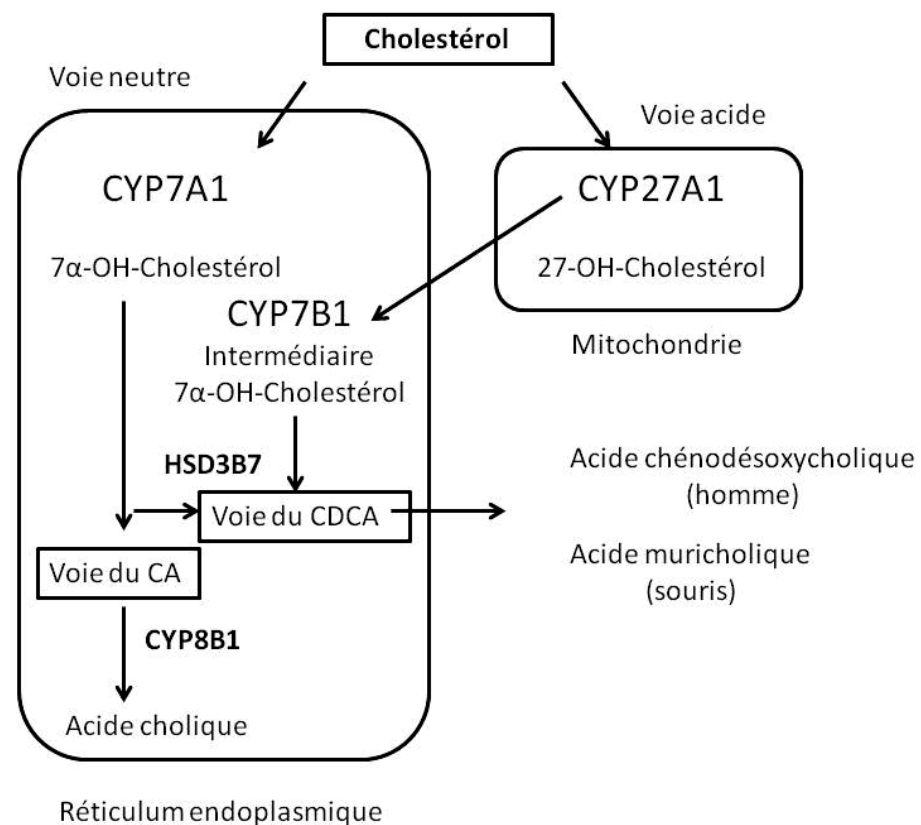


Figure 11. Voie de synthèse des acides biliaries

3.4.2-Transport hépatobiliaire du cholestérol et des acides biliaries

3.4.2.1-ABCG5/ABCG8

ABCG5 et ABCG8 forment un transporteur hétérodimérique (ABCG5/G8) principalement exprimé dans le foie et l'intestin. Au niveau hépatique, ABCG5/G8 permet le transport des stérols vers la bile, favorisant ainsi leur excrétion. Au niveau intestinal, le transporteur assure l'efflux des stérols vers la lumière intestinale, ce qui réduit leur absorption (Méndez-González et al., 2011). Ces deux demi-transporteurs ont été identifiés chez les patients présentant une sitostérolémie, une maladie récessive autosomale rare caractérisée par

l'accumulation des stérols végétaux et du cholestérol dans le plasma et les tissus, avec comme conséquence un développement prématurée de l'athérosclérose (Voloshyna & Reiss, 2011).

Le rôle d'ABCG5/G8 dans le transport du cholestérol et son élimination par les voies biliaires a été étudié chez la souris. En effet, l'inactivation d'ABCG5/G8 chez la souris (ABCG5/G8^{-/-}) entraîne une diminution de 50% de la concentration plasmatique et hépatique en cholestérol, cependant la concentration en stérols totaux reste inchangée du fait d'une augmentation de la concentration en stérols végétaux. En l'absence d'ABCG5/G8, l'accumulation des stérols végétaux dans le foie est compensée par une diminution de la concentration en cholestérol hépatique *via* une régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol comme la HMG-CoA synthase et réductase. Chez ces souris on observe une diminution d'environ de 75% de la concentration en cholestérol dans la bile qui se traduit par une diminution d'élimination des stérols neutres dans les fèces (Yu, Von Bergmann, Lutjohann, Hobbs, & Cohen, 2004)(Yu et al., 2002). Il a été également observé chez les souris ABCG5/G8^{-/-} une hypertriglycéridémie causée par un défaut dans le catabolisme des triglycérides et une augmentation de sécrétions des triglycérides au niveau du foie et de l'intestin (Méndez-González et al., 2011). Ainsi, ABCG5 et ABCG8 sont nécessaires pour maintenir la composition des stérols plasmatiques et hépatiques et pour l'élimination de cholestérol par voie biliaire.

Il est important de noter que même après l'inactivation d'ABCG5/G8, il existe une sécrétion résiduelle de cholestérol dans la bile chez ces souris. Ceci suggère l'existence d'une autre voie, indépendante à ABCG5/G8, de sécrétion biliaire du cholestérol. Il a été montré que SR-BI est également exprimé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes et que sa surexpression entraîne une augmentation des sécrétions biliaires en cholestérol chez des souris sauvages mais également chez les souris invalidées pour ABCG5/G8 (Wiersma, Gatti, Nijstad, Oude Elferink, et al., 2009). La voie d'excrétion biliaire du cholestérol indépendante d'ABCG5/G8 pourrait donc être médiée par SR-BI.

L'effet de la surexpression d'ABCG5/G8 chez la souris sur le transport et l'élimination des stérols a été également étudié. Cette surexpression n'a aucun effet sur les concentrations plasmatique et hépatique en cholestérol, ni sur la distribution des lipoprotéines plasmatiques. Cependant on observe chez ces souris une augmentation significative des stérols végétaux plasmatiques ainsi qu'une augmentation d'un précurseur de la biosynthèse

du cholestérol, le lathostérol. La différence la plus frappante, entre les souris transgénique surexprimant ABCG5/G8 et les souris contrôles, est l'augmentation d'environ 5 fois des sécrétions biliaires en cholestérol par rapport aux souris sauvages. On observe aussi une augmentation significative des sécrétions biliaires en phospholipides mais aucune différence dans sécrétions biliaires en acides biliaires. Cette augmentation des sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides se traduit par augmentation d'excrétion des stérols neutre dans les fèces. Ces souris présentent aussi une diminution d'absorption du cholestérol alimentaire de 50% (Yu & Li-Hawkins, 2002). L'ensemble de ces résultats montre que ABCG5/G8 joue un rôle crucial dans le transport entéro-hépatique du cholestérol et que le niveau d'expression de ces 2 semi-transporteur influe directement sur le taux d'excrétion de stérols neutres dans les fèces.

L'effet de la surexpression d'ABCG5/G8 hépatique sur le développement de l'athérosclérose a été étudié chez les souris $LDLr^{-/-}$ après 24 semaines de régime hypercholestérolémiant (0.2% de cholestérol et 20% de gras). Le résultat montre que cette surexpression n'a aucun effet sur le développement de la plaque d'athérosclérose (Wu et al., 2004). Dans une autre étude, la même équipe a montré en ajoutant au même régime de l'Ezétimibe, un inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol *via* NPC1L1 (cf. chapitre I 3.6.1), que la surexpression de ABCG5/8 chez la souris $LDLr^{-/-}$ induit une diminution du développement de la plaque de plus de 50% en comparaison avec les souris $LDLr^{-/-}$ et entraîne une diminution dans les fractions LDL et VLDL ainsi qu'une diminution de production d'apoB de 37% (Basso et al., 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que non seulement l'augmentation des sécrétions biliaires, mais aussi l'inhibition de l'absorption de cholestérol intestinal sont nécessaires pour protéger contre le développement de l'athérosclérose.

3.4.2.2-NPC1L1 (Niemann–Pick C1-like 1) (Figure 12)

NPC1L1 a tout d'abord été identifié comme un homologue de la protéine Niemann-Pick C1, dont la déficience entraîne la maladie génétique de Niemann-Pick C1 qui est caractérisée par l'accumulation intracellulaire de cholestérol non estérifié dans les neurones, ce qui entraîne la dégénérescence et des décès prématurés. NPC1L1 est composée de 13 segments transmembranaires et de 3 grandes boucles extracellulaires. Un domaine sensible au stérol a

été identifié dans la protéine NPC1L1, qui se trouve également dans d'autres protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol comme la HMG-CoA réductase et SREBP2. Chez l'homme, NPC1L1 est principalement exprimée dans l'intestin et le foie alors que chez la souris cette protéine n'est présente que dans l'intestin (L.-J. Wang & Song, 2012).

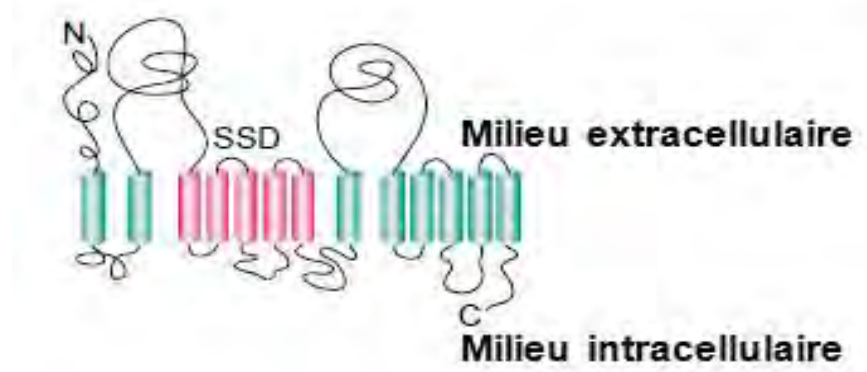


Figure 12. Structure de NPC1L1. NPC1L1 est formée de 13 domaines transmembranaires, avec en rose le domaine senseur aux stérols (SSD), de trois boucles extracellulaires et de plusieurs boucles intracellulaires. D'après (Kuwabara & Labouesse, 2002).

Le rôle de NPC1L1 hépatique sur le métabolisme de cholestérol et les sécrétions biliaires a été étudié chez la souris. Temel *et al.* ont créé des souris transgéniques surexprimant le gène NPC1L1 humain spécifiquement dans le foie et ont montré que l'expression canaliculaire de NPC1L1 conduit à une importante réduction des sécrétions biliaires en cholestérol alors que les sécrétions biliaires en phospholipides et acides biliaires restent inchangées. Cette diminution des sécrétions biliaires en cholestérol est associée à une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol total et libre. L'augmentation des taux plasmatiques en cholestérol est principalement due à une augmentation de HDL enrichies en apoE. La réduction des sécrétions biliaires en cholestérol, qui n'est pas associée à une modification de l'expression protéique de transporteurs impliqués dans la sécrétion de lipides biliaires tels que ABCG5/G8, ABCB4 ou ABCB11 a été attribuée à une augmentation *via* NPC1L1 du retro-transport du cholestérol du canalicule biliaire vers les hépatocytes. De plus, le traitement de ces souris avec l'Ezémibe, un inhibiteur de NPC1L1, restaure les concentrations biliaires en cholestérol à un niveau similaires à celui des souris

sauvages (Temel, Tang, & Ma, 2007). Ces résultats montrent que l'expression de NPC1L1 hépatiques pourrait protéger contre les excès de perte de cholestérol biliaires.

Il est généralement admis que le RCT des macrophages vers les fèces dépend de la capacité du foie à transformer et livrer le cholestérol des HDL vers la bile. Ainsi, chez les souris transgéniques exprimant NPC1L1, une modification significative de RCT devrait être observée. Cependant, le RCT des macrophages vers les fèces chez ces souris ne varie pas par rapport au souris sauvages (Temel, Sawyer, Yu, & Lord, 2010), suggérant ainsi qu'il existe des mécanismes de compensation ou que l'élimination des stérols neutres dans les fèces n'est pas strictement dépendante de l'élimination du cholestérol *via* les voies biliaires.

3.4.2.3-ABCB11

ABCB11 est un membre de la super famille des ABC transporteurs. Ce transporteur est composé de 12 domaines transmembranaires et de deux sites intracellulaires de liaison à l'ATP. ABCB11 est principalement exprimé dans les hépatocytes et constitue une cible de FXR/RXR. C'est le principal transporteur qui permet l'efflux des acides biliaires vers la bile, à travers la membrane canaliculaire. Un dysfonctionnement de ce transporteur a pour conséquence une accumulation des acides biliaires dans le foie, ce qui induit le développement de cholestase intra-hépatique (Stieger, Meier, & Meier, 2007).

Pour mieux comprendre le rôle d'ABCB11 dans l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires, des souris déficientes pour ABCB11 (ABCB11^{-/-}) ont été générées. Ces souris ont pour phénotype une diminution de 30% des sécrétions d'acides biliaires et inversement une augmentation des sécrétions biliaires de cholestérol et de phospholipides par rapport aux souris sauvages, ce qui se traduit par une accumulation d'acides biliaires dans le foie et le plasma et une cholestase intra-hépatique (R. Wang et al., 2001). Zhang *et al.* ont montré que l'accumulation des acides biliaires dans le foie induite par la perte d'expression d'ABCB11 est associée avec une diminution d'expression d'ARNm des gènes impliqués dans la synthèse d'acides biliaires (CYP7A1 et CYP7B1). Cependant, ces régulations géniques ne sont pas suffisantes pour diminuer l'accumulation des acides biliaires dans le foie et le développement de cholestase intra-hépatique (Yuanyuan Zhang et al., 2012). Par ailleurs, chez les souris ABCB11^{-/-}, les triglycérides sont diminués dans le plasma et augmentés dans

le foie suggérant que la sécrétion des triglycérides hépatique vers la circulation est plus faible chez les souris sauvages (Yuanyuan Zhang et al., 2012).

Des souris transgéniques surexprimant ABCB11 hépatique ont également été générées. Cette surexpression induit une diminution du cholestérol plasmatique alors que les concentrations hépatiques en cholestérol restent inchangées. Cette diminution peut s'expliquer par une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol. Au niveau hépatique, on observe une diminution de l'expression génique de l'HMG-CoA réductase, impliquée dans la synthèse de cholestérol, et de la CYP7A1 impliquée dans la synthèse des acides biliaires (Henkel et al., 2011). De plus, ces souris présentent une augmentation du flux et des sécrétions biliaires en cholestérol, phospholipides et acides biliaires sans modification d'expression d'ABCG5/G8 suggérant que les sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides sont couplées quantitativement à la sécrétion d'acides biliaires. L'excrétion des acides biliaires dans les fèces reste inchangée, suggérant la présence d'un recyclage des acides biliaires dans la circulation entéro-hépatique (Figge et al., 2004).

3.4.2.4-ABCB4

ABCB4 est un transporteur de phospholipides, en particulier de phosphatidylcholines, et permet la sécrétion des phospholipides dans la bile. ABCB4 est exprimé dans le foie, au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes mais dans les macrophages (Voloshyna & Reiss, 2011).

L'inactivation de ABCB4 chez la souris ($ABCB4^{-/-}$) entraîne une diminution du cholestérol plasmatique. Au niveau hépatique, seul les triglycérides sont diminués par rapport au souris sauvages (Groot, Groen, & Kuipers, 2005). Au niveau des sécrétions de lipides biliaires, le flux est augmenté et les sécrétions en cholestérol et phospholipides sont très fortement diminuées, alors que les sécrétions d'acides biliaires restent inchangées (Groot, Groen, et al., 2005)(Elferink et al., 1996). L'excrétion du cholestérol dans les fèces reste cependant inchangée (Groot, Groen, et al., 2005).

Pennings *et al.* ont montré qu'ABCB4 protège contre le développement de l'athérosclérose. En effet, 17 semaines après le transfert de moelle osseuse isolée des souris

ABC4^{-/-} → LDL^{-/-}, on observe d'une diminution des concentrations plasmatiques en LDL et VLDL et un doublement de la taille des lésions en comparaison avec les souris ABC4^{+/+} → LDL^{-/-}, due à une augmentation des cellules spumeuses (Pennings et al., 2007).

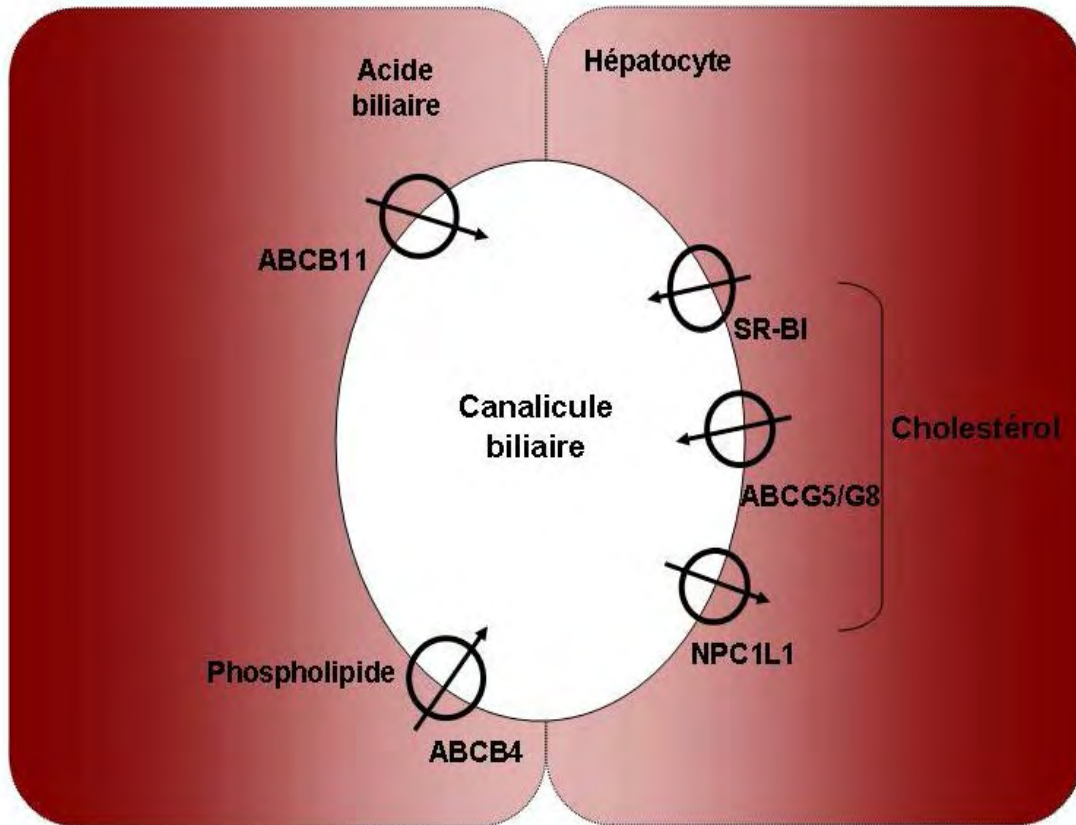


Figure 13. Transporteurs canaliculaires impliqués dans la sécrétion des lipides biliaires. Au niveau des hépatocytes, la sécrétion du cholestérol dans le canalicule biliaire se fait par l'intermédiaire des transporteurs ABCG5/G8 et SR-BI. NPC1L1 permet le transport du cholestérol dans l'autre sens (du canalicule biliaire vers les hépatocytes). La sécrétion des phospholipides dans le canalicule biliaire se fait par l'intermédiaire des transporteurs ABCB4. La sécrétion d'acides biliaires dans le canalicule biliaire se fait par l'intermédiaire des transporteurs ABCB11.

Manipulation génétique	Effet sur HDL-C	Effet sur RCT	Effet sur l'athérosclérose	Référence
Inactivation ABCG5/G8	Diminution	Diminution	ND	(Yu et al., 2002, 2004)
Surexpression ABCG5/G8	Pas d'effet	Augmentation	Diminution (LDLr ^{-/-})	(Wu et al., 2004; Yu & Li-Hawkins, 2002)(Basso et al., 2007)
Inactivation ABCB11	ND	ND	ND	
Surexpression ABCB11	Diminution	Pas d'effet	ND	(Figge et al., 2004; Henkel et al., 2011)
Inactivation ABCB4	Diminution	Pas d'effet	Diminution (LDLr ^{-/-})	(Groot, Groen, et al., 2005; Pennings et al., 2007)
Surexpression NPC1L1	Augmentation	Pas d'effet	ND	(Temel et al., 2010, 2007)

Tableau.7 Relation entre les taux plasmatiques de HDL-C, le RCT et le développement de l'athérosclérose en réponse à la manipulation génétique des transporteurs de lipides biliaires.

3.5-Le tissu adipeux et la biogenèse des HDL

Le tissu adipeux, qui représente entre 10 et 35 % de la masse corporelle humaine, joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique. Il est le site principal de stockage des acides gras sous forme de triglycérides, et représente également le plus grand réservoir de stockage de cholestérol libre. De ce fait, le déséquilibre de cholestérol adipeux est associé à un dysfonctionnement des adipocytes et de faible taux plasmatiques en HDL (Chung, Sawyer, Gebre, Maeda, & Parks, 2011).

Des études récentes montrent que le tissu adipeux exprime ABCA1, ABCG1 et SR-BI et que l'homéostasie du cholestérol adipocytaire peut être régulée de manière spécifique

(YuZhen Zhang et al., 2010). Le rôle d'ABCA1, ABCG1 et SR-B1 adipocytaire dans la formation des HDL naissantes et leur contribution aux HDL plasmatiques ont été étudiés *in vivo* chez la souris. Chung *et al.*, ont montré que des souris invalidées pour ABCA1 spécifiquement dans le tissu adipeux (ABCA1^{-a/-a}) présentent une diminution significative des taux plasmatique en HDL-C (-15%), apoA-I (-13%) et double la concentration adipocytaire en cholestérol libre. L'incubation en présence d'apoA-I d'adipocytes isolés de souris ABCA1^{-a/-a}, préalablement marqués avec du ³H-cholestérol, montre une absence totale de traceur ³H dans le milieu. Par contre, 24h après injection par voie intraveineuse de HDL radiomarquées à l'iode 125, aucune différence de traceur n'a été observée dans le plasma et le foie entre les souris ABCA1^{-a/-a} et les souris sauvages. Ces données suggèrent que l'inactivation sélective d'ABCA1 dans les adipocytes n'affecte pas le catabolisme des HDL, mais diminue l'efflux du cholestérol du tissu adipeux vers l'apoA-I plasmatique, ce qui induit une diminution de la formation des HDL naissantes (Chung et al., 2011). Zhang *et al.* ont isolé puis marqué avec du ³H-cholestérol des adipocytes de souris ABCA1^{-/-}; puis ces derniers ont été injectés par voie intra-péritonéale à des souris sauvages. Les résultats montrent une diminution du traceur ³H dans le plasma et les fèces de ces souris en comparaison avec les souris injectées avec des macrophages de souris sauvages. Le même résultat est observé lorsque l'expérience est reproduite avec des adipocytes issus de souris SR-BI^{-/-} (YuZhen Zhang et al., 2010). En parallèle, les auteurs ont injecté des adipocytes sauvages marqués avec du ³H-cholestérol à des souris apoA-I^{-/-} et apoA-I Tg. Leurs résultats montrent une diminution du traceur ³H associé avec les HDL isolées des souris apoA-I^{-/-} et une augmentation de son association avec les HDL isolées des souris apoA-I Tg (YuZhen Zhang et al., 2010). Ces résultats montrent que l'adipocyte permet le transfert du cholestérol vers les HDL et l'apoA-I *in vivo*, et que ce mécanisme nécessite la présence d'ABCA1 et SR-BI. Ainsi le tissu adipeux joue un rôle non négligeable dans la formation des HDL naissantes ainsi que dans le maintien des concentrations plasmatiques en HDL.

3.6-Transport intestinal du cholestérol (Figure 14)

3.6.1-Absorption intestinale du cholestérol

Les entérocytes sont des cellules polarisées de l'épithélium intestinal, caractérisées à leur pôle apical par un plateau strié de microvillosités qui forme une bordure en brosse. L'absorption intestinale du cholestérol commence par l'hydrolyse des esters de cholestérol d'origine alimentaire, libérant ainsi du cholestérol libre et des acides gras absorbables au pôle apical entérocytaire. Il existe plusieurs candidats susceptibles de contrôler l'absorption du cholestérol alimentaire, mais certains d'entre eux, tels que NPC1L1 et ABCG5/G8, semblent moduler directement l'absorption du cholestérol au niveau du pôle apical, alors que d'autres, tel que ABCA1, sont plutôt impliqués dans l'efflux du cholestérol vers le plasma, au niveau du pôle basolatéral.

3.6.1.1-NPC1L1

L'analyse *in vivo* de la fonction d'un inhibiteur pharmacologique de l'absorption intestinale du cholestérol, l'Ezétimibe, suggère que ce composé agit sur un transporteur spécifique. Pour identifier le gène impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol, Altman *et al.*, ont entrepris, en utilisant une approche bio-informatique, l'analyse génomique des 16500 séquences exprimées au niveau jéjunal chez le rat, en sélectionnant les régions géniques présentant les caractéristiques attendues pour un transporteur de cholestérol (des séquences prédictives de domaines transmembranaires, des peptides signaux extracellulaires et des sites de N-glycosylation connus ainsi que des motifs interagissant avec le cholestérol comme le domaine sensible aux stérols) et conservés chez la souris et l'homme. Seule la protéine NPC1L1 (Niemann–Pick C1-like 1) remplissait l'ensemble de ces critères de sélection (Altmann *et al.*, 2004). Pour étudier le rôle de cette protéine dans l'absorption de cholestérol *in vivo* Altman *et al.* ont créé des souris déficientes pour le gène NPC1L1 (NPC1L1^{-/-}). La seule caractéristique phénotypique qui différencie ces souris des souris sauvages est une diminution de l'absorption de cholestérol alimentaire (-69%) lors d'un régime normolipidique et une diminution de la concentration en cholestérol estérifié dans le foie. Sous régime riche en acide cholique favorisant l'absorption intestinale des lipides, notamment du cholestérol alimentaire, Altman *et al.* ont observé une diminution de l'absorption du cholestérol de l'ordre de 80% chez les souris NPC1L1^{-/-} alors que l'absorption des triglycérides restait identique à celle des souris sauvages. La diminution de l'absorption du cholestérol alimentaire chez ces souris semble être compensée par un augmentation de

la biosynthèse du cholestérol *via* l'activation de l'expression des gènes HMG-CoA réductase au niveau intestinal et HMG-CoA synthase au niveau hépatique (Altmann et al., 2004). L'ensemble de ces résultats permet de conclure que NPC1L1 est un élément central de mécanisme d'absorption de cholestérol entérocytaire.

3.6.1.2-ABCG5/G8

Le transporteur hétérodimérique ABCG5/G8 défectueux chez les patients sitostérolémiques est principalement impliqué dans l'exclusion des stérols d'origine végétale par l'entérocyte mais limite également partiellement l'absorption intestinale du cholestérol, en particulier lors d'un apport alimentaire important en lipides.

ABCG5 et ABCG8, sont principalement localisés sur la membrane apicale des cellules intestinales et sur la membrane caniculaire des hépatocytes, fonctionnent en hétérodimère (cf. Chapitre I paragraphe 3.4.1)(Graf, Li, & Gerard, 2002), et interviennent dans le contrôle de l'homéostasie des stérols totaux de l'organisme. Ces deux protéines limitent l'absorption des stérols issus des plantes en les sécrétant de l'épithélium intestinal vers la lumière et en favorisant la sécrétion des stérols et du cholestérol hépatique dans la bile. La déficience en ABCG5/G8 chez la souris se traduit par une augmentation de l'absorption intestinale des stérols végétaux, avec un effet mineur sur l'absorption du cholestérol (Yu et al., 2002). Cependant, dans une autre étude les mêmes auteurs ont montré que la surexpression des ABCG5/G8 chez la souris entraîne une réduction de l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire de 50% (Yu & Li-Hawkins, 2002)(Hui & Howles, 2005). Ceci montre clairement que la modulation de l'expression d'ABCG5/G8 au niveau intestinal joue un rôle important dans le contrôle de l'absorption entérocytaire du cholestérol alimentaire.

3.6.1.3-SR-BI

Au niveau de l'intestin, SR-BI est présent au niveau de la bordure en brosse et participe à l'absorption du cholestérol alimentaire. Mardones *et al.*, ont montré que la déficience de SR-BI n'altère pas l'absorption du cholestérol et son excrétion dans les fèces. Ce résultat suggère que l'expression de SR-BI au niveau intestinal, à la différence de NPC1L1, n'est pas essentielle à l'absorption du cholestérol (Mardones et al., 2001b).

Par ailleurs, la surexpression de SR-BI au niveau intestinal chez la souris diminue les concentrations plasmatiques en cholestérol total et HDL-C et augmente les sécrétions biliaires en cholestérol (+20%). Aucune différence significative dans les concentrations hépatiques et intestinales en cholestérol libre et estérifié n'a été observée entre les souris transgénique et les souris sauvages. Après un gavage avec du cholestérol radiomarqué (^3H -cholestérol), les auteurs observent une augmentation du traceur ^3H dans l'intestin et le foie ainsi que dans les sécrétions biliaires (Bietrix et al., 2006). Ainsi, ces résultats suggèrent une absorption accélérée de cholestérol *via* SR-BI chez les souris surexprimant SR-BI au niveau intestinal.

3.6.2-Biogenèse des HDL d'origine intestinale : Implication d'ABCA1

Le transporteur ABCA1 est principalement localisé au pôle basolatéral des entérocytes au niveau duquel il serait responsable de l'efflux du cholestérol vers le plasma. Le rôle d'ABCA1 dans la biogenèse des HDL d'origine intestinale a été mis en évidence lors de la suppression de son expression intestinale. Les souris invalidées pour ABCA1 intestinal ont été générées par l'insertion de deux sites LoxP entre l'intron 44 et 46 du gène ABCA1 ; par la suite ces souris ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant la Cre-Villin, permettant ainsi l'invalidation du gène ABCA1 spécifiquement au niveau intestinal ($\text{ABCA1}^{-i/i}$). En utilisant ce modèle, Brunham *et al.* ont montré que la concentration plasmatique en HDL-C est diminuée de 30% et celle d'apoA-I de 25%. L'incubation d'entérocytes de souris $\text{ABCA1}^{-i/i}$, marqués avec du ^3H -cholestérol en présence des micelles, montre une diminution du traceur ^3H dans les HDL de 40%. De plus, deux heures après un gavage avec du ^3H -cholestérol, on observe que le traceur ^3H diminue dans les HDL circulants et le foie, et augmente dans l'intestin (Brunham et al., 2006). Ces résultats montrent que l'absence d'ABCA1 au niveau entérocytaire induit une accumulation du cholestérol cellulaire et diminue sa sécrétion, ce qui confirme l'implication d'ABCA1 au niveau intestinal dans l'efflux du cholestérol cellulaire et la biogénèse des HDL.

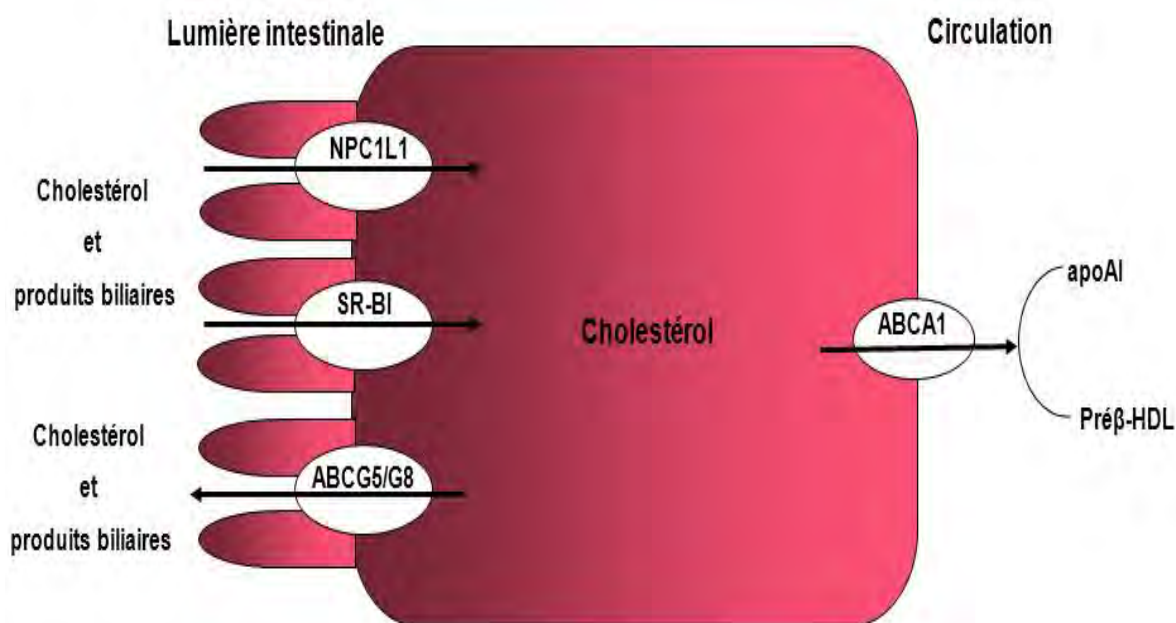


Figure 14. Absorption intestinale du cholestérol et de ses dérivées au niveau des entérocytes. Au niveau de la bordure en brosse, le cholestérol est absorbé par NPC1L1 et possiblement SR-BI. Une partie du cholestérol absorbé ressort de l'entérocyte soit au pôle apical par ABCG5/G8 soit au pôle basolatéral par ABCA1 où il sera pris en charge par l'apoA-I.

3.6.5- Excrétion Trans intestinale du cholestérol (TICE)

Les souris déficientes pour le transporteur hétérodimérique ABCG5/G8 présentent de très faibles taux des sécrétions biliaires en cholestérol ; cependant l'excrétion fécale en stérols est seulement diminuée de 36% en comparaison avec les souris contrôles (Yu et al., 2002). On observe un phénomène similaire chez les souris invalidées pour le récepteur ABCB4 (transporteur de phospholipides dans la bile). En effet, les taux de stérols neutres et d'acides biliaires dans les fèces est similaire à celui trouvé chez les souris sauvages et ceci en absence de sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides (Groot, Groen, et al., 2005). L'ensemble de ces données suggère l'existence d'une voie d'élimination des stérols qui serait indépendante du transport hépatobiliaire du cholestérol.

Van der Velde *et al.* ont montré par des expériences de perfusion intestinale que du cholestérol radiomarqué injecté en intra-veineux pouvait être retrouvé au niveau de la lumière intestinale. Ces résultats montrent pour la première fois que la voie biliaire n'est pas la seule voie d'élimination du cholestérol dans les fèces et qu'il existe une voie de sécrétion

du cholestérol du sang vers la lumière intestinale. Cette voie non hépato-biliaire du RCT a été appelée TICE pour Transintestinal Cholesterol Efflux. Il semblerait que, chez la souris, cette voie élimine deux fois plus de cholestérol dans les fèces que la voie hépato-biliaire (Van der Velde et al., 2007).

Chapitre II

Approches thérapeutiques ciblant le métabolisme des HDL et le RCT

Des taux élevés de HDL-C sont reconnus comme étant un facteur protecteur vis à vis de l'athérosclérose (Cooney et al., 2009). Inversement, un taux bas est considéré comme facteur de risque majeur, il a été montré qu'une diminution de 1 mg/dL du taux plasmatique de HDL-C est associée à une augmentation de 2 à 3% du risque d'accident cardiovasculaire (Hausenloy & Yellon, 2008). L'effet athéroprotecteur des HDL est attribué principalement à leur rôle majeur dans le RCT (cf. chapitre I). La modulation des taux de HDL-C plasmatique ainsi que du RCT a attiré l'intérêt des laboratoires pharmaceutiques qui ont développé des composés pharmacologiques susceptibles d'agir sur différentes cibles. Toutefois, contrairement à ce qui a été réalisé dans le domaine du contrôle des LDL par les statines, la modulation pharmacologique de la biologie des HDL n'a pas obtenu un succès comparable dans l'usage clinique. Néanmoins, les connaissances croissantes dans le domaine des HDL ont donné une nouvelle génération de médicaments qui sont en cours d'évaluation clinique et sont en mesure non seulement d'augmenter les niveaux de HDL et de leurs fonctions, mais aussi de parvenir, dans des modèles animaux, à une régression des plaques d'athérosclérose.

Ce chapitre sera consacré à la description des différentes cibles connues ainsi que les stratégies thérapeutiques utilisées pour augmenter le RCT et les taux plasmatiques de HDL-C dans le traitement de l'athérosclérose.

1 Approches non pharmacologiques

1.1-Exercice physique

Chez l'homme, l'exercice physique est associé à une diminution de risque des événements coronariens. De plus, il a été montré que l'exercice physique permet d'améliorer le profil des lipoprotéines plasmatiques vers un phénotype anti-athérogène, caractérisé par une augmentation des taux de HDL-C et une diminution des taux de LDL-C et des triglycérides (Leon & Sanchez, 2001). De plus, chez l'homme l'exercice physique augmente la capacité du plasma à promouvoir l'efflux du cholestérol *in vitro* (Olchawa et al., 2004).

Meissner *et al.* ont étudié l'impact de l'exercice physique volontaire sur le RCT *in vivo* chez les souris sauvages. Les souris sont placées dans des cages individuelles équipées d'une roue, le temps et la distance parcourue sont enregistrés pendant deux semaines. Un groupe témoin est maintenu sédentaire pendant la même période de temps. A la fin de l'expérience, le taux plasmatique en triglycérides est significativement diminué, alors que le taux de HDL-C et le rapport VLDL-C/LDL-C sont légèrement diminués en comparaison avec les souris sédentaires. Cependant, le taux en cholestérol total reste inchangé. L'efflux du ³H-cholestérol des macrophages, issus des souris après l'exercice physique, vers le plasma est significativement augmenté *in vitro*. Cependant, cette augmentation d'efflux n'est pas le reflet du RCT *in vivo* (Meissner, Nijstad, Kuipers, & Tietge, 2010).

Une autre équipe a étudié l'impact d'un exercice physique forcé chez les souris CETP Tg, modèle de souris humanisées (Rocco *et al.*, 2011). En effet, les animaux sont soumis à un exercice physique effectué sur un tapis roulant pendant 30 min, 5 fois par semaine pendant 6 semaines. Un groupe est maintenu sédentaire pendant la même période de temps. Sur ce modèle, les auteurs ont observé que l'exercice physique induisait une augmentation de la concentration plasmatique en HDL-C, une augmentation de RCT des macrophages vers les fèces et de l'expression hépatique de LDLr et d'ABCA1 (ARNm et protéines) (Rocco *et al.*, 2011).

Pour conclure ces études, Meissner *et al.* Rocco *et al.* qui diffèrent sensiblement selon le modèle utilisé suggèrent que l'exercice physique pourrait jouer un rôle important dans la prévention et la régression de l'athérosclérose en favorisant l'efflux de cholestérol des macrophages et son catabolisme hépato-biliaire.

1.2-Composants alimentaires

1.2.1-L'huile de poisson

Les graisses alimentaires sont considérées comme l'un des facteurs les plus importants liés au développement de l'athérosclérose. Les acides gras saturés augmentent le taux plasmatique en LDL-C et accélèrent la progression de l'athérosclérose. Alors que, les acides gras insaturés, comme l'huile de poisson, sont censés protéger contre la progression d'athérosclérose (Mozaffarian & Rimm, 2006).

Nishimoto *et al.* ont étudié l'effet de l'huile de poisson, en comparaison avec d'autres huiles riches en acides gras comme l'huile de soja et l'huile de noix de coco sur le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques et le RCT (Nishimoto *et al.*, 2009). Après 4 semaines de régime, les taux plasmatiques en cholestérol total, HDL-C et non HDL-C sont significativement plus faibles chez les souris nourries avec un régime enrichi en huile de poisson par comparaison avec les souris nourries avec un régime enrichi en huile de soja et huile de noix de coco. Le RCT des macrophages vers les fèces est stimulé chez les souris nourries avec le régime enrichi avec l'huile de poisson, avec notamment une augmentation d'excrétion fécale en stérols neutres de 273 et 182% en comparaison avec les souris nourries respectivement avec de l'huile de soja et l'huile de noix de coco (mesure du ^3H dans les fèces). De plus, le régime enrichi en huile de poisson augmente l'expression d'ARNm hépatique de ABCG5/ABCG8 et diminue l'expression d'ARNm intestinale de NPC1L1, ce qui peut contribuer à une stimulation du RCT (Nishimoto *et al.*, 2009). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une alimentation enrichie avec de l'huile de poisson favorise le RCT, ce qui peut être à l'origine de l'effet bénéfique de ces huiles.

1.2.2-Le café

Le café fait partie des boissons les plus consommées dans le monde ; c'est une source majeure des polyphénols connus pour leurs propriétés anti-oxydantes (Sevov, Elfineh, & Cavelier, 2006). Une étude récente montre que la consommation du café peut être associée à une diminution de mortalité cardiovasculaire (Lopez-Garcia, Van Dam, Li, Rodriguez-Artalejo, & Hu, 2008).

Uto-kondo *et al.* ont étudié l'effet de la consommation du café ou d'acide férulique pur, l'acide phénolique majeur du café, sur l'efflux de cholestérol et le RCT par gavage chez la souris sauvage. Leurs résultats montrent que le café et l'acide férulique augmentent l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL mais pas vers l'apoA-I *in vitro*, ils observent aussi une augmentation d'expression d'ABCG1 et SR-BI (ARNm et protéines). Chez ces souris, 48h après l'injection de macrophages chargés en ^3H -cholestérol, la quantité de traceur provenant des macrophages retrouvée dans les fèces est augmentée en comparaison avec les souris sauvages (Uto-Kondo *et al.*, 2010). Ainsi, ces résultats suggèrent que la consommation de café peut avoir des effets athéroprotecteurs en augmentant l'efflux de cholestérol des macrophages et son élimination par les fèces.

2- Approches pharmacologiques ciblant le métabolisme des HDL et le RCT :

2.1-Les agonistes des récepteurs nucléaires (tableau 8)

2.1.1-Agoniste LXR (Liver X Receptor)

Les LXRs (LXR α et LXR β) sont des facteurs de transcription, qui sont associés avec le Retinoid X Receptor (RXR), activés par les oxystérols et jouent un rôle important dans l'homéostasie lipidique. L'activation des LXRs induit l'expression des nombreux gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et dans le transport retour du cholestérol (**Figure 15**).

Naik *et al.* ont montré que le traitement des souris sauvages avec un agoniste synthétique de LXR, le GW3965, augmente l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport du cholestérol comme ABCA1, ABCG1, ABCG5/G8 et CYP7A1 dans le foie et l'intestin (Naik et al., 2006). Ainsi, le traitement des souris avec le GW3965 augmente la concentration plasmatique en HDL-C de 54% et le RCT des macrophages vers les fèces *in vivo*. En effet, 48h après l'injection des macrophages marqués avec du ^3H -cholestérol, on observe chez les souris traitées une augmentation du traceur ^3H dérivé des macrophages dans le plasma et les fèces (Naik et al., 2006).

Calpe-Berdiel *et al.* ont montré qu'un autre agoniste de LXR, le T0901317, augmente l'expression de ABCG5/G8 hépatique, ainsi que l'excrétion du ^3H -cholestérol chez des souris sauvages ; cet effet est absent chez les souris ABCG5/G8 $^{-/-}$. Ce résultat suggère que l'expression d'ABCG5/G8 est essentielle à la stimulation du RCT par cet agoniste de LXR (Calpe-Berdiel et al., 2008). De plus, le traitement des souris apoE $^{-/-}$ et LDLr $^{-/-}$ avec le GW3965 réduit significativement le développement de la plaque d'athérosclérose de 50%, sans changement au niveau des lipoprotéines plasmatiques (Joseph et al., 2002). Cet effet suggère l'implication d'une action directe sur les cellules de la paroi artérielle, en plus des effets hépatiques et intestinaux (Joseph et al., 2002).

Les LXRs sont responsables de la régulation de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides comme le Sterol-Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP1c) ou la Fatty Acid Synthase (FAS). Ainsi, le facteur limitant de nombreux agonistes des LXRs non sélectifs est d'induire la stimulation de la biosynthèse hépatique des acides gras conduisant à une stéatose hépatique. De nombreuses études *in vivo* ont montré que suite à un traitement avec des agonistes des LXRs, les souris présentent une accumulation

massive de triglycérides dans le foie et une augmentation des taux plasmatiques en triglycérides dues à l'induction de l'expression hépatique de SREBP1c qui induit à son tour l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras (Repa et al., 2000; Schultz et al., 2000). De plus, les agonistes des LXRs pourraient également être responsables de l'augmentation des taux de LDL-C chez les espèces possédant la CETP (Groot, Pearce, et al., 2005). Du fait de ces effets secondaires, des études complémentaires chez des modèles animaux possédant la CETP sont nécessaires pour vérifier l'impact de son activation sur les taux de LDL plasmatiques.

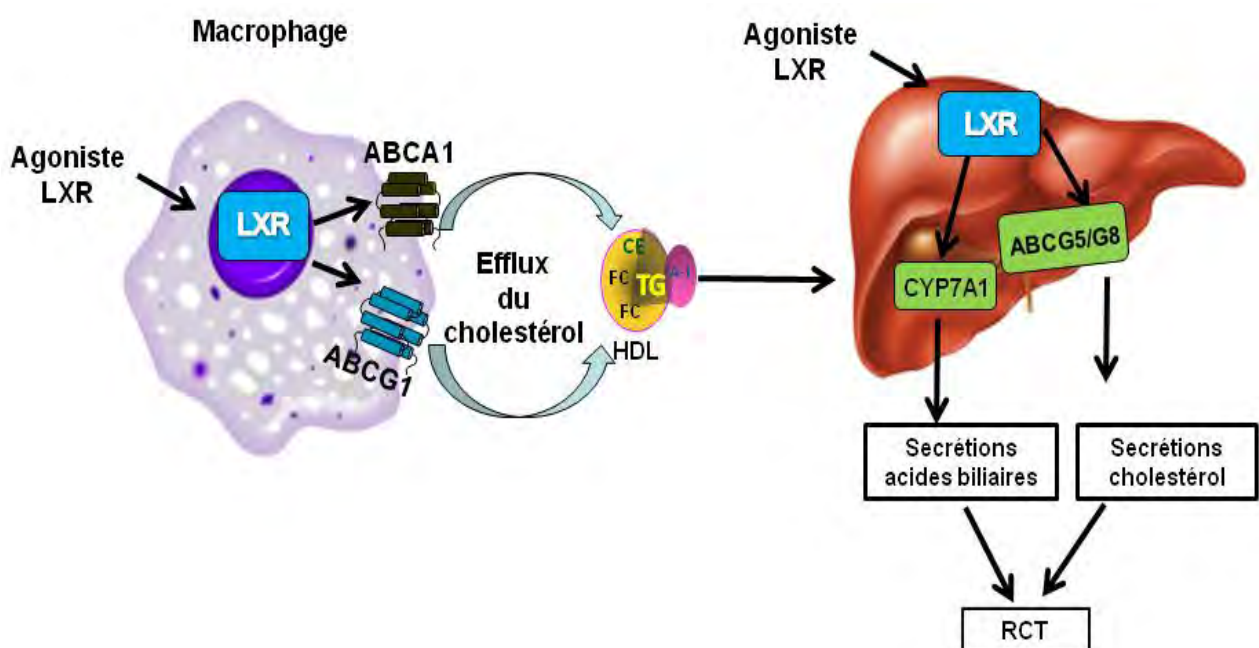


Figure 15. Régulation du métabolisme du cholestérol par les LXRs. Dans les macrophages et les tissus extra-hépatiques, l'activation des LXRs stimule l'efflux du cholestérol en augmentant l'expression d'ABCA1 et d'ABCG1. Au niveau hépatique, cette activation stimule le RCT en augmentant l'expression de CYP7A1 et d'ABCG5/G8.

2.1.2-Agoniste des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)

Les PPARs représentent un sous-groupe de la super famille des récepteurs nucléaires incluant le PPAR α , PPAR γ et PPAR δ . Ils régulent l'expression des gènes qui contrôlent le métabolisme lipidique par leur liaison sous forme d'hétérodimère avec le Retinoid X Receptor (RXR).

PPAR α régule l'expression des gènes liés au métabolisme des acides gras. Il est exprimé dans les principaux types de cellulaires présents dans les lésions d'athérosclérose, tels que les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (**Figure 16**).

Pour étudier un éventuel rôle de PPAR α dans le métabolisme de cholestérol et le développement de l'athérosclérose, Nakaya *et al.* ont utilisé un agoniste spécifique du récepteur, le GW7647 (Nakaya *et al.*, 2011). Leurs résultats montrent que le traitement des souris sauvages avec le GW7647 augmente significativement les taux plasmatiques de HDL-C et d'apoA-I de 45% par rapport aux souris non traitées. Le RCT des macrophages vers les fèces chez les souris traitées avec le GW7647 est également significativement augmenté. De plus, ce traitement augmente l'expression d'ABCA1, ABCG1 et LXR α dans les macrophages issus de ces souris, suggérant que l'activation de PPAR α augmente l'efflux du cholestérol des macrophages, ce qui favorise à son tour le RCT *in vivo*. Dans la même étude les auteurs ont montré que l'activation de PPAR α par le GW7647 inhibe le développement de l'athérosclérose de 30% chez les souris LDLr^{-/-} x apobec^{-/-} (cf. chapitre I 3.2.11) surexprimant l'apoA-I humaine (Nakaya *et al.*, 2011).

Chez l'homme, dans une étude dose-réponse, il a été montré qu'un traitement avec un agoniste de PPAR α , le LY518674, diminue les taux plasmatiques de triglycérides (-41%) et augmente également les taux plasmatiques de HDL-C (+14,4%) et d'apoA-I mais seulement à de faibles doses (Nissen *et al.*, 2007). Un autre groupe a mesuré la production et le catabolisme des apolipoprotéines chez l'homme en utilisant des traceurs deutérés. Leurs résultats montrent qu'à de fortes doses, le LY518674 entraîne une augmentation significative de la production et du catabolisme de l'apoA-I et de l'apoA-II, qui se traduit par des taux plasmatiques d'apoA-I et de HDL-cholestérol inchangés (Millar *et al.*, 2009). L'augmentation du catabolisme de l'apoA-I pourrait être le reflet d'une augmentation du RCT mais ceci reste à démontrer. Cependant, un traitement avec le LY518674 est associé avec différents effets défavorables tels qu'une augmentation de la concentration en créatinine sérique et du LDL-C (+19,5%) (Nissen *et al.*, 2007). En utilisant un autre agoniste de PPAR α , le CP-778875, Terra *et al.* ont montré que ce composé augmente les taux de HDL-C de 14% et d'apoA-I de 13% et diminue la triglycéridémie de 26% chez des patients diabétiques avec une dyslipidémie athérogène. Ce composé a l'avantage de ne pas avoir d'effets défavorables sur les taux de créatinine sérique et de LDL-C (Terra *et al.*, 2008).

Les fibrates sont des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR α qui diminuent principalement les taux de triglycérides de 25 à 45% et augmentent les taux de HDL-C de 10 à 15%. Ils induisent également une diminution des taux de LDL-C de 10 à 20% (Hausenloy & Yellon, 2008).

Il a été observé qu'un traitement avec le Bezafibrate sur une durée de 5 ans chez des patients souffrant de dyslipidémie induit une diminution de la progression de l'athérosclérose qui peut être en partie attribuée à une augmentation de 9% des taux plasmatiques de HDL-C (Ericsson et al., 1996; Ruotolo et al., 1998).

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

Le **PPAR δ** est fortement exprimé dans le cerveau, le tissu adipeux, le foie et la peau. Il joue un rôle important dans le métabolisme des acides gras. Briand *et al.* ont montré que le traitement des souris sauvages avec un agoniste de PPAR δ , le GW0742, augmente les concentrations plasmatiques en cholestérol total, HDL-C et non HDL-C, ainsi que l'expression

hépatique d'ARNm de ABCG5. De plus, le RCT des macrophages vers les fèces est augmenté avec notamment une augmentation de l'excrétion fécale en stérols neutres de 103% mais pas d'acides biliaires. Cependant, aucune différence dans la captation hépatique en cholestérol n'a été trouvée, ce qui suggère que l'augmentation de RCT peut être due à une stimulation des sécrétions biliaires (**Figure 16**) (Briand et al., 2009). Graham *et al.* ont montré que le traitement des souris LDLr^{-/-} avec un agoniste de PPAR δ , le GW0742X, diminue le développement de l'athérosclérose de 50%. Cependant, ce traitement n'a aucun effet sur les taux de lipides plasmatiques. L'effet athéroprotecteur est associé à la diminution d'expression de MCP-1 et de molécule d'adhésion ICAM-1 au niveau des aortes des souris traitées, ainsi que des taux plasmatiques de MCP-1 (Graham, Mookherjee, Suckling, Palmer, & Patel, 2005).

Une étude clinique montre que le traitement des patients sains pendant deux semaines avec un agoniste de PPAR δ , le GW501516, augmente les taux plasmatiques de HDL-C (+ 17%) et diminue les taux plasmatiques de triglycérides (-23%) en comparaison avec le groupe placebo (Sprecher et al., 2007)(Olson, Pearce, Jones, & Sprecher, 2012).

Le **PPAR γ** est fortement exprimé dans le tissu adipeux où il joue un rôle dans la différenciation adipocytaire ; il est également exprimé dans les macrophages dans lesquels il régulerait entre autre l'absorption des lipides, favorisant ainsi la formation des cellules spumeuses (Nagy, Tontonoz, Alvarez, Chen, & Evans, 1998). Les agonistes de PPAR γ ont été développés pour le traitement du diabète de type 2. D'une façon intéressante, le traitement des souris sauvages avec un agoniste de PPAR γ diminue de 43% le RCT des macrophages vers les fèces (Toh et al., 2011). Le comptage de la radioactivité dans les tissus montre une augmentation de 2 fois du traceur ³H dans le tissu adipeux et une diminution de sa captation par le foie de 22%, ceci en associant une augmentation d'expression de SR-BI (ARNm et protéine) dans le tissu adipeux mais pas dans le foie. La présente étude montre que l'activation de PPAR γ avec un agoniste, GW7845, redirige l'efflux du cholestérol des macrophages vers le tissu adipeux par un mécanisme dépendant de SR-BI (Toh et al., 2011). De plus, le traitement des souris LDLr^{-/-} avec le GW7845 diminue le développement de l'athérosclérose de 60% en comparaison avec les souris non traitées (Li et al., 2000).

Chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré que le traitement des patients diabétiques avec des agonistes de PPAR γ , le Rosiglitazone ainsi que les Thiazolidinediones,

est associé à une augmentation significative du risque d'infarctus de myocarde et aux décès d'origine cardiovasculaire (Lipscombe et al., 2007; Nissen & Wolski, 2007).

L'essai clinique Pro-Active a montré un effet potentiellement bénéfique de l'agoniste de PPAR γ le "pioglitazone" sur l'athérogénèse par le biais de l'amélioration de certains facteurs de risque alors qu'une augmentation modérée du LDL cholestérol a été observée.

La pioglitazone (45 mg) a donc été administrée contre placebo à 5238 diabétiques de type 2 pendant une moyenne de 34,5 mois. Ils présentaient tous des complications de macroangiopathie (infarctus du myocarde (IDM) 47%, accident vasculaire cérébral (AVC) 19%, revascularisation coronarienne 31%, artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) symptomatique 20%). En analysant les événements majeurs pris en compte comme critère secondaire, il apparaît toutefois clairement que le pioglitazone d'une part diminue le risque relatif pour le critère combiné classique associant décès toute cause, IDM non fatal et AVC, et d'autre part augmente le risque relatif d'une insuffisance cardiaque. Cette étude a prouvée que la pioglitazone apporte un bénéfice sur le risque de complication cardiovasculaire ischémique mais au prix d'un surcroît de risque d'insuffisance cardiaque (Dormandy et al., 2005). Une autre étude incluant 462 patients durant 72 semaines a comparée l'effet, du pioglitazone et du glimépiride (antidiabétique), sur l'épaisseur de l'intima-média carotidienne. Les auteurs ont montré que le traitement avec le pioglitazone diminue la progression de l'épaisseur de l'intima-media carotidienne (Mazzone et al., 2006)

L'ensemble de ces résultats montre que les agonistes des PPARs (α et δ) constituent des approches thérapeutiques intéressantes pour augmenter les taux plasmatiques de HDL-C et réguler/stimuler le RCT dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Cependant, dans ce processus PPAR γ semble délétère. Des études complémentaires seront nécessaires pour tester la sécurité et l'efficacité de ces agonistes chez l'homme.

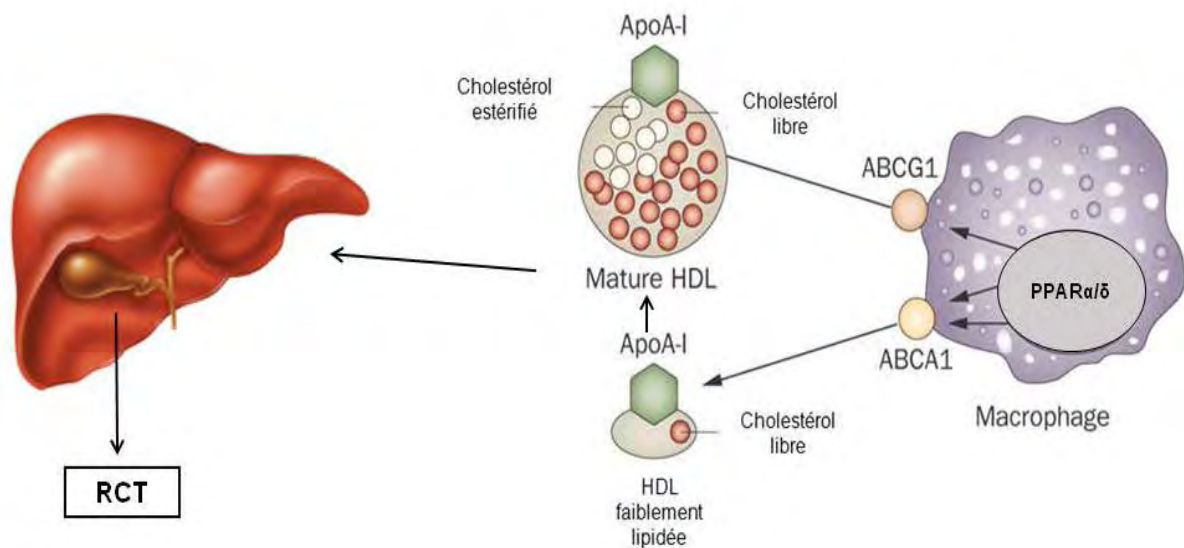


Figure 16. Effet de l'activation des récepteurs nucléaires PPAR α et δ . L'activation des PPAR α et PPAR δ par leurs agonistes respectifs induit l'expression de ABCA1 et ABCG1 au niveau des macrophages et stimule l'efflux du cholestérol et le RCT.

2.1.3-Agoniste de FXR (Farnesoid X Receptor)

FXR fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et régule une grande variété de gènes impliqués dans le contrôle de l'homéostasie des lipides et des acides biliaires. FXR est exprimé dans le foie, l'intestin et les reins (F. Y. Lee, Lee, Hubbert, Edwards, & Zhang, 2006).

Zhang *et al.* ont utilisé un agoniste synthétique de FXR, le GW4064, pour étudier son effet sur le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques et le RCT (Yanqiao Zhang et al., 2010). Leurs résultats montrent, que l'activation de FXR hépatique entraîne une diminution des taux plasmatiques en HDL-C *via* une augmentation d'expression hépatique de SR-BI chez les souris sauvages, cet effet est perdu chez les souris SR-BI^{-/-}. L'activation de FXR augmente le RCT des macrophages vers les fèces *via* une voie SR-BI dépendante, mais aussi par une voie SR-BI indépendante due à une augmentation d'expression hépatique d'ABCG5/G8. En effet, après l'injection des macrophages marqués avec du ³H-cholestérol on observe une diminution du traceur ³H dans le plasma et une augmentation d'excrétion des ³H-stérols totaux mais pas des ³H-acides biliaires dans les fèces (Yanqiao Zhang et al., 2010).

Le traitement des souris susceptibles à l'athérosclérose (LDLr^{-/-} et ApoE^{-/-}), sous un régime hypercholestérolémiant (0.2%cholestérol, 42% de gras), avec un agoniste de FXR, le WAY-362450, inhibe l'hypertryglycémie et augmente la concentration de non HDL-C en comparaison avec les souris non traitées. L'activation de FXR bloque le développement d'athérosclérose chez ces souris, et l'expression hépatique de Small Heterodimer Partner (SHP), un répresseur transcriptionnel, qui inhibe l'expression de CYP7A1 et CYP8B1 et diminue l'hydrophobicité des acides biliaires. Ce résultat suggère que, chez ces souris, l'activation de FXR protège contre le développement de l'athérosclérose et que cet effet protecteur est en corrélation avec l'inhibition des gènes impliqués dans la synthèse des acides biliaires (Hartman et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère que le FXR constitue une cible thérapeutique pour le traitement de l'hypercholestérolémie et de l'athérosclérose.

Gène cible	HDL-C	RCT	Athérosclérose	Référence
LXR	Augmentation	Augmentation	Diminution (apoE ^{-/-} , LDLr ^{-/-})	(Naik et al., 2006). (Calpe-Berdiel et al., 2008) (Joseph et al., 2002).
PPARα	Augmentation	Augmentation	Diminution (LDLr ^{-/-} x apobec ^{-/-})	(Nakaya et al., 2011).
PPARδ	Augmentation	Augmentation	Diminution (LDLr ^{-/-})	(Briand et al., 2009) Mookherjee, Suckling, Palmer, & Patel, 2005)
PPARγ	ND	Diminution	Diminution (LDLr ^{-/-})	(Li et al., 2000)(Toh et al., 2011)
FXR	Diminution	Augmentation	Diminution (apoE ^{-/-} , LDLr ^{-/-})	(Yanqiao Zhang et al., 2010)(Hartman et al., 2009)

Tableau.8. Effet de l'activation des récepteurs nucléaires sur les taux plasmatiques de HDL-C, le RCT et le développement de l'athérosclérose.

2.1.4-Agoniste du récepteur P2Y₁₃

Le cangrelor est un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂, il bloque l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP (Ingall et al., 1999), Il est utilisé en clinique comme un agent anti-thrombotique (Storey, Oldroyd, & Wilcox, 2001). Notre équipe a montré que le cangrelor, agit en tant qu'agoniste partiel du récepteur P2Y₁₃, en stimulant l'endocytose des HDL par les cellules HepG₂ et par le foie perfusé de souris sauvages (Jacquet et al., 2005) et que cet effet est absent chez les souris invalidées pour le récepteur P2Y₁₃ (Fabre et al., 2010). Quatre heures après une simple injection du cangrelor en bolus, aucun effet n'a été observé au niveau des taux de lipoprotéines plasmatiques. Nous avons montré que le cangrelor, induit une augmentation de la capture hépatique des HDL et une augmentation du flux et des sécrétions biliaires en cholestérol, phospholipides et acides biliaires d'une façon similaire chez les souris sauvages et les souris SR-BI KO^{Liver} (Fabre et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc qu'une activation du récepteur P2Y₁₃ pourrait induire une stimulation du RCT.

Au vue de ces résultats, il nous a semblé pertinent d'étudier l'effet d'un traitement avec le cangrelor sur plusieurs jours sur le profil des lipoprotéines plasmatiques et le catabolisme hépatique des HDL. Du fait du temps de demi-vie très court du cangrelor ($t_{1/2} < 9$ min chez l'homme) (Storey et al., 2001), nous avons placé en sous cutané des pompes osmotiques (alzet[®]), permettant de diffuser la molécule de façon continue tout au long de l'expérience. Cette étude fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse, dont les résultats sont présentés dans le chapitre III et la publication 2.

2.2- Antagonistes

2.2.1-Antagoniste de miR-33

Le gène SREBP2 qui joue un rôle dans la synthèse et la régulation de la captation de cholestérol, exprime à l'intérieur de l'intron 16 une séquence fortement conservée qui code pour un micro RNA, le miR-33 (**Figure 16**) (K. J. Moore, Rayner, Suárez, & Fernández-Hernando, 2010). miR-33 inhibe, par répression transcriptionnelle, l'expression de nombreux gènes impliqués dans le trafic intra-cellulaire de cholestérol. ABCA1 possède 3 sites de liaison pour le miR-33 l'expression de ABCA1 (ARNm et protéine) est fortement réprimée par

la surexpression de miR-33. Contrairement à l'homme, chez la souris, le miR-33 réprime également l'expression de ABCG1, avec comme conséquence une réduction de l'efflux de cholestérol vers les HDL (**Figure 17**) (K. J. Rayner et al., 2010).

Pour étudier l'impact de l'inhibition de miR-33 sur le métabolisme du cholestérol et le RCT ainsi que sur le développement de l'athérosclérose, Rayner et *al.* ont injecté, en sous-cutané ou en intra-péritonéal, un oligonucléotide anti-sens dirigé contre le miR-33 aux souris LDLr^{-/-} sous régime hypercholestérolémiant. Leur étude montre que l'inhibition de miR-33 augmente l'expression hépatique de ABCA1 et ABCG1 (ARNm et protéine), ce qui se traduit par une augmentation du taux plasmatique de HDL-C de 35% et une augmentation de la fraction CE dans les HDL des souris traitées. Aucune différence n'a été trouvée dans les concentrations plasmatiques en cholestérol total et LDL-C. Le RCT des macrophages (³H-cholestérol) vers les fèces, montre une augmentation de traceur ³H dans le plasma, le foie et les fèces de respectivement 40, 42 et 82% (K. Rayner & Sheedy, 2011). Allen *et al.* ont montré qu'une inhibition de miR-33, après l'injection en intra-veineuse d'un oligonucléotide anti-sens dirigé contre le miR-33, augmente le flux et les sécrétions de lipides biliaires (phospholipides, cholestérol et acides biliaires). Cet effet est associé à une augmentation de l'expression d'ARNm de ABCB11 (Allen et al., 2012). Ces résultats montrent que l'inhibition de miR-33, stimule l'expression de transporteurs biliaires. Consécutivement à ces effets métaboliques, l'inhibition de miR-33 entraîne une diminution de la plaque d'athérosclérose de 35% dans la crosse aortique ainsi qu'une diminution de l'expression de CD36 (-35%) et une augmentation d'expression de ABCA1 (+66%) dans les macrophages (K. Rayner & Sheedy, 2011).

Une autre étude réalisée sur des singes montre qu'un traitement pendant 12 semaines avec un oligonucléotide dirigé contre le miR-33 induit une augmentation des taux plasmatiques de HDL-C (+50%) et une diminution des triglycérides plasmatiques (-50%) associée à une diminution de VLDL-C. L'augmentation de HDL-C est associée à une augmentation des concentrations plasmatiques d'apoA-I et d'apoA-II. De plus, ce traitement augmente l'expression de ABCA1 hépatique (ARNm et protéine), et l'efflux de ³H-cholestérol, *in vitro*, des macrophages vers les HDL issues des singes traités (K. Rayner, Esau, & Hussain, 2011). Ces données montrent pour la première fois, sur un modèle très proche de l'homme, que l'inhibition pharmacologique de miR-33 peut être une stratégie thérapeutique

prometteuse dans le traitement des dyslipidémies qui augmentent le risque de maladie cardio-vasculaire.

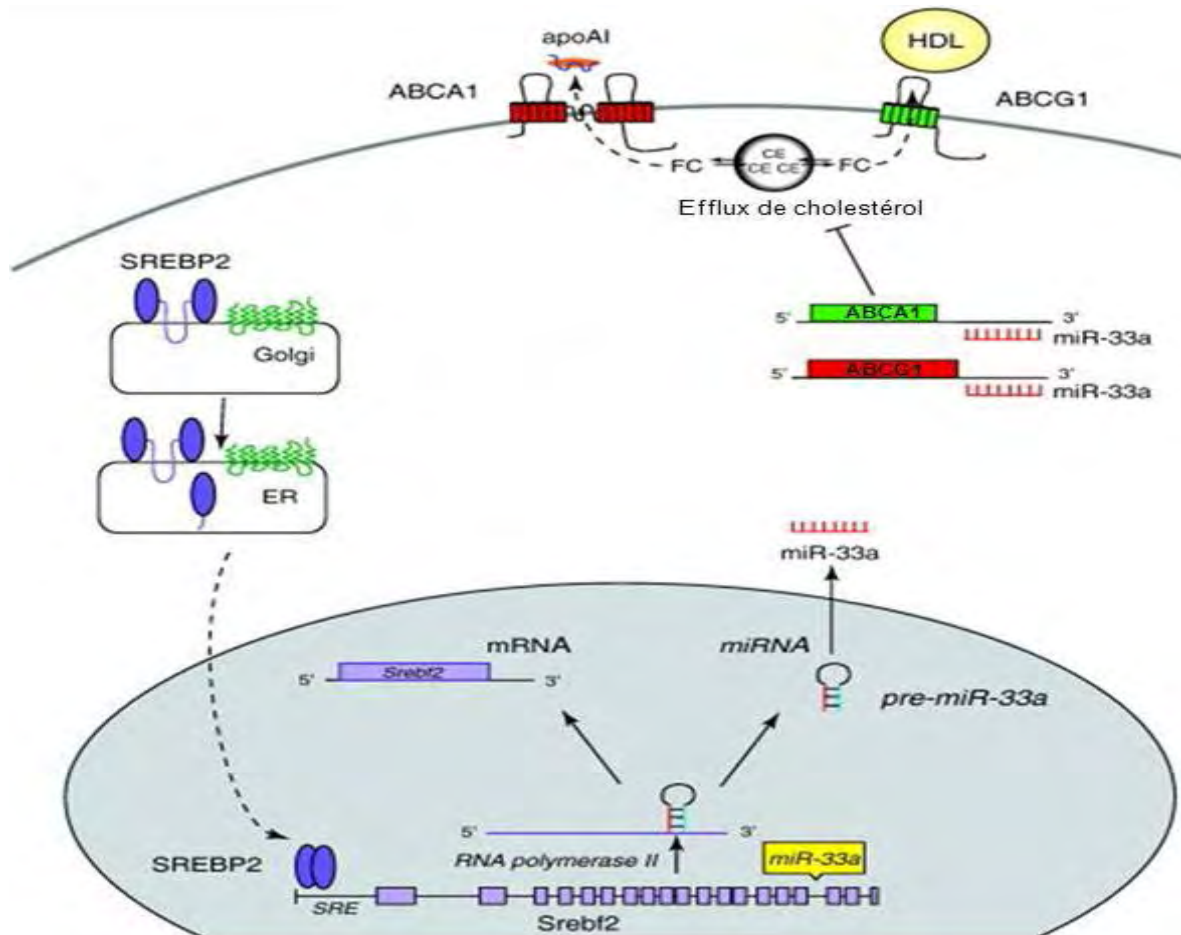


Figure 17. Transcription et mécanisme d'action de miR-33. SREBP2 agit comme un facteur de transcription permettant la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme des stérols, y compris SREBP2 lui-même. miR-33a est situé à l'intérieur de l'intron 16 de SREBP2, et est co-transcrit avec la transcription de SREBP2. miR-33a mature peut se fixer sur la 3'UTR de ses gènes cibles, tels que ABCA1 et ABCG1, et réprimer leur expression. Il en résulte une réduction de l'efflux de cholestérol vers l'apoA-I et les HDL. D'après (K. J. Moore et al., 2010).

2.2.2-Niacine ou acide nicotinique

La Niacine est le plus ancien agent pharmacologique utilisé actuellement en thérapeutique responsable des effets favorables sur les profils lipidiques. En effet, le

traitement des patients avec la Niacine augmente fortement les taux plasmatiques en lipoprotéines anti-athérogènes (+35% pour le HDL-C) et diminue les taux plasmatiques en lipoprotéines athérogènes à apoB (-20% pour les LDL) et des triglycérides (-40-50%). Les données les plus irréfutables supportant l'utilisation de la Niacine proviennent de l'étude "Coronary Drug Project" dans laquelle sont évalués ses effets en monothérapie sur 8341 hommes ayant déjà eu un infarctus du myocarde. Après 15 ans de suivi, il a été montré que ce traitement est associée avec une diminution de 11% de la mortalité (toutes causes de mortalité prises en compte)(Canner et al., 1986). Malgré son efficacité clinique et ses effets bénéfiques sur les modifications des profils lipoprotéiques, son utilisation est limitée due à son effet secondaire majeur de flush cutané. Des efforts pour diminuer cet effet secondaire ont conduit à une nouvelle préparation de la Niacine : le Niaspan qui correspond à une reformulation de la Niacine à libération prolongée et qui cause moins de flush (-40%) que les autres formulations (Cefali, Simmons, Stanek, & Shamp, 2006).

L'effet de la Niacine sur les concentrations plasmatiques en HDL-C reste peu clair. En effet, Zhang *et al.* ont montré sur des cellules HepG₂ en culture (Cellules d'hépatocarcinome humain) que la Niacine induit une diminution de l'expression de la chaîne β de l'ATP synthase à la surface cellulaire de (-27%), avec comme conséquence une diminution de la capture des HDL (-35%) (**Figure 18**) (L.-H. Zhang, Kamanna, Zhang, & Kashyap, 2008). Cependant, cet effet sur l'expression de la chaîne β de l'ATP synthase reste à démontrer *in vivo*.

Dans une autre étude, Lukasova et al. ont montré que le traitement des souris LDLr^{-/-} sous régime hypercholestérolémiant (1,25% de cholestérol), avec de la niacine induit une diminution de la progression d'athérosclérose (-25%), alors que cet effet est absent chez les souris invalidées pour le récepteur GPR109A (GPR109A^{-/-}) (le récepteur de l'acide nicotinique). Cette diminution était pas associée à une variation des taux plasmatiques en cholestérol total et en HDL-C, (Lukasova, Malaval, Gille, Kero, & Offermanns, 2011). Dans la même étude, les auteurs ont montré qu'après un transfert de moelle osseuse issue des souris GPR109A^{-/-} à des souris LDLr^{-/-}, aucun effet de l'acide nicotinique sur l'inhibition de l'athérosclérose n'est observé. De plus, l'efflux de ³H-cholestérol, *in vitro*, des macrophages issus de souris GPR109A^{-/-} vers le milieu est diminuée. L'activation du récepteur GPR109A par l'acide nicotinique dans les cellules et *in vivo* diminue l'expression de MCP-1 et le recrutement des macrophages au niveau de la plaque d'athérosclérose (Lukasova et al.,

2011). Ces résultats montrent, que l'un des plus anciens médicaments utilisés pour prévenir et traiter l'athérosclérose, peut exercer des effets anti-athérogène par un mécanisme anti-inflammatoire indépendant de son effet connu chez l'homme sur les taux plasmatiques en lipoprotéines.

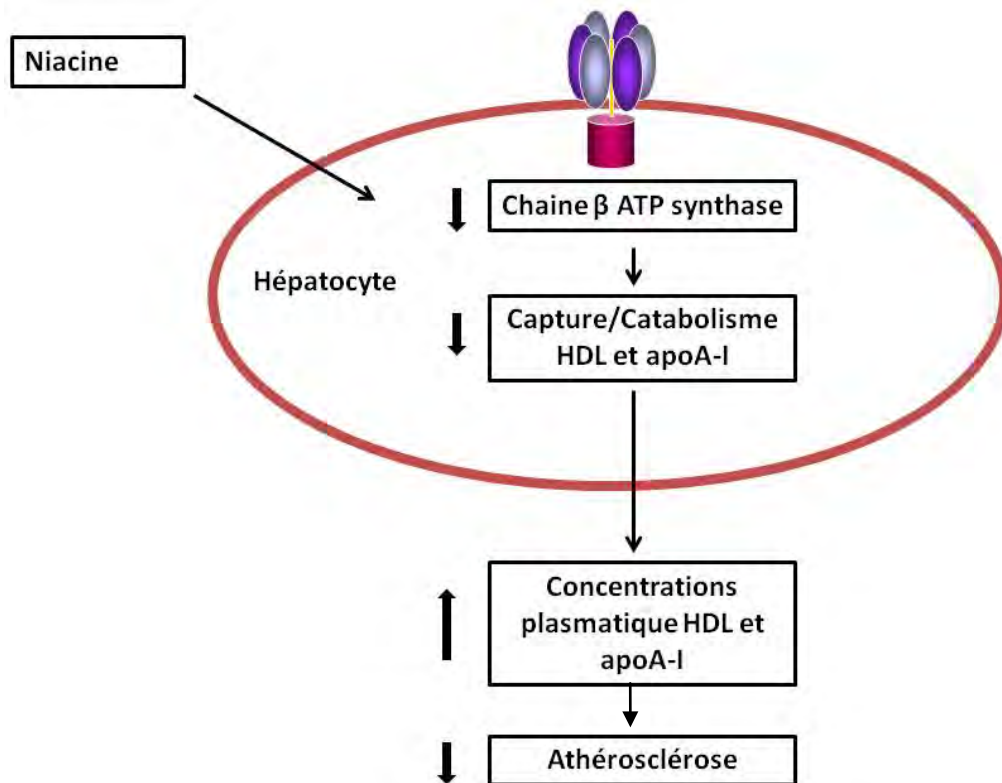


Figure 18. Mode d'action de la niacine sur le métabolisme hépatique des HDL. La niacine, en inhibant l'expression de la chaîne β de l'ATP synthase à la surface des hépatocytes, diminue le catabolisme hépatique des HDL et de l'apoA-I et augmente leurs concentrations plasmatiques, en diminuant ainsi le développement de l'athérosclérose. D'après (Kamanna & Kashyap, 2008)

2.2.3-Inhibiteur de CETP

La CETP est une protéine plasmatique qui assure le transfert de cholestérol ester des particules HDL vers les lipoprotéines contenant l'apoB (LDL et VLDL) en échange de triglycérides (cf. chapitre I 3.2.2.2). L'intérêt pour l'inhibition de la CETP a débuté après la découverte en 1990 d'individus japonais avec des taux très élevés de HDL-cholestérol associés à une déficience génétique pour la CETP (Inazu et al., 1990). Cette déficience a

conduit à l'hypothèse qu'une inhibition pharmacologique de la CETP pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique pour augmenter les taux de HDL-C. Bien que les effets de la déficience en CETP sur les risques cardiovasculaires ne soient pas très clairs (augmentation du RCT et de l'athérosclérose) (cf. chapitre I 3.2.2.2), la CETP a attiré l'intérêt des laboratoires pharmaceutiques qui ont développé des composés pharmacologiques susceptibles de l'inhiber dans l'objectif d'augmenter les taux plasmatiques de HDL-C. À ce jour, quatre inhibiteurs ont atteint le stade de développement clinique: le Torcetrapib (Pfizer), l'Anacetrapib (Merck), l'Evacetrapib (Eli Lilly & compagny) et le Dalcetrapib (Roche).

2.2.4.1-Torcetrapib

Une étude chez le lapin (animal possédant la CETP) montre que le traitement avec le Torcetrapib augmente les concentrations plasmatiques en HDL-C d'un facteur 3 et induit une réduction de développement de l'athérosclérose de 60% (Morehouse et al., 2007).

Le Torcetrapib était le premier inhibiteur à atteindre la phase clinique stade III. Chez l'homme, le traitement avec le Torcetrapib est associé à une augmentation des concentrations plasmatiques de HDL-C allant de 16 à 91% en fonction de la dose administrée et une diminution de LDL-C entre 21 et 42%. Ces changements sont accompagnés d'une inhibition de 35% de l'activité de la CETP (Clark et al., 2004). Dans une étude, conduite sur plus de 15000 patients à haut risque cardiovasculaire, la combinaison thérapeutique Torcetrapib avec Atorvastatine sur 12 mois induit une augmentation des taux de HDL-C (+70%) et une diminution des taux de LDL-C (-25%). Malgré ces effets bénéfiques sur le profil lipidique, le développement du Torcetrapib a été arrêté en fin 2006 en Phase III de l'étude ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact IN ATtherosclerosis Events) en raison d'une augmentation de la mortalité toutes causes confondues (événements cardiovasculaires, cancers, infections...) en comparaison avec le groupe traité seulement avec l'Atorvastatine (Barter et al., 2007). Postérieurement, cet échec clinique a été en partie attribué aux effets secondaires de la molécule, avec notamment une augmentation de la pression artérielle (Forrest et al., 2008) et des taux d'aldostérone et de cortisol (Hu et al., 2009). En conséquence, ces observations n'excluent pas que d'autres inhibiteurs de la CETP, s'ils n'ont pas ces toxicités hors cible pourraient réussir à ralentir la progression de l'athérosclérose.

2.2.4.2-Anacetrapib

Dans une étude clinique réalisée sur 1623 patients ayant eu un événement coronarien ou à haut risque coronarien, Cannon *et al.* ont montré que la combinaison thérapeutique de Anacetrapib avec les statines présente des effets bénéfiques sur le profil lipoprotéique. Le traitement avec l'Anacetrapib induit une augmentation des taux de HDL-C (+139%) et une diminution des taux de LDL-C (-36%), 24 semaines après le traitement. Contrairement au Torcetrapib, ce traitement est toléré par tous les patients et n'est pas associé avec une augmentation des taux plasmatiques en corticostérone, aldostérone et ni avec une augmentation de la pression artérielle (Cannon et al., 2010).

Des études cliniques en phase III sont en cours afin de déterminer si une modification des lipides plasmatiques, associée à un traitement avec l'Anacetrapib, réduit le risque de décès d'origine coronarienne, l'infarctus du myocarde ou revascularisation coronaire (collectivement connus sous le nom d'événements coronariens majeurs), chez les patients sous statines, essais REVEAL. La fin de l'essai et la publication des résultats sont prévues pour janvier 2017.

2.2.4.3-Evacetrapib

Plus récemment, un nouvel inhibiteur de la CETP a été développé par, Eli Lilly & Company : il s'agit de l'Evacetrapib. Il possède des propriétés structurales très proches de l'Anacetrapib et il affiche des résultats très prometteurs en clinique. En effet, dans une étude de phase I, il a été observé chez des sujets dyslipidémiques, après un traitement de 12 semaines avec l'Evacetrapib en monothérapie, une augmentation des taux de HDL-C (+128%) et une diminution des taux de LDL-C (-36%). Lorsque ce traitement est combiné avec une statine, on observe une augmentation des taux de HDL-C (+80%) et une diminution des taux de LDL-C (-12%). De plus, à une dose journalière de 500 mg, l'Evacetrapib diminue les taux de TG plasmatiques. Comme pour le traitement avec l'Anacetrapib, l'Evacetrapib n'entraîne aucune modification de la pression artérielle ni des taux d'aldostérones (Nicholls et al., 2011). Alors que l'Anacetrapib et l'Evacetrapib ont fourni des résultats cliniques encourageants, des études complémentaires demeurent nécessaires pour mieux comprendre l'effet de ces inhibiteurs sur les sous-classes de HDL et de leur composition, et en particulier sur la fonctionnalité des HDL.

L'Evacetrapib fait actuellement l'objet d'une étude clinique phase III, qui consiste à évaluer l'efficacité et la sécurité de ce médicament chez les patients à haut risque vasculaire (étude ACCELERATE), la fin de l'essai est prévue pour septembre 2015.

2.2.4.4-Dalcetrapib

Dans une étude regroupant 198 patients avec une légère hyperlipidémie, un traitement de 4 semaines avec des doses entre 300 et 900 mg de Dalcetrapib induit une augmentation des taux de HDL-C (+34%) et une diminution des taux de LDL-C (-7%). De plus, cette étude a également montré la bonne tolérance de ce composé (De Grooth et al., 2002). Dans une autre étude sur des patients dyslipidémiques, Kuivenhoven *et al.* ont montré que la combinaison thérapeutique sur 4 semaines de Dalcetrapib avec la Pravastatin augmente les taux de HDL-C (+28%) et diminue les taux de LDL-C (-5%) (J. A. Kuivenhoven et al., 2005).

Afin de déterminer si l'amélioration du profil lipidique induite par le Dalcetrapib se traduit par une réduction du risque cardiovasculaire, des études cliniques ont été menées. Par exemple, l'essai dal-OUTCOMES est une étude de phase III dans laquelle 15600 patients, ayant eu un événement coronarien aigu, ont été traités avec le Dalcetrapib pendant 12 semaines. Au cours de l'étude, les événements cardiovasculaires ont été recensés, tels que la mort liée aux événements cardiovasculaires, l'infarctus aigu du myocarde, l'angor instable nécessitant une hospitalisation, l'arrêt cardiaque ou AVC. Cependant, l'augmentation des taux de HDL plasmatiques n'est pas associée à une diminution des risques d'événements cardiovasculaires chez les patients traités avec le Dalcetrapib. De ce fait en mai 2012, les laboratoires Roche ont annoncé qu'ils mettaient fin à l'essai dal-OUTCOMES 2 ans avant la fin prévue de l'essai par cause d'absence de résultats significatifs et pas par question de sécurité (Goldberg & Hegele, 2012).

2.3- Approches thérapeutiques utilisant l'apoA-I

2.3.1-Infusion d'apoA-I Milano

L'apoA-I Milano (apoA-IM) est une forme mutante de l'apoA-I caractérisée par la substitution d'une arginine en position 173 par une cystéine. Cette mutation a été découverte dans un petit village d'Italie du nord chez trois membres d'une famille qui présentaient des taux de HDL-C et d'apoA-I très bas et un taux plasmatique de triglycérides élevé. Remarquablement, malgré ce profil lipidique d'apparence athérogène, aucun membre porteur de cette mutation ne souffre de maladie cardiovasculaire (Weisgraber & Bersot, 1980). La substitution de l'arginine par la cystéine induit une altération des propriétés fonctionnelles de l'apoA-I, qui conduit à la formation de dimères liés par un pont disulfure avec une autre apoA-IM (apoA-IM/apoA-IM) ou avec l'apoA-II (apoA-IM/apoA-II) (Weisgraber & Bersot, 1980). Le catabolisme de l'apoA-IM est très rapide comparé avec l'apoA-I normale, ce qui explique les taux anormalement bas en HDL-C et apoA-I chez les porteurs de cette mutation (Calabresi et al., 2001)(Roma, Gregg, & Meng, 1993).

Différentes études ont été réalisées chez la souris pour mieux comprendre le rôle de cette apoA-IM dans le RCT et le développement de l'athérosclérose. Alexander *et al.* ont observé que l'injection d'adénovirus exprimant l'apoA-IM à des souris apoA-I^{-/-} n'a aucun effet sur le RCT des macrophages vers les fèces en comparaison avec les mêmes souris injectées avec un adénovirus exprimant l'apoA-I humaine sauvage. Cependant, ils ont observé que l'apoA-IM réduit la capacité de LCAT à estérifier le cholestérol, ce qui entraîne une diminution des taux plasmatiques en cholestérol estérifié et une augmentation de cholestérol libre. De plus, ces variations ne se traduisent pas par une diminution de la captation sélective du cholestérol radiomarqué par le foie *via* par SR-BI et son excrétion par les fèces (Alexander et al., 2009). Ces résultats montrent que l'apoA-IM a la même capacité à promouvoir le RCT que l'apoA-I sauvage et que l'effet athéroprotecteur de l'apoA-IM est probablement indépendant du RCT

Shah *et al.* ont observé que des injections intraveineuses répétées d'apoA-IM complexée avec la phosphatidylcholine préviennent la progression de l'athérosclérose malgré une hypercholestérolémie sévère chez les souris apoE^{-/-} placées sous régime hypercholestérolémiant. Ce traitement est associé à une modification de la composition de

la plaque, avec notamment une diminution du contenu en lipides (-40%) et en macrophages (-46%). Ainsi, ces résultats montrent que l'apoA-IM associée à des phospholipides pourrait inhiber et/ou stabiliser la progression de la plaque d'athérosclérose (Shah et al., 1998). Quelques années plus tard, la même équipe a démontré que la simple injection d'une forte dose d'apoA-IM recombinante complexée avec du dipalmitoylphosphatidylcholine (DMPC) à des souris apoE^{-/-} induit une mobilisation rapide du cholestérol tissulaire qui se traduit par une augmentation des taux plasmatiques en cholestérol total, libre et estérifié. De plus ils ont observé, 48h après l'injection, une diminution du contenu en lipides (-40%) et en macrophages (-36%) au niveau de la plaque (Shah et al., 2001). Ces résultats suggèrent que cette stratégie pourrait modifier rapidement la composition de la plaque vers un phénotype plus stable.

Une étude chez l'homme a permis d'évaluer l'impact de l'ETC-216, un composé mimétique des préβ-HDL constitué de l'apoA-IM recombinante associée à de la phosphatidylcholine, sur le volume des plaques d'athérome chez des patients souffrant de syndrome coronarien aigu. Un traitement de cinq semaines par perfusion hebdomadaire d'ETC-216 dans les deux semaines suivant le syndrome coronarien aigu induit une réduction du volume de la plaque d'athérome (-4%), par rapport au volume initial. Inversement, les plaques des patients traités par placebo ont augmenté de taille (Nissen et al., 2003). Cependant, cette étude a été menée sur une population réduite, des essais cliniques complémentaires incluant plus de patients avec des incidences des accidents vasculaires et avec des durées de traitement plus long doivent être réalisés pour confirmer ces résultats prometteurs.

2.3.2-Peptides mimétiques d'apoA-I

L'apoA-I est une protéine constituée de 243 acides aminés arrangés en 10 hélices α-amphipathiques, dont la plupart sont séparées par un résidu proline. En raison de sa rapide dégradation, l'apoA-I nécessite une administration par voie intra-veineuse. En conséquence, une approche thérapeutique a consisté à synthétiser de petits peptides mimétiques, sans perdre la liaison aux lipides et les capacités anti-athérogène de la protéine sauvage. La recherche de ce type de composés a conduit à la synthèse de peptides de dix-huit acides

aminés appelés 18A. La séquence de ces peptides ne présente aucune homologie avec celle de l'apoA-I mais ils gardent la capacité à former des hélices de classe A amphipathiques qui miment la liaison de l'apoA-I aux lipides. De nombreux peptides de dix-huit acides aminés ont été synthétisés et diffèrent par le nombre ainsi que par la position sur la face non polaire des résidus dephénylalanine (F) qui permettent d'augmenter l'hydrophobicité et l'efficacité de liaison aux lipides (Spuhler, Anantharamaiah, Segrest, & Seelig, 1994).

Les premières études *in vivo* portant sur les effets des peptides mimétiques d'apoA-I ont été réalisées par Garber *et al.* Dans cette étude, les auteurs ont observé que l'administration quotidienne du peptide 5F par voie intra-péritonéale, pendant 16 semaines, à des souris sauvages placées sous un régime hypercholestérolémiant induit une diminution du développement des lésions d'athérosclérose de 44% en comparaison avec les souris non traitées, sans aucune modification majeure des profils des lipoprotéines plasmatiques. Cependant, les HDL isolées de souris traitées avec le peptide 5F, contrairement aux HDL des souris non traitées, ont une meilleure capacité d'inhiber l'oxydation des LDL et de réduire le chimiotactisme des monocytes induit par les LDL dans une co-culture de cellules de la paroi artérielle (Garber *et al.*, 2001). L'administration de peptides 5F semble donc améliorer la fonctionnalité des HDL avec comme effet une diminution de développement de l'athérosclérose.

Le peptide D-4F a également sollicité beaucoup d'intérêt du fait que ce peptide peut être administré oralement soit par gavage soit dans l'eau de boisson. Ce mode d'administration est dû à leur forte résistance à la dégradation par les protéases gastro-intestinales (M. Navab, 2002). L'administration orale du peptide D-4F à des souris apoE^{-/-} stimule la formation de préβ-HDL enrichies en apoA-I, ainsi que stimule l'activité de la paraoxonase anti-inflammatoire associée aux HDL ce qui améliore les propriétés anti-inflammatoires des HDL. De plus, ce traitement stimule le RCT des macrophages marqués avec du ³H-cholestérol vers les fèces, que l'on observe par augmentation de traceur ³H dans le plasma, le foie et les fèces en comparaison avec les souris non traitées (Mohamad Navab *et al.*, 2004). Dans une autre étude les mêmes auteurs ont montré que l'administration de D-4F à des souris LDLr^{-/-} et apoE^{-/-} réduit le développement des lésions d'athérosclérose de 79% par rapport aux souris non traitées, sans aucune modification des profils de lipoprotéines plasmatiques. En plus de l'effet sur le RCT, le peptide D-4F semble favoriser les propriétés anti-inflammatoire

des HDL et leur capacité à inhiber le chimiotactisme des monocytes induit par les LDL (M. Navab, 2002).

Un essai clinique chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires a montré la tolérance et la biodisponibilité du D-4F chez l'homme. Après une simple dose administrée par voie orale, les HDL isolées des patients traités ont une meilleure activité anti-inflammatoire. Cependant, 24h après l'administration de ce peptide, aucune différence dans les taux plasmatiques en HDL et apoA-I n'est observée en comparaison avec le groupe placebo (Bloedon et al., 2008). Cette étude est donc encourageante pour entreprendre des études avec des différentes doses à des peptides mimétiques de l'apoA-I pour améliorer la fonction des HDL.

2.3.3-Infusion des HDL reconstituées (rHDL)

Le taux de HDL-C est inversement corrélé au risque de développement de l'athérosclérose ; de ce fait, l'infusion des HDL recombinantes peut être une bonne stratégie pour augmenter les taux des HDL circulantes.

Chez la souris, l'infusion de l'apoA-I Milano recombinante mobilise rapidement le cholestérol et diminue le développement de la plaque (cf. chapitre II 2.3.2). Une autre étude réalisée chez la souris, montre que la simple injection de CSL-111, constitué de apoA-I humaine associée à de la phosphatidylcholine de soja, induit une augmentation des taux d'apoA-I humaine, de pré β -HDL, de cholestérol total ainsi que des TG. L'analyse des profils lipoprotéiques montre une augmentation de la taille de toutes les classes de lipoprotéines y compris les HDL endogènes qui deviennent plus larges et plus riches en cholestérol. De plus, CSL-111 augmente l'efflux de cholestérol cellulaire *in vitro* vers le plasma chez des souris traitées en comparaison avec les souris non traitées (Chen et al., 2012). Ces résultats suggèrent que, le CSL-111 induit un remodelage plasmatique des lipoprotéines facilitant l'efflux du cholestérol vers les lipoprotéines acceptrices du cholestérol libre des tissus périphériques. Chez l'homme, un essai clinique en phase II, « The Effect of rHDL on Atherosclerosis–Safety and efficacy » (ERASE), a été réalisé en utilisant le CSL-111. L'infusion de CSL-111, 4 fois par semaines pendant 4 semaines, à des patients souffrant du syndrome coronarien aigu, induit une diminution non significative du volume de la plaque de 3.4% en comparaison avec le groupe placebo (Tardif et al., 2007). Des études complémentaires sont nécessaires avec en particulier : l'évaluation de la biodisponibilité (temps de demi-vie) de la

molécule injectée, des durées de traitement et des fréquences d'injection plus importantes seront nécessaires.

Dans une autre étude réalisée sur 28 patients souffrant du syndrome coronarien aigu, les auteurs ont réalisé 7 infusions hebdomadaires pendant 2 semaines de HDL provenant des patients eux-mêmes après leur délipidation par la technique d'aphérèse couplée à un appareil permettant la délipidation des HDL plasmatiques. Cette technique consiste à séparer le plasma du sang par la circulation extra-corporelle, par la suite les HDL du plasma sont délipidées et réinjectées aux patients. La délipidation des HDL convertit les α -HDL en pré β -HDL, une forme de HDL qui permet une élimination plus efficace du cholestérol des tissus. Cette reperfusion de plasma a été tolérée par tous les patients, mais le résultat montre une diminution non significative du volume de la plaque d'athérome (Waksman et al., 2010). L'augmentation des taux de pré β -HDL par l'infusion des composés qui miment les effets des pré β -HDL diminue le développement de l'athérosclérose chez des patients coronariens (cf. chapitre II 2 .3.1) (Nissen et al., 2003). De ce fait, cette thérapie peut offrir une nouvelle approche pour le traitement des patients ayant un syndrome coronarien aigu. Des études plus approfondies seront nécessaires pour déterminer la capacité de cette technique à réduire les risques cardiovasculaires. Des études plus approfondies seront nécessaires pour déterminer la capacité de cette technique à réduire les risques cardiovasculaires. Les divergences entre ces deux études peuvent être du: i) à la différence du nombre de patients, 28 pour l'étude de Waksman et al. contre 123 pour l'étude de Nissen et al. ii) La durée de traitement, 2 semaines pour l'étude de Waksman contre 5 semaines pour l'étude de Nissen. iii) La différence de techniques utilisées, des pré β -HDL délipidées contre de l'apoA-IM recombinante. Il serait donc intéressant tout d'abord de s'assurer que la délipidation "forcé" des HDL ne modifie pas leurs propriétés anti-athérogène et d'autre part refaire les deux études dans des conditions comparables avec des durées de traitements plus longues et un nombre de patient plus important.

Chapitre III
RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Résultats expérimentaux

1.1- Le rôle physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans le transport retour du cholestérol

1.1.1- Introduction

Le récepteur P2Y₁₃ est un élément clé de la voie d'endocytose hépatique des holoparticules HDL ou holo-HDL (protéines + lipides). Dans cette voie l'apoA-I, protéine majoritaire des HDL, se lie à la surface des hépatocytes à un complexe enzymatique similaire à la F₁-ATPase mitochondriale (appelé ecto-F₁-ATPase) pour activer l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en ADP. L'ADP extracellulaire ainsi généré active spécifiquement le récepteur purinergique P2Y₁₃ pour *in fine* stimuler l'endocytose des holo-HDL *via* un récepteur de basse affinité, différent du récepteur SR-BI et dont l'identité reste à ce jour inconnue (Laurent O Martinez et al., 2003)(Jacquet et al., 2005). Afin d'évaluer l'implication du récepteur P2Y₁₃ dans le métabolisme des HDL *in vivo*, des souris invalidées pour ce récepteur ont été générées dans les équipes du professeur B. Robaye et JM. Boyenaems (Université libre de Bruxelles), ce qui a marqué le début de notre collaboration. La fonction du récepteur P2Y₁₃ a pu également être étudiée par l'utilisation d'un agoniste partiel du récepteur P2Y₁₃, l'AR-C69931MX, également connu sous le nom cangrelor. Il a été précédemment décrit qu'un traitement au cangrelor agissait spécifiquement sur le récepteur P2Y₁₃ en stimulant l'endocytose des HDL sur des hépatocytes humains ainsi que *in situ* sur des foies de souris perfusés (Jacquet et al., 2005).

Au cours de ce travail, nous avons d'abord observé que des souris déficientes (knockout, KO) pour le récepteur P2Y₁₃ (P2Y₁₃ KO ou P2Y₁₃^{-/-}) présentent une diminution de la captation hépatique des HDL radiomarqué sur leur composante protéique (marquage ¹²⁵I) et ainsi que des sécrétions de lipides biliaires. Ces changements s'accompagnent d'une forte diminution du RCT des macrophages vers les fèces. A l'inverse, l'injection en bolus de cangrelor, stimule la captation hépatique et les sécrétions de lipides biliaires (cholestérol, phospholipides et acides biliaires) chez des souris sauvages (WT) et des souris spécifiquement invalidées pour SR-BI dans le foie (SR-BI KO^{Liver}) mais pas chez les souris P2Y₁₃ KO. L'ensemble de ces résultats révèle pour la première fois l'implication physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans

l'endocytose hépatique des HDL et le transport retour du cholestérol, indépendamment de la voie de captation sélective du cholestérol estérifié médiée par SR-BI.

Ma contribution dans ce travail a été la réalisation et l'interprétation des mesures de captation hépatique des HDL sur foies perfusés, chez les souris P2Y₁₃ KO, SR-BI KO^{Liver} et les souris sauvages, traitées ou non par le cangrelor (cf figure 2c de l'article 1).

P2Y₁₃ Receptor is Critical for Reverse Cholesterol Transport

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

A major atheroprotective functionality of high-density lipoproteins (HDLs) is to promote “reverse cholesterol transport” (RCT). In this process, HDLs mediate the efflux and transport of cholesterol from peripheral cells and its subsequent transport to the liver for further metabolism and biliary excretion. We have previously demonstrated in cultured hepatocytes that P2Y₁₃ (purinergic receptor P2Y, G protein-coupled, 13) activation is essential for HDL uptake but the potential of P2Y₁₃ as a target to promote RCT has not been documented. Here, we show that P2Y₁₃-deficient mice exhibited a decrease in hepatic HDL cholesterol uptake, hepatic cholesterol content, and biliary cholesterol output, although their plasma HDL and other lipid levels were normal. These changes translated into a substantial decrease in the rate of macrophage-to-feces RCT. Therefore, hallmark features of RCT are impaired in P2Y₁₃-deficient mice. Furthermore, cangrelor, a partial agonist of P2Y₁₃, stimulated hepatic HDL uptake and biliary lipid secretions in normal mice and in mice with a targeted deletion of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in liver (hypomSR-BI-knockout^{liver}) but had no effect in P2Y₁₃ knockout mice, which indicate that P2Y₁₃-mediated HDL uptake pathway is independent of SR-BI-mediated HDL selective cholesteryl ester uptake. *Conclusion:* These results establish P2Y₁₃ as an attractive novel target for modulating RCT and support the emerging view that steady-state plasma HDL levels do not necessarily reflect the capacity of HDL to promote RCT. (HEPATOLOGY 2010;52:1477-1483)

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

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

Abbreviations: *abca1*, ATP-binding cassette, subfamily A, member 1; *abcb4*, ATP-binding cassette b4; *abcb11/bsep*, ATP-binding cassette b11/bile salt export pump; *abcg1*, ATP-binding cassette g1; *abcg5/abcg8*, ATP-binding cassette g5/g8; *apoA-I*, apolipoprotein A-I; *ATP*, adenosine triphosphate; *HDL*, high-density lipoprotein; *hmgcr*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; *mRNA*, messenger RNA; *ntcp*, Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide; *oatp*, organic anion transport polypeptide; *P2Y₁₃*, purinergic receptor P2Y, G-protein-coupled 13; *RCT*, reverse cholesterol transport; *SR-BI*, scavenger receptor class B, type I.

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

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

*These authors contributed equally to this work.

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

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

The scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is a HDL receptor that mediates selective uptake *in vivo*. In SR-BI-deficient mice, HDL selective CE uptake by the liver decreases by more than 90% but HDL holoparticle uptake is unchanged, suggesting that holoparticle uptake does not involve SR-BI.^{2,3} A likely candidate mechanism mediating HDL holoparticle uptake in the absence of SR-BI is the cell-surface complex related to mitochondrial F₁-adenosine triphosphatase (ATPase), namely ecto-F₁-ATPase.⁴ When HDL binds to apolipoprotein A-I (apoA-I), this enzyme generates extracellular adenosine diphosphate (ADP) which then specifically activates the P2Y₁₃ receptor which is a G-protein-coupled receptor. This results in HDL holoparticle endocytosis mediated by as-yet unidentified low-affinity binding sites. In addition, cangrelor, which acts as a partial agonist of the P2Y₁₃ receptor, stimulates HDL endocytosis by human hepatocytes and perfused mouse liver.⁵

In this study, we generated P2Y₁₃-null mice ($-/-$) in order to investigate the potential contribution of P2Y₁₃ to RCT.

Materials and Method

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

Results

To investigate the role of P2Y₁₃ in cholesterol metabolism *in vivo*, we generated P2Y₁₃-null mice ($-/-$) by a gene-targeting strategy (Fig. 1) and their wild-type littermates ($+/+$) were used as controls. Physical examination of the ($-/-$) mice on a chow diet indicated that P2Y₁₃ deletion had no detrimental effect on development, fertility, or any hematological or biochemical parameters. Of note, we found no difference in plasma total cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride levels between the ($+/+$) and ($-/-$) mice maintained on chow diet (Table 1). Hepatic lipids were

also similar, except that free cholesterol content was significantly lower in ($-/-$) mice than in ($+/+$) mice (Table 1), suggesting that the hepatic cholesterol metabolism is impaired in mice lacking the P2Y₁₃ gene.

To examine HDL uptake mediated by P2Y₁₃, we allowed endocytosis of fluorescent DyLight⁵⁴⁹-HDL in primary hepatocytes isolated from P2Y₁₃ ($-/-$) and ($+/+$) mice. After 30 minutes of endocytosis, fluorescent DyLight⁵⁴⁹-HDL showed a punctate endosomal pattern in hepatocytes from ($+/+$) mice (Fig. 2A). In contrast, the staining was strikingly different in hepatocytes from P2Y₁₃ ($-/-$) mice, showing very few vesicular structures positive for fluorescent DyLight⁵⁴⁹-HDL (Fig. 2B), which suggests that receptor-mediated HDL uptake is markedly impaired when P2Y₁₃ is not expressed. We next compared the uptake of radiolabeled HDL by livers of P2Y₁₃ ($-/-$) and ($+/+$) mice. Hepatic uptake of ¹²⁵I-HDL was significantly lower in livers from P2Y₁₃ ($-/-$) mice compared to ($+/+$) ($-20.3\% \pm 5.6\%$; Fig. 2C). Remarkably, the P2Y₁₃ partially agonistic compound cangrelor (10 μ M) induced marked stimulation of ¹²⁵I-HDL hepatic uptake in livers from ($+/+$) mice ($+34.9\% \pm 6.4\%$ versus phosphate-buffered saline control) but had no effect in livers from P2Y₁₃ ($-/-$) mice (Fig. 2C). This confirms that cangrelor acts specifically via P2Y₁₃ activation and suggests that P2Y₁₃ can be activated *in vivo* to promote hepatic HDL uptake. Moreover, the stimulation of ¹²⁵I-HDL hepatic uptake by cangrelor was also observed in livers from mice with a targeted deletion of SR-BI in liver (hypomSR-BI-KO^{liver},⁶). The level of stimulation was the same as in P2Y₁₃ ($+/+$) mice (Fig. 2C), suggesting that the P2Y₁₃-mediated HDL uptake pathway is independent of SR-BI-mediated HDL selective CE uptake.

Because biliary sterols are supposedly derived mainly from HDL cholesterol,^{7,8} we next investigated whether the lower free cholesterol liver content in P2Y₁₃-KO mice would be translated into altered biliary lipid secretion rates (Table 1). Bile flow and bile acid secretion were somewhat lower following P2Y₁₃ inactivation. Biliary secretion of cholesterol and phospholipids were significantly lower in P2Y₁₃-KO mice compared to wild type controls ($P < 0.05$), indicating that hepatobiliary cholesterol transport is impaired in these mice. Conversely, cangrelor (8 nmol/kg) treatment

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

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

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.23897

Potential conflict of interest: Nothing to report.

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

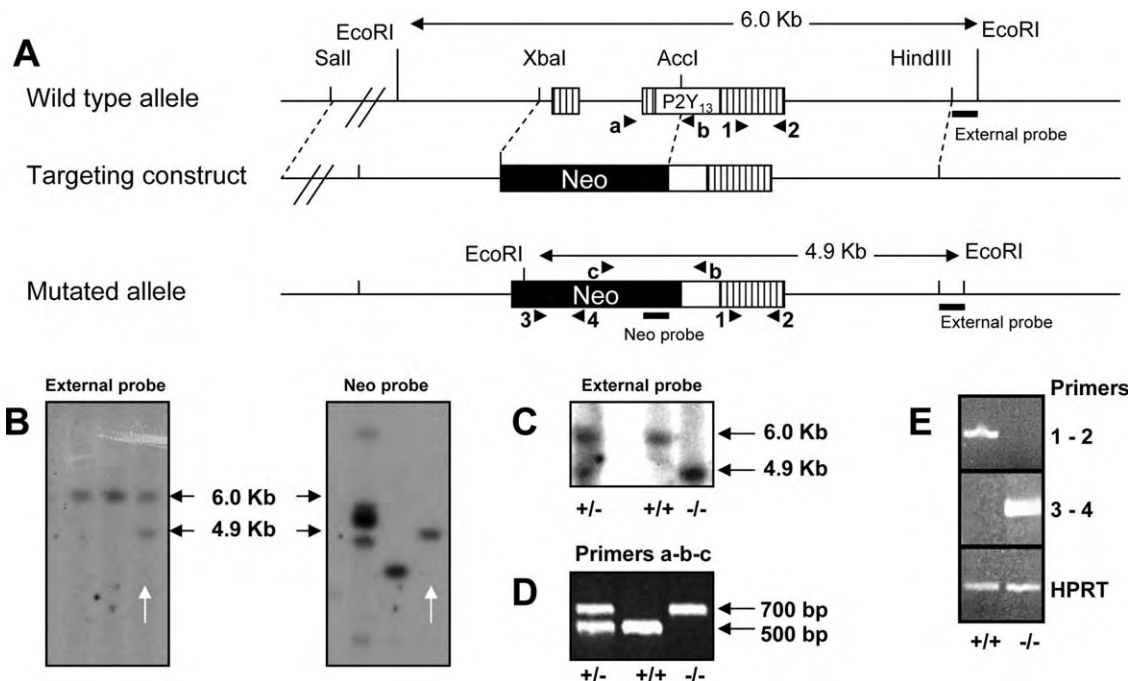


Fig. 1. Gene targeting strategy and characterization of P2Y₁₃-deficient mice. (A) Schematic representation of the genomic P2Y₁₃ locus, the targeting vector, and the mutated P2Y₁₃ allele. Boxes represent exons. The first noncoding exon and 182 base pairs of the second exon have been replaced by the neomycin resistance cassette in the mutated allele. (B) Screening of the targeted embryonic stem cell clones by Southern blotting. The white arrow highlights a positive clone. (C,D) Genotyping by (C) Southern blotting and (D) polymerase chain reaction (PCR) of litters obtained from P2Y₁₃ heterozygous breeding. (E) Characterization of the P2Y₁₃ mutant mice by PCR. Mice (P2Y₁₃-KO and control littermates) were tested for the expression in the liver of P2Y₁₃ mRNA (primers 1-2), Neo (primers 3-4), and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) transcript. Neo, neomycin (resistance cassette); Het, heterozygote; WT, wild-type; KO, knockout.

dramatically increased biliary total cholesterol, bile acid and phospholipid secretion together with bile flow in wild-type and hypomSR-BI-KO^{liver} mice but not in P2Y₁₃-KO mice (Fig. 3). In both wild-type and P2Y₁₃-KO mice, plasma lipid levels remained unchanged over 4 hours after cangrelor treatment (data not shown). This suggests that pharmacological activation of P2Y₁₃ might stimulate biliary lipid secretion *in vivo* with unchanged plasma lipid levels. This occurred independently of SR-BI, previously reported to mediate biliary cholesterol secretion, without concomitant changes in either biliary bile acid or phospholipid secretion.^{9,10}

To test the possibility that P2Y₁₃ is involved in RCT *in vivo*, [³H]cholesterol-loaded peritoneal macrophages from C57BL6/J mice were injected intraperitoneally in P2Y₁₃ (-/-) and (+/+) mice. The kinetics of [³H] counts in plasma were not significantly changed in P2Y₁₃ (-/-) mice versus (+/+) control mice (Fig. 4A). Likewise, there was no difference in [³H]cholesterol count in the liver at the end of the 48-hour period (Fig. 4B), which is consistent with most RCT experiments showing that the tracer amount recovered in the liver after 48 hours is essentially unchanged.¹¹ Nonetheless, absence of P2Y₁₃ resulted in a significant

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

Table 1. Plasma, Hepatic, and Biliary Lipid Values in Wild-Type and P2Y₁₃-KO Mice

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

Blood samples were collected from mice fasted for 3 hours. Values are expressed as means ± SEM; n ≥ 10 mice per group for plasma values and n ≥ 6 for liver and biliary lipid values. *Indicates significant difference (P < 0.05) from wild-type (+/+) mice.

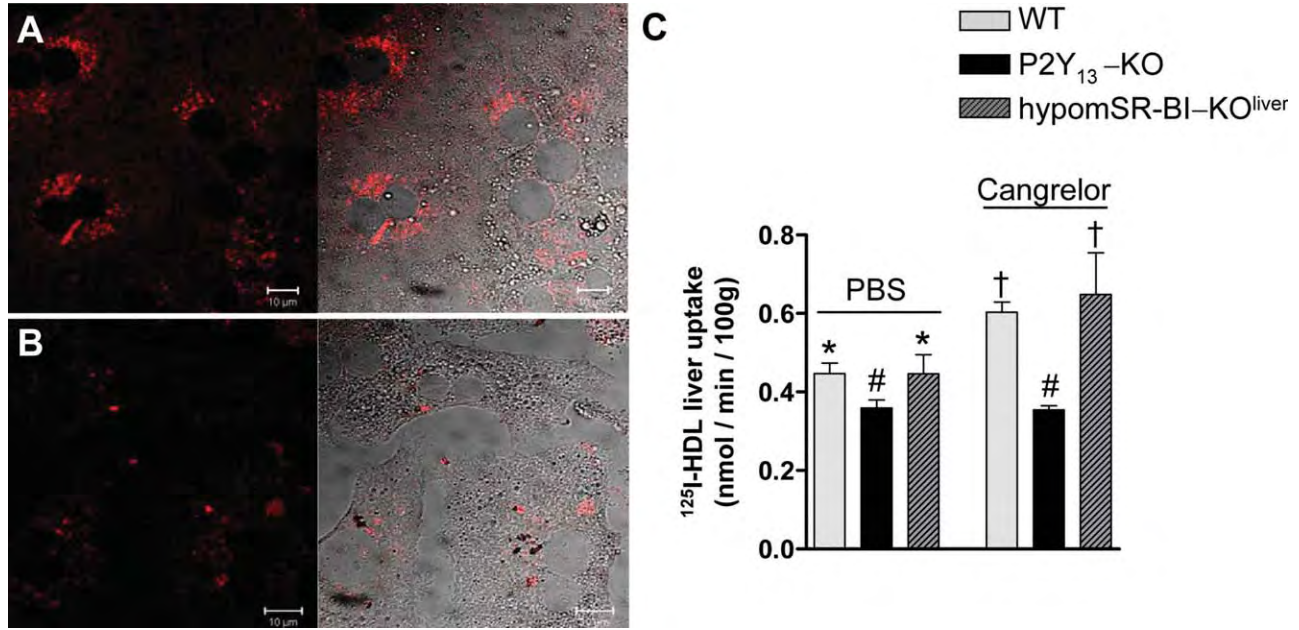


Fig. 2. Effect of P2Y₁₃ deletion on HDL uptake in murine liver. DyLight⁵⁴⁹-HDL uptake in primary hepatocytes from (A) wild-type or (B) P2Y₁₃-KO mice. Cells were incubated for 30 minutes at 37°C with 50 μg/mL DyLight⁵⁴⁹-HDL then washed and processed for fluorescence microscopy as described in Materials and Methods. Right panels represent an overlap of DyLight⁵⁴⁹-HDL staining with the phase contrast image. (C) The ¹²⁵I-HDL uptake in liver from wild-type (WT), P2Y₁₃-KO, or hypomSR-BI-KO^{liver} mice. Mouse livers were perfused for 10 minutes at 37°C in phosphate-buffered saline (PBS) medium containing 50 μg/mL ¹²⁵I-HDL with or without 10 μM Cangrelor. Values are expressed as means ± standard errors of the mean (SEM). n = 5-6 mice for each group. P < 0.05 among *, #, and † groups for each measurement.

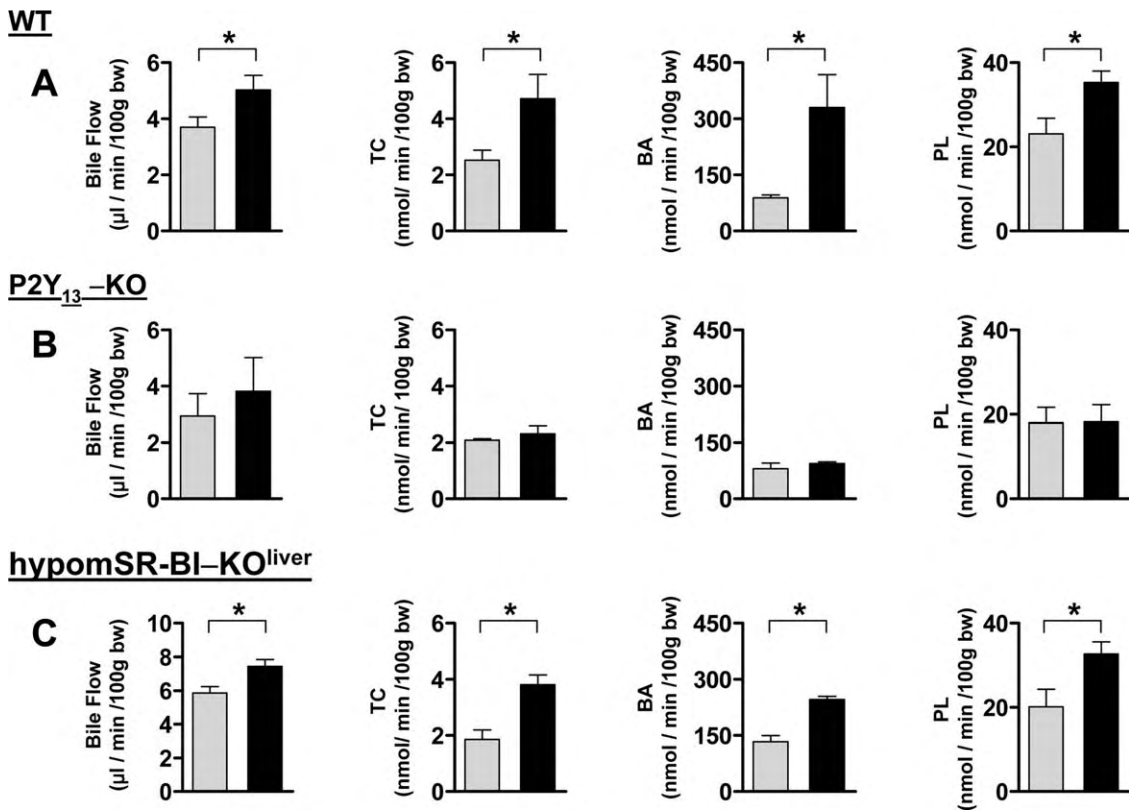


Fig. 3. Biliary lipid secretion rates in response to cangrelor treatment in (A) wild-type, (B) P2Y₁₃-KO, and (C) hypomSR-BI-KO^{liver} mice. The gallbladder was cannulated and mice were injected with cangrelor (8 nmol/kg body weight [bw], black bars) or PBS (gray bars). Then, the bile was collected for 210 minutes. Total cholesterol (TC), bile acid (BA), and phospholipids (PL) were determined as described in Materials and Methods. Values are expressed as means ± SEM; n = 6, 5, and 4 mice for (A), (B), and (C), respectively. *Indicates significant difference (P < 0.05) between the cangrelor-treated animals and their corresponding controls.

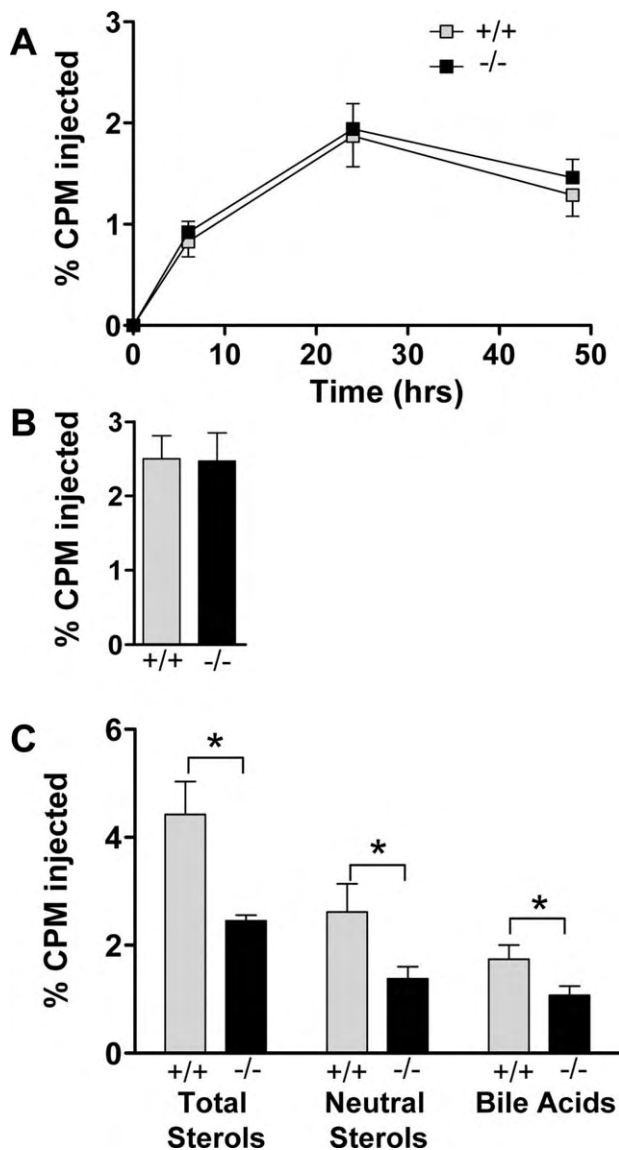


Fig. 4. Effect of P2Y₁₃ deletion on macrophage-to-feces RCT. Two millions [³H]cholesterol-loaded peritoneal macrophages from C57BL/6 mice were injected intraperitoneally in P2Y₁₃ (-/-) (black squares and bars) and (+/+) (gray squares and bars) mice. (A) Time course of [³H]cholesterol content in plasma. Mice were bled 6, 24, and 48 hours after injection with macrophages and counts per minute (CPM) in plasma were assessed directly by liquid scintillation. (B) Liver [³H]cholesterol content. At 48 hours after injection with macrophages, mice were killed, and a portion of liver was isolated for ³H-tracer analysis. (C) Fecal ³H-tracer distribution. After injection of macrophages, feces were collected continuously from 0 to 48 hours. Fecal bile acid and neutral sterol fractions were separated essentially as described in Materials and Methods and counts in the respective fractions were related to the total amount of feces produced over the whole experimental period. Data are expressed as a percentage of CPM injected \pm SEM; n = 6 mice per group. *P < 0.05 compared with +/+.

Hepatic expression of genes that are involved in cholesterol transport and metabolism was determined to assess potential changes due to P2Y₁₃ deletion (Table 2). Hepatic messenger RNA (mRNA) expression of

ATP-binding cassette transporters *abca1*, which plays a pivotal role in the efflux of cholesterol to apoA-I, and *abcg1*, which has a similar role in the efflux to HDL,^{12,13} were significantly lower in P2Y₁₃ (-/-) mice compared to (+/+) mice (Table 2; *abca1* -56% \pm 5% and *abcg1* -67% \pm 7%), suggesting that hepatic HDL biogenesis might be impaired in these mice. However, P2Y₁₃ deletion had no significant effect on the hepatic mRNA expression of biliary lipid transport proteins *abcg5/abcg8*, bile salt export pump (*abcb11/bsep*), sodium taurocholate cotransporting polypeptide (*ntcp*), and organic anion transport polypeptide (*oatp*). This suggests that the observed lower biliary lipid output in P2Y₁₃ (-/-) mice was not due to modulation of expression of these lipid transporters. The mRNA levels of the bile acid synthesis enzymes (cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 [*cyp7a1*]; *cyp27a1*; and *cyp8b1*) were unchanged by P2Y₁₃ deficiency, indicating that the lower biliary cholesterol and phospholipid secretion observed in P2Y₁₃ (-/-) mice was not due to altered bile acid synthesis. SR-BI expression was also unaffected by the absence of P2Y₁₃ which, together with the fact that cangrelor still stimulates both hepatic HDL uptake and biliary lipid secretion in mice lacking hepatic SR-BI as in wild-type mice, support the idea of independent P2Y₁₃ and SR-BI-mediated HDL uptake pathways. No significant change was observed in the sterol regulatory element binding protein 2 target genes, low-density lipoprotein receptor, or 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase mRNA levels in the liver of P2Y₁₃ (-/-) mice, suggesting that cholesterol derived from HDL and entering the liver via P2Y₁₃ is not accessible to the endoplasmic reticulum cholesterol pool which regulates hepatic cholesterol synthesis.¹⁴

Discussion

These data indicate that P2Y₁₃ activity is involved in macrophage-to-feces RCT. *In situ* liver perfusion and gallbladder cannulation experiments suggest that this occurs by promoting hepatic HDL uptake and biliary lipid secretion, independently of SR-BI-mediated HDL selective CE uptake. Surprisingly, although hallmark features of RCT are impaired in P2Y₁₃-deficient mice, these mice have unchanged HDL cholesterol levels compared to wild-type mice. Thus, the P2Y₁₃-dependent RCT pathway might contribute only minimally to the overall plasma HDL levels. In concordance with this observation, ABCA1 expression in macrophages does not seem to be a major contributing factor to plasma HDL levels although ABCA1

Table 2. Effect of P2Y₁₃ Deletion on Hepatic mRNA Expression of Genes Involved in Lipid Homeostasis

Gene Name	Fold-Change	Accession Number	Gene Title
atp5B	1.02 ± 0.04	NM_016774	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
scarb1	0.90 ± 0.08	NM_016741	scavenger receptor class B, type 1
ldlr	0.78 ± 0.1	NM_010700	low density lipoprotein receptor
abca1	0.43 ± 0.05**	NM_013454	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1
abcg1	0.31 ± 0.07**	NM_009593	ATP-binding cassette, subfamily G, member 1
apoa1	1.13 ± 0.09	NM_009692	Apolipoprotein A-I
cyp7a1	1.11 ± 0.11	NM_007824	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
cyp27a1	1.12 ± 0.09	NM_024264	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
cyp8b1	1.14 ± 0.08	NM_010012	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
abcg5	0.97 ± 0.16	NM_031884	ATP-binding cassette, subfamily G, member 5
abcg8	1.19 ± 0.09	NM_026180	ATP-binding cassette, subfamily G, member 8
abcb4/mdr2	0.75 ± 0.05	NM_021022	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 4
abcb11/bsep	1.06 ± 0.06	NM_021022	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 11
ntcp/slc10a1	0.82 ± 0.09	NM_011387	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1
oatp/slc1a1	0.89 ± 0.09	NM_013797	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
hmgcr	0.78 ± 0.12	NM_008255	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
srebp2	1.19 ± 0.09	NM_033218	sterol regulatory element binding transcription factor 2

Real-time PCR was performed on separate livers ($n \geq 8$) of 3-hour-fasted wild-type and P2Y₁₃-KO mice (males, 8-10 weeks old, chow diet). For all genes scored, the fold-change was calculated by dividing the KO value by the wild-type value (e.g., a drop of 60% from wild-type is reported as 0.40). Comparison of gene expression values between wild-type and P2Y₁₃-KO mice was done with the use of the Student *t* test (two-tailed). The threshold for fold-change was set above 1.5 or below 0.5 and ***P* < 0.01.

seems to contribute considerably to the efflux of excess cholesterol from these cells.¹⁵ An alternate idea is that compensatory processes might explain why plasma HDL levels are unaltered in P2Y₁₃-null mice. Most HDL contributed to the plasma pool is hepatic in origin, mainly through the lipidation of nascent apoA-I by ABCA1,^{12,16} the expression of which contributes up to approximately 70% to plasma HDL biogenesis *in vivo*. Recent studies also demonstrate that ABCG1, implicated in cholesterol efflux toward HDL, might also contribute to plasma HDL levels.¹³ A possibility is that circulating HDL levels in P2Y₁₃-null mice are unaffected, because the decreased HDL uptake is balanced by a decrease in hepatic HDL formation. On the one hand, HDL uptake and thereby catabolism is decreased in P2Y₁₃-null mice and, on the other hand, HDL formation in these mice might be lower as reflected by the decreased hepatic ABCA1 and ABCG1 expression. Although not formally tested, these findings are consistent with the overall concept of the role of hepatic ABCA1/ABCG1 in HDL formation.^{12,16} The phenotype observed in P2Y₁₃-null mice suggests that plasma HDL cholesterol may not always be the most reliable marker for assessing the potential utility of new therapeutic agents targeting HDL. It is thus important to develop effective approaches to evaluate HDL functionality. Our results show that pharmacological activation of P2Y₁₃ has the potential to raise biliary lipid secretion by enhancing hepatic HDL uptake. An interesting feature is that P2Y₁₃ activation not only drives biliary cholesterol secretion but also

the secretion of PL and bile acids, which suggest that pharmacological activation of P2Y₁₃ would not induce cholestasis. If P2Y₁₃ has similar activity in humans, it may become an attractive target for RCT promotion.

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

References

1. Glomset JA, Norum KR. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Adv Lipid Res* 1973;11:1-65.
2. Brundert M, Ewert A, Heeren J, Behrendt B, Ramakrishnan R, Greten H, et al. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:143-148.
3. Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJ. Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem* 2009;284:6093-6100.
4. Martínez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003;421:75-79.
5. Jacquet S, Malaval C, Martínez LO, Sak K, Rolland C, Perez C, et al. The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2508-2515.
6. Huby T, Doucet C, Datchet C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, et al. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest* 2006;116:2767-2776.

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

1.2- Une activation chronique du récepteur P2Y₁₃ stimule le transport retour du cholestérol

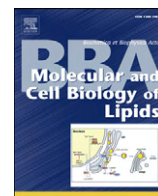
1.2.1-Introduction

Des résultats antérieurs de notre laboratoire ont permis de montrer que le cangrelor (AR-C69931MX), un agent anti-thrombotique, agissait comme un agoniste partiel du récepteur P2Y₁₃, stimulant à ce titre l'endocytose des HDL par des hépatocytes humains (Jacquet et al., 2005).

L'article 1 auquel j'ai contribué au début de ma thèse démontre un rôle essentiel du récepteur P2Y₁₃ dans le transport retour du cholestérol *in vivo* chez la souris. Tout d'abord, l'inactivation génétique de ce récepteur mène à une diminution de l'endocytose hépatique des HDL et des sécrétions en cholestérol biliaire ainsi qu'à un défaut du RCT. Ensuite, un traitement par injection intraveineuse d'un bolus de cangrelor à des souris stimule l'endocytose hépatique du HDL, *in situ*, sur des foies de souris perfusés 10min par des HDL radiomarquées sur leur composante protéique (marquage ¹²⁵I). Ce même traitement avec le cangrelor augmente également le flux et les sécrétions de lipides biliaires, sans aucune modification des taux des lipides plasmatiques.

Afin d'étudier l'effet du cangrelor sur du plus long terme, nous avons effectué un traitement chronique de souris sauvages. Pour cela, du fait de la demi-vie d'une dizaine de minutes du cangrelor dans le plasma, nous avons délivré la molécule aux animaux sur trois jours à l'aide de pompes osmotiques de type alzet®. Nous avons observé que ce traitement entraîne une diminution significative de la concentration plasmatique en HDL-C, ainsi qu'une augmentation de leur clairance plasmatique par le foie. Ces modifications métaboliques se traduisent au niveau biliaire par une augmentation de l'élimination des acides biliaires.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation du récepteur P2Y₁₃ chez l'homme pourrait s'imposer comme une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant le HDL et visant à prévenir et/ou faire régresser le développement de la plaque d'athérosclérose.



Chronic pharmacological activation of P2Y₁₃ receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion



Nizar Serhan^{a,b}, Cendrine Cabou^{a,b,c,1}, Céline Verdier^{a,b,1}, Laeticia Lichtenstein^{a,b}, Nicole Malet^{a,b}, Bertrand Perret^{a,b}, Muriel Laffargue^{a,b}, Laurent O. Martinez^{a,b,*}

^a INSERM, UMR 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, 31000, France

^b Université de Toulouse III, UMR 1048, Toulouse, 31300, France

^c Faculté de pharmacie, Toulouse, 31062, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2012

Received in revised form 10 December 2012

Accepted 12 December 2012

Available online 20 December 2012

Keywords:

High density lipoprotein (HDL)

Purinergic receptor P2Y₁₃

ATP synthase

Reverse cholesterol transport (RCT)

ABSTRACT

High level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) is inversely correlated to the risk of atherosclerotic cardiovascular disease. The protective effect of HDL is mostly attributed to their metabolic functions in reverse cholesterol transport (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up from peripheral cells and processed in HDL particles, and is later delivered to the liver for further metabolism and bile excretion. We have previously demonstrated that P2Y₁₃ receptor is critical for RCT and that intravenous bolus injection of cangrelor (AR-C69931MX), a partial agonist of P2Y₁₃ receptor, can stimulate hepatic HDL uptake and subsequent lipid biliary secretion without any change in plasma lipid levels. In the present study, we investigated the effect of longer-term treatment with cangrelor on lipoprotein metabolism in mice. We observed that continuous delivery of cangrelor at a rate of 35 µg/day/kg body weight for 3 days markedly decreased plasma HDL-cholesterol level, by increasing the clearance of HDL particles by the liver. These effects were correlated to an increase in the rate of biliary bile acid secretion. An increased expression of SREBP-regulated genes of cholesterol metabolism was also observed without any change of hepatic lipid levels as compared to non-treated mice. Thus, 3-day cangrelor treatment markedly increases the flux of HDL-cholesterol from the plasma to the liver for bile acid secretion. Taken together our results suggest that P2Y₁₃ appears a promising target for therapeutic intervention aimed at preventing or reducing cardiovascular risk.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Epidemiological studies support a clear inverse association between levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) and atherosclerotic cardiovascular disease [1]. HDL particles display anti-atherogenic effects on the vessel wall, partly by improving vascular functions and decreasing inflammation [2] but their main protective role is attributed to their central function in a process called reverse cholesterol transport (RCT). In this process, HDL removes excess cholesterol from peripheral cells (macrophages/foam cells) to deliver it to the liver where it is further eliminated into the bile as free cholesterol or after conversion into bile acids [3]. HDL-cholesterol uptake by the liver involves cell interactions between hepatocytes and HDL particles. So far, two receptors have been identified on hepatocytes: the scavenger receptor BI (SR-BI) is considered to mediate selective cholesterol uptake from

the HDL particle [4], whereas the membrane-associated ecto-F₁-ATPase binds apolipoprotein A-I (apoA-I, the major protein component of HDL) and contributes to the uptake of both protein and lipid moieties of the HDL particle, a process called holo-HDL endocytosis [5]. More precisely, the binding of apoA-I to the ecto-F₁-ATPase stimulates extracellular ATP hydrolysis into ADP. The generated extracellular ADP specifically activates the purinergic P2Y₁₃ receptor, a G-protein coupled receptor, under the control of the small GTPase RhoA and its effector, Rho kinase I (ROCK I) [6,7]. This results in cytoskeleton reorganization and subsequent holo-HDL endocytosis through low-affinity binding sites which remain to be identified [5]. Today, the development of therapeutic intervention targeting hepatic HDL uptake remains a challenge to reduce cardiovascular risk.

Cangrelor (AR-C69931MX) is a non-thienopyridine adenosine triphosphate analog, which reversibly antagonizes the P2Y₁₂ receptor, found mainly but not exclusively on the surface of blood platelets where it is involved in regulating blood clotting [8]. Because of its short plasma half life, being less than 10 min, this compound is used in clinical studies in the settings of percutaneous coronary intervention (PCI) and acute coronary syndromes as an antithrombotic therapy for

* Corresponding author at: INSERM U1048, Bât. L3, Hôpital Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 04, France. Tel.: +33 531 224 147; fax: +33 561 325 616.

E-mail address: Laurent.Martinez@inserm.fr (L.O. Martinez).

¹ Cendrine Cabou and Céline Verdier equally contributed to this work.

patients needing a rapid but reversible platelet inhibition [9]. Cangrelor acts also as a partial agonist of the P2Y₁₃ receptor as measured by its potential to reduce forskolin-induced cAMP levels in CHO cells stably expressing P2Y₁₃ [6]. On human hepatocytes, which naturally express P2Y₁₃ but not P2Y₁₂ receptor, cangrelor stimulated holo-HDL endocytosis [6]. This effect was replicated on perfused mouse liver from wild-type mice and was blunted in liver from P2Y₁₃-deficient mice [10]. Furthermore, an acute intravenous cangrelor injection stimulated biliary lipid secretions (both cholesterol and bile acid) in wild-type mice but this effect was not associated to any change in plasma cholesterol concentration [10]. As described in transgenic mice models, SR-BI is well characterized for its ability to mediate HDL-cholesterol flux from the peripheral cells to the liver [4,11], but the physiological importance of P2Y₁₃ at this level is not fully investigated.

The aim of the present study was to further evaluate the suitability of P2Y₁₃ as a target for therapeutic intervention targeting HDL metabolism. For that, we chronically infused cangrelor for 3-days in wild-type mice that were implanted subcutaneously with osmotic pumps.

2. Materials and methods

2.1. Materials

¹²⁵I-Na was obtained from GE-Healthcare. Cangrelor (Molecular mass: 774.95 g/mol), formerly denoted as AR-C69931MX, was provided by The Medicines Company (New Jersey, USA) and was used as previously described [10]. Hydrazine hydrate was from Acros. 3-Alpha-OH steroid dehydrogenase was from MP biochemicals. Phospholipase D was from ENZO. All other reagents (analytical grade) were from SIGMA.

2.2. Animals and diets

Eight week male C57B/L6 mice were used in this study. Mice were caged in animal rooms with alternating 12 h periods of light (07:00 am–7:00 pm) and dark (7:00 pm–07:00 am) and fed *ad libitum* with a normal mouse chow diet (# R04-10, SAFE, France). Since cangrelor has plasma half-life < 10 min [12], osmotic pumps were used to insure a continuous delivery. Briefly, 100 µL osmotic pumps were filled with 70 µM cangrelor in PBS and were then implanted subcutaneously into the mice according to the manufacturer's instructions (Alzet®, model pump #1003D), to insure cangrelor release at an estimated rate of 0.5 µL/h, which corresponds to an estimated amount of delivery of 35 µg of cangrelor per kilogram of body weight per day (35 µg/kg BW/day). The dose was determined from the dose range currently used in clinical study [12] and was well tolerated by the mouse which shows any bleeding and no change in hemoglobin concentration at completion of the treatment. Pumps filled with PBS alone were also implanted into the group of control mice (referred as control mice). Lipid metabolism studies were performed after 3 days of treatment with cangrelor. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Animals of the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license.

2.3. Plasma lipoprotein analyses

Plasma samples were collected from 3 h-fasted mice. Total cholesterol and total triglycerides were measured with commercial kits (CHOD-PAP for cholesterol and GPO-PAP for triglycerides; BIOLABO SA, Maizy, France). Quantification of plasma lipoproteins was performed using an Ultimate® 3000 HPLC system (Dionex, USA). 10 µL of plasma was injected and lipoproteins were separated on Superose® 6 10/300 GL columns (GE Healthcare, USA) with PBS at pH 7.4 as mobile phase at a 0.5 mL/min flow rate. The column effluent was split equally into 2 lines by a microsplitter 50:50, mixing with cholesterol and/or triglyceride reagents (Biolabo, France), thus achieving a simultaneous profile from

single injection. The two enzymatic reagents were each pumped at a rate of 0.1 mL/min using ISO-3100 analytical pumps (Dionex, USA). Both enzymatic reactions proceeded at 40 °C in a PTFE reactor coil (10 m × 0.5 mm i.d.). Quantification was performed by measuring the percentage peak area of each lipoprotein (VLDL, LDL and HDL) and by multiplying each percentage to the total amount of cholesterol and/or triglycerides measured in plasma samples.

2.4. Hepatic lipid analyses

Following homogenization of liver samples in methanol/5 mM EGTA (2:1 v/v), lipids corresponding to an equivalent of 1 mg tissue were extracted in chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/v/v), in the presence of the internal standard: 3 µg of stigmaterol, 3 µg of cholesteryl heptadecanoate and 6 µg of glyceryl triheptadecanoate [13]. Neutral lipids were analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5 m × 0.32 mm i.d., 0.50 mm film thickness). Oven temperature was programmed to ramp from 200 °C to 350 °C at 5 °C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector was held at 315 °C and the detector at 345 °C [14].

2.5. Measurement of HDL clearance and tissue uptake

HDL₃ were isolated by sequential flotation ultracentrifugation from the plasma of normolipidemic healthy human donors and depleted of apo E using heparin-sepharose chromatography as previously described [15]. Labeling of HDL₃ on the protein moiety with ¹²⁵I was performed by the N-bromosuccinimide method [15]. Eight week old mice (n ≥ 6 per group) were fasted for 3 h before tracer injection then the mice were injected retro-orbitally with PBS medium (LONZA) containing 50 µg proteins/mouse of ¹²⁵I-HDL₃ (specific radioactivities ranged from 2000 cpm/ng of proteins). After injection, a blood sample was taken from the tail vein at different time points (5, 30, 60, 120, 180 and 240 min) for direct radioactivity measurement in serum. Mice were then anesthetized, abdomens were opened and a catheter was inserted into the vena porta. The inferior vena cava was cut and the mice were extensively perfused for 10 min with PBS at 4 °C. After perfusion, radioactivity associated with the liver, intestine and kidney of each mouse was counted harvested.

2.6. Measurement of LCAT activity

Plasma LCAT activity was assessed using a kit from Calbiochem (Merck Chemicals Limited, Nottingham, UK) and measured by taking the ratio of two emission intensities: 470 nm (which represents the intact substrate) and 390 nm (which represents the LCAT hydrolyzed monomer).

2.7. Measurement of hepatic VLDL production

Wild-type control and 3 day cangrelor treated mice were injected retroorbitally with 500 mg of Triton WR-1339 (Sigma) per kg body weight as a 15 g/dL solution in 0.9% NaCl after an overnight fast. Blood sample was taken from the tail vein at 0, 1, 2 and 3 h after Triton WR-1339 injection. Plasma triglycerides were analyzed enzymatically as described above and were related to the body mass of the animals. The hepatic VLDL production was calculated from the slope of the curve and expressed as g/h/kg of body weight.

2.8. Cannulation of the common bile duct and collection of hepatic bile

8 week old mice (n ≥ 6 per group) were fasted for 3 h and were then anesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. The common bile duct was ligated close to the duodenum; and then the gallbladder was punctured and cannulated

with a polyethylene-10 catheter. After 30 min, newly secreted bile was collected for 30 min by gallbladder cannulation. During bile collection, body temperature was stabilized using a temperature mattress. Bile flow ($\mu\text{L}/\text{min}/100\text{ g}$ of body weight) was determined gravimetrically assuming a density of 1 g/mL for bile.

2.9. Biliary lipid analyses

For bile acid analysis, 1 μL of bile samples was diluted with 99 μL of milliQ water then incubated with the work reagent (6 mg NAD, 0.5 M hydrazine hydrate buffer, 0.05 M Na-pyrophosphate) for 4 min. The mix was then incubated with a start reagent (0.03 M Tris-EDTA; 0.3 U/mL 3- α -OH steroid dehydrogenase) and measured for 30 min, under excitation of 340/330 nm and emission of 440/420 nm. For phospholipid analysis, 1 μL of bile samples was diluted with 49 μL of milliQ water then incubated with the work reagent (100 mM MOPS, pH 8; 0.55 mM HVA; 20 mM CaCl_2 ; 11 U/mL Phospholipase-D; 1.66 U/mL Peroxidase; 0.1% Triton X-100) for 4 min. The mix was then incubated with a start reagent (1 M MOPS, pH 8, 50 U/mL Choline oxidase) and measured for 67.5 min, under excitation of 340/330 and emission of 440/40. For cholesterol analysis, 1 μL of bile samples was diluted with 29 μL of milliQ water then was incubated with the work reagent (100 mM MOPS, pH 8, 0.25 mM HVA; 0.1% Triton X-100) for 4 min. The mix was then incubated with a start reagent (0.1 M MOPS, pH 8, 0.06 U/mL cholesterol oxidase, 0.15 U/mL cholesterol esterase, 0.45 U/mL Peroxidase, 0.06 mM Taurocholate) and measured for 45 min, under excitation of 340/330 nm and emission of 440/420 nm.

2.10. RNA isolation and quality control

After mechanical grinding, total RNA was extracted from each liver sample using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Genomic DNA contamination was removed using RNase-free DNase set (Qiagen). The RNA was then eluted in DNase RNase-free water and finally the concentration of each sample was measured at a wavelength of 260 nm. The quality of the RNA was checked by capillary electrophoresis (Agilent® RNA Nano chip).

2.11. Reverse transcription

Reverse transcription of mRNA was performed using Superscript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) in the presence of primer p(dT) (Roche Diagnostics) and RNase OUT™ (Invitrogen). Briefly, 5 μg of total RNA from each sample was used with 2 μL of primer p(dT)₁₅ (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) and 0.5 μL of RNase OUT. After 8 min of incubation at 70 °C to inactivate DNase, 100 units of Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) were added and the mixture was incubated at 25 °C for 10 min and then at 50 °C for 1 h. The RT reaction was ended by heating the mixture at 95 °C for 5 min, it was then chilled and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until use.

2.12. Analysis of gene expression by real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR analysis was performed using SYBR Green I Master (Roche) on LightCycler® 480 Real-Time PCR System. Liver expression of each gene was studied and compared to the expression of the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase

(HPRT). PCR reactions were run in a 96-well format with 20 μL reaction mixture containing SYBR Green I Master (10 μL), cDNA from the RT reaction (5 μg , 4 μL) and gene specific primers (100–900 nM, 6 μL). Reactions were run with a standard 2-step cycling program, 95 °C for 10 s and 60 °C for 40 s, for 40 cycles. Each analysis included both housekeeping gene and gene of interest, primer/probe pairs as multiplexed samples. mRNA expression levels presented (6–8 mice per group) were calculated relative to the average of the housekeeping gene HPRT and further normalized to the relative expression level of the respective controls, *i.e.* wild-type non-treated (PBS) mice. The specific primers used are reported in Supplementary Table 1.

2.13. Statistical analysis

All results are presented as means \pm SEM. Comparison between groups were made using the Mann–Whitney test for independent samples. Outcomes of $p < 0.05$ were considered to be significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 6 software.

3. Results

3.1. Cangrelor treatment decreases HDL levels in mice

Male C57B/L6 mice have been subcutaneously infused for 3 days with cangrelor, a compound that had previously been characterized as a partial agonist of P2Y₁₃ [6] (see [Materials and methods](#)). At the end of the 3-day infusion period, we measured plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) concentrations in the plasma of 3 h fasted mice. As shown in [Table 1](#), plasma total cholesterol concentration was significantly lower in cangrelor-treated group as compared to non-treated control group (54.0 ± 2.8 versus 67.4 ± 5.0 mg/dL respectively, $p < 0.05$). Interestingly, this lowering was associated with a significant decrease in free cholesterol ([Table 1](#)) whereas a slight but not significant decrease was observed in esterified cholesterol (not shown). Plasma TG concentrations were not statistically different between the two groups. Given that plasma lipid concentration gives no information on lipid content in lipoprotein particles, we subjected the plasma of these mice to size exclusion chromatography and quantified cholesterol and TG levels in each class of lipoproteins (HDL, LDL and VLDL). Analysis of plasma lipoprotein cholesterol profiles show that changes in plasma cholesterol levels reflected a marked decrease in the amount of total cholesterol associated with HDL particles and to a lesser extent with VLDL particles ([Table 2](#), $p < 0.05$). Of note, this decrease in total cholesterol content in these two lipoprotein classes was mainly reflected by a decrease in their free cholesterol (FC) content ([Table 2](#), $p < 0.05$), although a slight but not significant decrease was also observed in esterified cholesterol (EC) transported by HDL and VLDL ($p = 0.09$ and $p = 0.06$ respectively, [Table 2](#)). With respect to HDL, this effect could be attributed to a ~25% increase in LCAT activity in plasma from cangrelor treated mice ([Fig. 1A](#)). Indeed, the activity of this enzyme that catalyses the esterification of free cholesterol [16], may contribute to maintain EC content in HDL despite the observed decrease in TC. Interestingly, cangrelor also induced a significant increase in HDL TG content ([Table 2](#), $p < 0.05$). Noteworthy that the TG content remained unaltered in LDL and VLDL particles ([Table 2](#)), explaining why no change of total plasma TG levels was observed under cangrelor treatment ([Table 1](#)) since these two classes of lipoproteins are quantitatively the main contributors of plasma TG. Concordant with the enrichment of

Table 1
Plasma lipid levels in cangrelor treated mice.

Cangrelor	TC (mg/dl)		FC (mg/dl)		TG (mg/dl)	
	–	+	–	+	–	+
Total plasma	67.4 \pm 5.0	54.0 \pm 2.8*	29.5 \pm 2.5	21.4 \pm 1.2*	32.6 \pm 7.8	36.9 \pm 4.1

Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and triglycerides (TG) were measured on mice treated (+) or not (–) with cangrelor for 3 days as described in [Material and methods](#). Data represent mean \pm SEM, $n \geq 6$ per group. * $p < 0.05$ versus non-treated mice.

Table 2
Plasma lipoprotein composition in cangrelor treated mice.

Cangrelor	VLDL (mg/dl)		LDL (mg/dl)		HDL (mg/dl)	
	–	+	–	+	–	+
TC	4.95 ± 0.72	2.83 ± 0.25*	8.24 ± 0.42	7.70 ± 0.76	54.25 ± 4.03	43.49 ± 2.10*
FC	3.37 ± 0.51	1.76 ± 0.16*	3.85 ± 0.24	3.54 ± 0.28	22.32 ± 1.95	16.13 ± 0.84*
EC	1.57 ± 0.22	1.06 ± 0.14	4.39 ± 0.27	4.15 ± 0.49	31.93 ± 2.19	27.35 ± 1.38
TG	14.6 ± 4.7	16.7 ± 2.5	12.9 ± 2.2	13.1 ± 1.7	4.0 ± 0.8	7.0 ± 0.7*

Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), esterified cholesterol (EC) and triglycerides (TG) were measured on mice treated (+) or not (–) with cangrelor for 3 days as described in [Materials and methods](#).

Data represent mean ± SEM, n ≥ 6 per group. *p < 0.05 versus non-treated (–) mice.

TG content only in HDL, the mean size of serum HDL particles is slightly increased under cangrelor treatment, as detected with a slight left-shift of HDL particles on lipoprotein profile obtained by fast protein liquid chromatography (FPLC); conversely, the size of VLDL and LDL particles remained unchanged ([Fig. 2](#)).

3.2. Cangrelor increases HDL clearance from the circulation and HDL hepatic uptake

To gain more insight into the mechanisms by which cangrelor decreases plasma HDL-cholesterol levels, ¹²⁵I-HDL₃ (a subclass of HDL radiolabeled on the apolipoprotein moiety) was retro-orbitally injected to mice treated with cangrelor or PBS (control) for 3 days. Radioactivity in serum, which reflects HDL clearance, was measured at different time points during 4 h following the injection. Radioactivity within liver, intestine and kidney, indicating HDL tissue uptake, was measured at the end of the 4 h experimentation. As reported in [Fig. 3A](#), cangrelor treatment significantly increased serum HDL clearance as compared to control mice. At the end of the 4 h experimentation period, HDL clearance from the circulation was significantly increased upon cangrelor treatment, up to 52.2 ± 1.4% of the injected dose (ID) as compared to 37.8 ± 1.6% in control animals, representing a relative 20% increase in the clearance rate (p < 0.02, [Fig. 3A](#)). Regarding HDL uptake by tissues, cangrelor treated mice showed a 2.7-fold increase of the radioactivity found in the liver (25.3 ± 1.3% versus 9.1 ± 1.6% of the ID in cangrelor treated and control mice respectively, p < 0.005, [Fig. 3B](#)), indicating that cangrelor treatment significantly stimulates hepatic HDL uptake. No difference between cangrelor-treated and control groups was observed in the percent ID recovered in other organs that actively catabolyze HDL, such as intestine ([Fig. 3C](#)) and kidney ([Fig. 3D](#)). Thus, the stimulatory effect of cangrelor on HDL clearance from the circulation can be attributed to an increase of HDL uptake by the liver. Regarding the effect of cangrelor on non-HDL-cholesterol levels, the observed reduction of cholesterol content in VLDL ([Table 2](#)) was not the result of an impaired hepatic VLDL production ([Fig. 1B](#)).

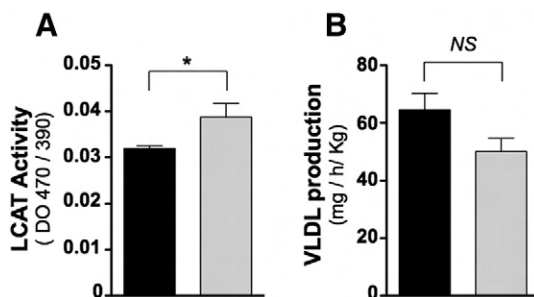


Fig. 1. LCAT activity and VLDL production in wild-type mice in response to treatment with cangrelor. LCAT activity (A) and VLDL production rate (B) was determined in 8–10 week old male animals treated (gray box) or not (black box) with cangrelor for 3 days. LCAT activity was determined by taking the ratio of emission intensities between 470 nm (which represents the intact substrate) and 390 nm (which represents the LCAT hydrolyzed monomer). VLDL production was determined by calculating the accumulation rate (g/h/kg body weight) of triglycerides in the plasma after blocking VLDL clearance by Triton WR-1339. Data are expressed as mean ± SEM (n ≥ 4/group; *p < 0.02; NS = not significant p-value; Mann–Whitney test).

3.3. Cangrelor treatment increased bile acid secretion into bile

Next, we analyzed whether the increase in hepatic HDL uptake induced by cangrelor treatment ([Fig. 2B](#)) translates into increase in hepatic lipid contents and biliary lipid secretions. Surprisingly, no significant difference was found in the level of hepatic cholesterol (free and esterified) and triglycerides between cangrelor-treated and control mice ([Table 3](#)). To assess a potential effect of cangrelor treatment on biliary lipid secretion, hepatic bile was collected for 30 min following cannulation of the gallbladder. Unexpectedly, cangrelor treatment did not change bile flow and biliary secretion rate of cholesterol and phospholipids ([Table 3](#)). However, bile acid secretion was significantly higher in cangrelor treated mice ([Table 3](#)), indicating that cangrelor treatment increases bile secretion of lipid but only as bile acids.

3.4. Hepatic mRNA analysis

Hepatic expression of genes involved in cholesterol transport and metabolism was determined to assess potential changes due to P2Y₁₃ activation by cangrelor. As reported in [Table 4](#), no difference was found under cangrelor treatment in the mRNA expression levels of genes involved in hepatic HDL uptake, such as SR-BI (scrab1), P2Y₁₃ (p2y13) and β-chain of F₁-ATPase (atp5b). In addition, no significant difference was observed in the mRNA expression levels of genes involved in cholesterol efflux towards the blood or the bile, such as ABCA1 (abca1), ABCG1 (abcg1) and ABCG5/G8 (abcg5/g8). These observations show that cangrelor does not affect gene expression level of proteins involved in HDL-mediated hepatic cholesterol fluxes. Moreover, hepatic mRNA expression of enzymes catalyzing key steps in bile acid synthesis (cyp7a1, cyp27a1 and cyp8b1), or transporters controlling hepatic bile acid fluxes (abcb11/bsep, ntcp, oatp) remained unchanged under cangrelor treatment. In contrast, cangrelor significantly increased hepatic mRNA expression level of two enzymes involved in cholesterol neosynthesis, HMG-CoA reductase and synthase (hmgcr and hmgcs), by about 75 and 110% respectively (each p < 0.005, [Table 4](#)). It also increases hepatic gene expression of SREBP2 and LDL receptor (ldlr) by more than 50% and 90% respectively (each p < 0.005, [Table 4](#)). Taken together these data indicate that cangrelor treatment increases SREBP2 target genes

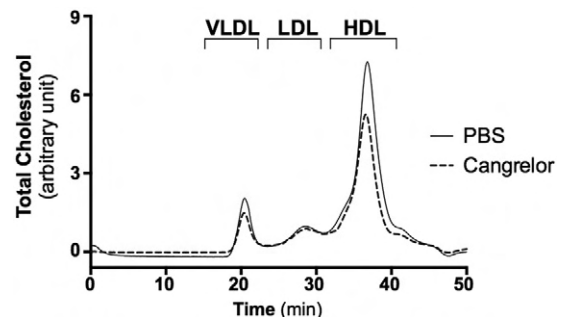


Fig. 2. FPLC profiles of representative plasma samples. Dashed line is representative of plasma from one mouse treated with cangrelor for 3 days; plain line is representative of plasma from one control mouse (PBS-treated).

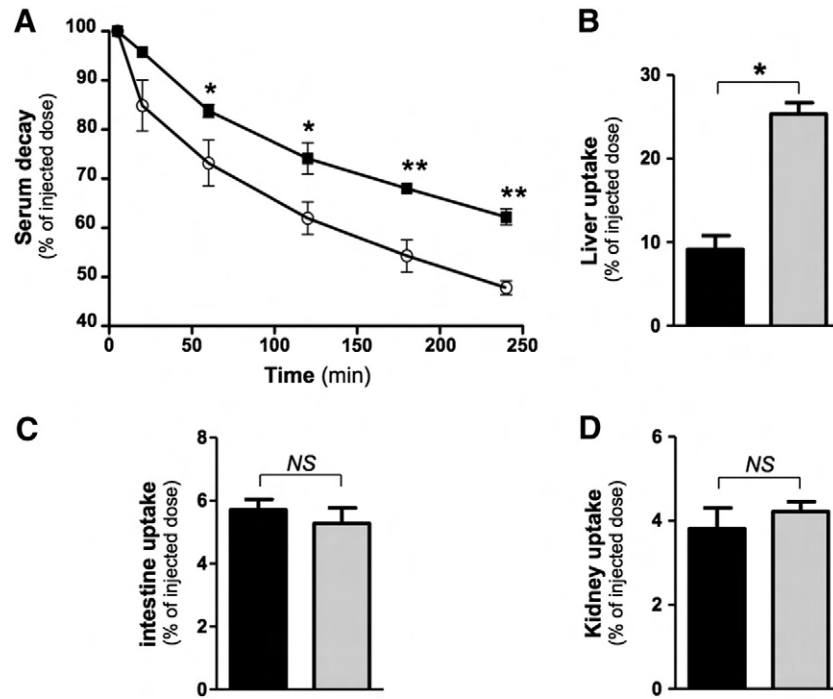


Fig. 3. Kinetics of ^{125}I -HDL₃ in wild-type mice in response to treatment with cangrelor. (A) Values are the fraction of the injected dose remaining in plasma of mice treated by cangrelor (open circle) or vehicle (PBS, black squares). Data are given as mean \pm S.D.; $n=4$ mice/group; Uptake by the liver (B), intestine (C) and kidney (D) in mice treated by cangrelor (gray box) or vehicle (PBS, black box). Values are expressed as the percentage of remaining radioactivity in tissue after 240 min. Stars indicates a significant difference from control mice (* $p<0.02$; ** $p<0.005$; NS = not significant p -value; Mann–Whitney test).

involved in cholesterol synthesis or metabolism, suggesting that mice have adjusted their mRNA expression to accommodate the metabolic change induced by cangrelor treatment.

4. Discussion

Cangrelor is a non-thienopyridine ATP analog, originally developed as a purinergic G protein coupled receptor P2Y₁₂ antagonist [12], that we have previously described as a partial agonist of P2Y₁₃ receptor, as measured by its potential to lower forskolin-induced cAMP levels in P2Y₁₃ CHO transfected cells [6]. Furthermore, our earlier *in vivo* results demonstrated the agonist specificity of cangrelor towards P2Y₁₃ receptor and its function in HDL metabolism. Indeed, we previously reported that bolus administration of cangrelor could stimulate HDL uptake and biliary lipid secretions by the liver in wild type but not in P2Y₁₃ knockout mice suggesting that cangrelor acts *in vivo* to promote HDL-mediated hepatobiliary secretions, specifically through its agonist action on P2Y₁₃ receptor [10].

In this study, we further evaluated the suitability of P2Y₁₃ as a target for therapeutic intervention targeting HDL metabolism by administrating

cangrelor to wild type mice on a longer period of time. Due to the short plasma half-life of cangrelor, being less than 10 min [12], subcutaneous continuous administration by the use of an osmotic pump was chosen. Our findings indicate that 3-day continuous delivery of cangrelor at a rate of 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day markedly increased the clearance of HDL particles from the circulation by the liver and decreased plasma HDL-cholesterol level. These effects were correlated to an increase in the rate of biliary bile acid secretion.

The effect of 3-day cangrelor treatment in decreasing HDL-cholesterol level is not entirely unexpected as it might be attributed to its action in stimulating HDL uptake by the liver, resulting in an accelerated HDL clearance from the circulation. Indeed, the impact of hepatic HDL uptake on plasma HDL-cholesterol level has been previously reported *in vivo*. For instance, transgenic or adenovirus-transduced mice overexpressing the HDL receptor SR-BI in the liver also display a decrease of HDL-cholesterol level due to an increase of hepatic HDL-cholesterol uptake [17,18]. Of note, in the present study, we can rule out any effect of cangrelor on SR-BI activity since i) hepatic expression of mRNA SR-BI was unchanged under cangrelor treatment, and ii) plasma HDL clearance and tissue uptake were measured using apoE-free HDL₃ particles labeled on the protein moiety with ^{125}I , which is internalized independently of SR-BI-mediated selective uptake of HDL cholesteryl ester [19–21]. Furthermore, although SR-BI could also contribute to HDL retroendocytosis *i.e.* uptake of the holo-HDL particle followed by rescretion of the protein moiety [22], we previously reported that bolus administration of cangrelor could stimulate hepatic uptake of ^{125}I -HDL₃ on mice with targeted deletion of SR-BI in the liver to the same level than wild type mice, thus demonstrating that cangrelor acts independently of SR-BI [10].

Interestingly, besides decreasing HDL-cholesterol level, cangrelor treatment also modifies HDL composition, with a decrease in its free cholesterol content and an increase in TG content. This increase in the core-surface lipid ratio would indicate the presence of larger HDL particles, which is supported by the FPLC data. This change in HDL composition could be attributed to the possible ability of cangrelor to stimulate the holoparticle uptake of some specific subclasses of HDL particles,

Table 3

Hepatic and biliary lipid values in wild type mice receiving either PBS (control) or cangrelor.

	Control	Cangrelor
<i>Liver (nmol/mg of tissue):</i>		
Free cholesterol	4.96 \pm 0.17	5.25 \pm 0.23
Cholesteryl ester	0.47 \pm 0.07	0.41 \pm 0.04
Triglycerides	3.19 \pm 0.25	2.80 \pm 0.45
<i>Biliary lipid:</i>		
Bile flow ($\mu\text{L}/\text{min}/100$ g BW)	3.96 \pm 0.48	4.08 \pm 0.28
Cholesterol secretion (nmol/min/100 g BW)	3.10 \pm 0.26	3.19 \pm 0.38
Bile acid secretion (nmol/min/100 g BW)	216 \pm 12.6	308.2 \pm 15.3*
Phospholipid secretion (nmol/min/100 g BW)	18.45 \pm 3.09	26.67 \pm 2.86

Values are expressed as means \pm SEM; $n=6$ mice per group.

* Indicates significant difference ($p<0.05$) from control mice.

Table 4
Hepatic gene expression levels in response to cangrelor treatment. Real-time PCR was performed on separate livers of 3 h fasted mice treated or not with cangrelor (n = 6–8 males mice per group, 8–10 weeks old, chow diet). For all genes scored, mRNA expression levels were calculated relative to the average of the housekeeping gene HPRT and further normalized to the relative expression level of the respective controls, i.e. wild-type non-treated (PBS) mice.

Gene	Accession no.	Control	Cangrelor	Gene title
p2y13	NM_028808	1.00 ± 0.18	1.25 ± 0.39	P2Y purinoreceptor 13
atp5b	NM_016774	1.00 ± 0.12	0.90 ± 0.09	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
scarb1	NM_016741	1.00 ± 0.15	1.04 ± 0.14	Scavenger receptor class B, member 1
ldlr	NM_010700	1.00 ± 0.20	1.91 ± 0.23*	Low density lipoprotein receptor
abca1	NM_013454	1.00 ± 0.10	1.28 ± 0.22	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1
abcg1	NM_009593	1.00 ± 0.14	1.14 ± 0.18	ATP-binding cassette, sub-family G, member 1
apoa1	NM_009692	1.00 ± 0.13	0.80 ± 0.06	Apolipoprotein A-I
cyp7a1	NM_007824	1.00 ± 0.10	1.09 ± 0.12	Cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
cyp27a1	NM_024264	1.00 ± 0.23	1.05 ± 0.16	Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
cyp8b1	NM_010012	1.00 ± 0.35	0.85 ± 0.16	Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
abcg5	NM_031884	1.00 ± 0.34	0.59 ± 0.14	ATP-binding cassette, sub-family G, member 5
abcg8	NM_026180	1.00 ± 0.23	1.19 ± 0.10	ATP-binding cassette, sub-family G, member 8
abcb11/bsep	NM_021022	1.00 ± 0.11	1.12 ± 0.08	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
ntcp/slc10a1	NM_011387	1.00 ± 0.14	1.08 ± 0.08	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1
oatp/slc10a1	NM_013797	1.00 ± 0.13	0.98 ± 0.13	Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
hmgcr	NM_008255	1.00 ± 0.12	1.76 ± 0.40*	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
hmgcs	NM_145942.4	1.00 ± 0.19	2.13 ± 0.43*	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase
srebp2	NM_033218	1.00 ± 0.11	1.50 ± 0.17*	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
acat1	NM_144784	1.00 ± 0.04	1.04 ± 0.08	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1
acat2	NM_146064	1.00 ± 0.10	1.05 ± 0.13	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2
lcat	NM_008490	1.00 ± 0.06	1.09 ± 0.10	Lecithin cholesterol acyltransferase

Values are expressed as means ± SEM.

* Indicates significant difference (p < 0.05) from control mice.

resulting in a change in the composition of the remaining circulating HDL. However, an action of cangrelor solely on holo-HDL uptake would have altered free and esterified cholesterol content equally. In this context, the unchanged level of esterified cholesterol in HDL could be explained by the increase of plasma LCAT activity under cangrelor treatment. The mechanism by which LCAT activity is increased and how this could potentially modulate HDL metabolism as well as cholesterol flux would require further investigation. Alternatively, we cannot rule out an effect of cangrelor on the synthesis of *de-novo* HDL by the liver and/or the intestine that would translate into a change in the composition of plasma HDL. Regarding non-HDL lipoproteins, cangrelor has no effect on LDL, the composition of which being similar in treated and control mice and, beside a slight decrease observed under cangrelor treatment in VLDL cholesterol content, VLDL TG content and hepatic VLDL production remain unchanged, suggesting that in those experimental conditions cangrelor mainly acts on HDL metabolism.

Our data show that cangrelor treatment significantly increases biliary secretion of bile acid (BA) in the absence of mass changes in hepatic lipid composition. Of note, the observed increase in BA biliary secretion under cangrelor treatment does not seem to be related to an increase in the expression level of key enzymes involved in BA synthesis (cyp7a1, cyp27a1 and cyp8b1) or transporters controlling hepatic bile acid fluxes (abcb11/bsep, ntcp and oatp). Thus, it is likely an upregulation of these enzymes and transporters is not required to handle the cangrelor-mediated biliary BA secretion. However, we cannot exclude that protein level and/or activity of these enzymes and transporters are increasing under cangrelor treatment and thus further investigation is required to more precisely determine the mechanism by which cangrelor stimulates biliary BA secretion. An interesting feature is that cangrelor increases hepatic expression levels of srebp2 and its target genes HmgCoA reductase, HmgCoA synthase as well as the LDL receptor, which are considered as sensitive sensor for ER cholesterol content [23]. Thus, P2Y₁₃-mediated HDL uptake by the liver seems to drive cholesterol into pathway that serve for BA production and secretion into the bile and to redistribute intracellular cholesterol away from regulating pool in the ER without increasing hepatic cholesterol storage. The determination of the origin of cholesterol that serves for BA will require further investigations but we can hypothesize that it could be either cholesterol derived from HDL

internalized by P2Y₁₃ pathway or cholesterol derived from ER cholesterol pool.

Furthermore, the cholesterol derived from HDL that has been internalized by the P2Y₁₃ pathway is likely to use a distinct pathway of intracellular trafficking than the one internalized through SR-BI. Indeed, overexpression of SR-BI by recombinant adenovirus approaches resulted in an increase in liver cholesterol content correlated to an increase in biliary cholesterol secretion without any change in BA secretion rates [24,25].

Our present results show some similarities with our previous data obtained with bolus administration of cangrelor, such as the ability of cangrelor to stimulate hepatic HDL uptake [10]. However, we can appreciate some differences between the two experimental conditions i.e. bolus administration versus continuous delivery of cangrelor. For instance bolus injection did not modify HDL-cholesterol levels, which is decreasing under continuous delivery. This indicates that, when injected in bolus, cangrelor mainly impacts on the flux of HDL-cholesterol from peripheral cells to the liver rather than HDL particle pool size while both flux and pool size of HDL are modified under continuous delivery of cangrelor. Also, bolus injection of cangrelor promotes the secretion of all biliary lipids (cholesterol, BA and PL) [10] whereas continuous delivery of the molecule only increases biliary secretion of BA, suggesting metabolic adaptations might occur under continuous activation of P2Y₁₃. However the absence of effect of cangrelor continuous delivery on biliary secretion of other lipids is intriguing since it is usually reported that biliary BA secretion is coupled to biliary secretion of phospholipid and cholesterol [26]. Thus, further experiments targeting P2Y₁₃ in a different way, for instance by longer treatment with cangrelor (> 3 days) or by using another class of P2Y₁₃ agonist that would be more stable than cangrelor or mice model overexpressing P2Y₁₃ on hepatocytes, should bring more insight on the effect of P2Y₁₃ activation on biliary lipid secretion.

Altogether, our study suggests that P2Y₁₃ activation by cangrelor principally targets HDL metabolism in mice by stimulating hepatic HDL uptake and biliary BA excretion. Several human clinical trials using cangrelor infusion for up to 72 h have been performed, all aiming to investigate its antagonism on P2Y₁₂ in platelet biology and its potential beneficial action in preventing arterial thrombosis, but plasma lipid parameters have never been measured or reported in those studies

[12,9]. Thus, whether similar effect of cangrelor, targeting HDL metabolism, can be expected in human would need further investigation, for instance by studying the effect of cangrelor on humanized mice models such as cholesteryl ester transfer protein (CETP) transgenic mice [27].

To date, therapies that can raise HDL-cholesterol level, including fibrates, niacin or statins have major impacts on other lipid targets, like low density lipoprotein (LDL) or triglycerides (TG) and their effects on HDL are modest [28]. Over the last few years, blocking the transfer of cholesterol esters from HDL to the LDL clearance pathway by inhibiting CETP has been considered as a promising strategy to raise HDL-cholesterol [29]. However, the premature termination of phase III clinical trials of CETP inhibitors, torcetrapid and dalcetrapib, due to adverse effects or lack of clinically efficacy on lowering cardiovascular risk respectively, has led to considerable doubt about the value of raising HDL-cholesterol as a treatment for cardiovascular disease [30,31]. These results have unrevealed the complexity of HDL metabolism, supporting the concept that the flux of HDL-cholesterol is more important than steady-state concentrations for protection against atherosclerosis, with functional quality being certainly a more important consideration than the circulating quantity of HDL [32]. According to this concept, stimulation of RCT would efficiently remove excess cholesterol from the body with no effect on HDL levels, even more so decreasing HDL [33], as observed when P2Y₁₃ receptor is stimulated by continuous administration of cangrelor. Thus, increasing the activity of P2Y₁₃ should have an anti-atherogenic effect. An alternative perspective would suggest that increased activity of P2Y₁₃ should increase susceptibility to atherosclerosis by decreasing HDL-cholesterol plasma concentration. This relates to the multiple *in vitro* and *in vivo* studies that have attributed antiatherogenic properties to the HDL particle itself, such as acting as an antioxidant and preventing LDL modification [2], effects that would be diminished at reduced plasma concentrations of this lipoprotein. Analysis of atherosclerosis susceptibility on mouse model for atherosclerosis treated for longer with cangrelor or with another class of P2Y₁₃ agonists may offer an important insight into the role of P2Y₁₃ as a potentially manipulable target in atherosclerosis.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2012.12.006>.

Funding

This study was supported by the INSERM Avenir Grant, the National Research Agency (ANR Emergence and GENO #102 01) and the Midi-Pyrénées Region. LL is a recipient of the Marie Curie IEF fellowship.

Acknowledgements

We thank the technical service of the animal facility (Genotoul Anexplor Platform, Toulouse).

We thank J. Bertrand-Michel and V. Roques (MetaToul-Lipidomic Core Facility INSERM UMR 1048, France, part of Toulouse Metatoul Platform) and Eric Lacoste (Synelvia, Prologue Biotech, Labège, France) for lipidomic analysis, advice and technical assistance.

References

- [1] I.M. Singh, M.H. Shishehbor, B.J. Ansell, High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review, *JAMA* 298 (2007) 786–798.
- [2] A. von Eckardstein, M. Hersberger, L. Rohrer, Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 8 (2005) 147–152.
- [3] G.H. Rothblat, M.C. Phillips, High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport, *Curr. Opin. Lipidol.* 21 (2010) 229–238.
- [4] B. Trigatti, A. Rigotti, M. Krieger, The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 123–131.
- [5] L.O. Martinez, S. Jacquet, J.P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J.E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret, R. Barbaras, Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, *Nature* 421 (2003) 75–79.
- [6] S. Jacquet, C. Malaval, L.O. Martinez, K. Sak, C. Rolland, C. Perez, M. Nauze, E. Champagne, F. Terce, C. Gachet, B. Perret, X. Collet, J.M. Boeynaems, R. Barbaras, The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 2508–2515.
- [7] C. Malaval, M. Laffargue, R. Barbaras, C. Rolland, C. Peres, E. Champagne, B. Perret, F. Terce, X. Collet, L.O. Martinez, RhoA/ROCK 1 signalling downstream of the P2Y₁₃ ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes, *Cell. Signal.* 21 (2009) 120–127.
- [8] C. Gachet, P2 receptors, platelet function and pharmacological implications, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 466–472.
- [9] R.F. Storey, Pharmacology and clinical trials of reversibly-binding P2Y₁₂ inhibitors, *Thromb. Haemost.* 105 (Suppl.) (2011) S75–S81.
- [10] A.C. Fabre, C. Malaval, A. Ben Addi, C. Verdier, V. Pons, N. Serhan, L. Lichtenstein, G. Combes, T. Huby, F. Briand, X. Collet, N. Nijstad, U.J. Tietge, B. Robaye, B. Perret, J.M. Boeynaems, L.O. Martinez, P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport, *Hepatology* 52 (2010) 1477–1483.
- [11] B.L. Trigatti, M. Krieger, A. Rigotti, Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1732–1738.
- [12] R.F. Storey, K.G. Oldroyd, R.G. Wilcox, Open Multicentre Study of the P2T Receptor Antagonist AR-C69931MX Assessing Safety, Tolerability and Activity in Patients with Acute Coronary Syndromes, 2001.
- [13] E.G. Blygh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [14] C. Vieu, B. Jaspard, R. Barbaras, J. Manent, H. Chap, B. Perret, X. Collet, Identification and quantitation of diacylglycerols in HDL and accessibility to lipase, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 1153–1161.
- [15] R. Barbaras, X. Collet, H. Chap, B. Perret, Specific binding of free apolipoprotein A-I to a high-affinity binding site on HepG2 cells: characterization of two high-density lipoprotein sites, *Biochemistry* 33 (1994) 2335–2340.
- [16] S. Kunnen, M. Van Eck, Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J. Lipid Res.* 53 (2012) 1783–1799.
- [17] N. Wang, T. Arai, Y. Ji, F. Rinninger, A.R. Tall, Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32920–32926.
- [18] Y. Ueda, L. Royer, E. Gong, J. Zhang, P.N. Cooper, O. Francone, E.M. Rubin, Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7165–7171.
- [19] D.L. Silver, N. Wang, X. Xiao, A.R. Tall, High density lipoprotein (hdl) particle uptake mediated by scavenger receptor class b type 1 results in selective sorting of hdl cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25287–25293.
- [20] M. Van Eck, J. Twisk, M. Hoekstra, B.T. Van Rij, C.A. Van der Lans, I.S. Bos, J.K. Kruijt, F. Kuipers, T.J. Van Berkel, Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23699–23705.
- [21] T.J. Nieland, M. Ehrlich, M. Krieger, T. Kirchhausen, Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI, *Biochim. Biophys. Acta* 1734 (2005) 44–51.
- [22] B. Sun, E.R. Eckhardt, S. Shetty, D.R. van der Westhuyzen, N.R. Webb, Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 1700–1713.
- [23] J.L. Goldstein, R.A. DeBose-Boyd, M.S. Brown, Protein sensors for membrane sterols, *Cell* 124 (2006) 35–46.
- [24] K.F. Kozarsky, M.H. Donahee, A. Rigotti, S.N. Iqbal, E.R. Edelman, M. Krieger, Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels, *Nature* 387 (1997) 414–417.
- [25] H. Wiersma, A. Gatti, N. Nijstad, R.P. Oude Elferink, F. Kuipers, U.J. Tietge, Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice, *Hepatology* 50 (2009) 1263–1272.
- [26] A.A. Hışmioğullari, A.M. Bozdayi, K. Rahman, Biliary lipid secretion, *Turk. J. Gastroenterol.* 18 (2007) 65–70.
- [27] M. El Bouhassani, S. Gilibert, M. Moreau, F. Saint-Charles, M. Treguier, F. Poti, M.J. Chapman, W. Le Goff, P. Lesnik, T. Huby, M. Tréguier, Cholesteryl ester transfer protein expression partially attenuates the adverse effects of SR-BI receptor deficiency on cholesterol metabolism and atherosclerosis, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17227–17238.
- [28] T. Joy, R.A. Hegele, Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 143–155.
- [29] D.E. Gutstein, R. Krishna, D. Johns, H.K. Surks, H.M. Dansky, S. Shah, Y.B. Mitchel, J. Arena, J.A. Wagner, Anacetrapib, a novel CETP inhibitor: pursuing a new approach to cardiovascular risk reduction, *Clin. Pharmacol. Ther.* 91 (2012) 109–122.
- [30] A. Kontush, M. Guerin, M.J. Chapman, Spotlight on HDL-raising therapies: insights from the torcetrapib trials, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5 (2008) 329–336.
- [31] D. Rhainds, B.J. Arsenaault, M.R. Brodeur, J.-C. Tardif, An update on the clinical development of dalcetrapib (RO4607381), a cholesteryl ester transfer protein modulator that increases HDL cholesterol levels, *Future Cardiol.* 8 (2012) 513–531.
- [32] S.J. Nicholls, HDL: still a target for new therapies? *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9 (2008) 950–956.
- [33] G.A. Francis, The complexity of HDL, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 1286–1293.

1.3- Implication du récepteur P2Y₁₃ dans le développement de l'athérosclérose (en révision dans Nutrition & Metabolism)

1.3.1- Article 3 : Introduction

Nous avons vu que le récepteur P2Y₁₃ est un acteur essentiel dans le transport retour de cholestérol. Les souris invalidées pour ce récepteur présentent une diminution de l'endocytose hépatique des HDL ainsi qu'une diminution des sécrétions de lipides biliaires, associée à une diminution de transport retour de cholestérol des macrophages vers les fèces (Fabre et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que P2Y₁₃ pourrait jouer un rôle athéroprotecteur.

L'absence de SR-BI, un autre récepteur impliqué dans l'endocytose hépatique du cholestérol, se traduit par une diminution de la captation sélective de cholestérol ester transporté par les HDL, ainsi qu'une baisse des sécrétions biliaires en cholestérol. L'inactivation de SR-BI chez la souris se traduit, comme dans le cas de l'inactivation du P2Y₁₃, par une baisse du transport retour du cholestérol des macrophages vers les fèces. Les souris SR-BI^{-/-} développent des plaques d'athérome significativement supérieures aux souris sauvages lorsqu'elles sont placées sous un régime hypercholestérolémiant (Huby et al., 2006)(Kozarsky et al., 2000)(YuZhen Zhang et al., 2005). Contrairement à ces souris, les souris P2Y₁₃^{-/-} ne présentent aucune modification de leurs concentrations en lipides et lipoprotéines plasmatiques, suggérant i) soit que le flux de cholestérol dépendant de l'endocytose *via* P2Y₁₃ est qualitativement important pour le catabolisme hépatobiliaire du cholestérol et le RCT mais quantitativement négligeable du point de vue du taux circulant de HDL, ii) soit l'existence de mécanismes compensatoires comme le suggère l'augmentation transcriptionnelle de ABCA1 et ABCG1 au niveau hépatique (Fabre et al., 2010), qui pourrait compenser la baisse de captation hépatique en favorisant la néo-synthèse de HDL.

Dans la continuité de notre travail, nous avons étudié l'implication du récepteur P2Y₁₃ dans le développement de l'athérosclérose. Les souris SR-BI KO développent des plaques d'athérome lorsqu'elles sont placées sous un régime hypercholestérolémiant sur une durée de 11 semaines. Ainsi pour tester l'effet de l'inactivation du récepteur P2Y₁₃ sur l'initiation du développement de l'athérosclérose, nous avons opté pour un régime hypercholestérolémiant (1.25% de cholestérol et 6% de gras) pendant 16 semaines.

Lack of P2Y₁₃ results in decreased hepatic cholesterol content and biliary lipid secretion in mice fed a high cholesterol diet.

Nizar Serhan^{1,2}, Laetitia Lichtenstein^{1,2,§}, Wijtske Annema³, Guillaume Combes^{1,2}, Bernard Robaye⁴, Jean-Marie Boeynaems⁴, Bertrand Perret^{1,2}, Uwe J.F. Tietge³, Muriel Laffargue^{1,2} and Laurent O. Martinez^{1,2}

¹INSERM, UMR 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, 31000, France,

²Université de Toulouse III, UMR 1048, Toulouse, 31300 France,

³Department of Pediatrics, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands,

⁴Institute of Interdisciplinary Research, IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium.

Corresponding author:

Laurent O. Martinez, INSERM U1048, Bât. L3, Hôpital Rangueil, BP 84225,
31432 Toulouse cedex 04, France.

Tel: + 33 531 224 147; Fax: +33 561 325 616; E-mail: Laurent.Martinez@inserm.fr.

[§]**Authorship note:** Nizar Serhan and Laetitia Lichtenstein equally contributed to this work.

ABSTRACT

Background. The protective effect of HDL is mostly attributed to their metabolic function in reverse cholesterol transport (RCT), a process whereby excess cellular cholesterol is taken up from peripheral cells, processed in HDL particles, and later delivered to the liver for further metabolism and biliary secretion. Mechanistically, the purinergic P2Y₁₃ ADP-receptor is involved in hepatic HDL endocytosis (i.e., uptake of both HDL protein + lipid moieties), which is considered as an important step of RCT. Accordingly, chow-fed P2Y₁₃ knockout (P2Y₁₃^{-/-}) mice exhibit lower hepatic HDL uptake, which translates into a decrease of hepatic free cholesterol content and biliary cholesterol and phospholipids secretion.

Findings. The aim of this study was to determine the effect of high cholesterol diet (HCD) in P2Y₁₃^{-/-} mice, in order to mimic high dietary cholesterol intake, which is a major cause of dyslipidemia in humans. As previously reported with chow-diet, HCD did not affect plasma lipid level in P2Y₁₃^{-/-} compared with control mice but decreased hepatic free and esterified cholesterol content ($p < 0.05$, P2Y₁₃^{-/-} versus control). Interestingly, biliary lipid secretion was more dramatically impaired in P2Y₁₃^{-/-} mice fed a HCD than chow-diet. HCD did not enhance atherosclerosis in P2Y₁₃^{-/-} compared with controls mice.

Conclusion. This study demonstrates that high dietary cholesterol intake accentuated the metabolic phenotype of P2Y₁₃^{-/-} mice, with impaired hepatobiliary lipid secretion. Although other animal models might be required to further evaluate the role of P2Y₁₃ in atherosclerosis, P2Y₁₃ appears a promising target for therapeutic intervention aiming to stimulate RCT, particularly in individuals with lipid-rich diet.

KEYWORDS (3 to 10)

P2Y₁₃, HDL, HDL-uptake, High Cholesterol Diet, bile lipid secretions, Reverse Cholesterol Transport, cholesterol metabolism, liver.

FINDINGS

INTRODUCTION / RESEARCH HYPOTHESIS

Dyslipidemia, reflected by either high triglyceride and cholesterol plasma concentrations, is a major risk factor of atherosclerosis [1]. The risk of atherosclerosis, a leading cause of cardiovascular disease and death, is inversely correlated to plasma high-density lipoprotein (HDL) cholesterol. The protective effect of HDL-cholesterol is mostly attributed to its central function in Reverse Cholesterol Transport (RCT), a process whereby excess cholesterol is taken up to be processed in HDL particles, and later delivered to the liver for further metabolism and biliary excretion. This process, which represents a major pathway of the body to eliminate proatherogenic cholesterol, relies on specific interactions between HDL particles and cells, both peripheral (cholesterol efflux) and hepatic cells (cholesterol output). We recently identified a new pathway for holoparticle HDL endocytosis by the liver (i.e., hepatic uptake of both HDL protein + lipid moieties), involved in RCT. In this pathway, apoA-I, the major protein of HDL, binds an ecto-F₁-ATPase leading to ATP hydrolysis into ADP [2]. Extracellular ADP activates the purinergic P2Y₁₃ ADP-receptor, which stimulates *in fine* HDL uptake through an unknown low affinity receptor, distinct from the classical HDL receptor, SR-BI. Our recent work has confirmed the role of the P2Y₁₃ receptor in HDL-mediated RCT *in vivo* [3]. We showed that P2Y₁₃-deficient mice (P2Y₁₃^{-/-}) exhibited a decrease in hepatic HDL-cholesterol uptake, hepatic cholesterol content, and biliary cholesterol output, although their plasma HDL and other lipid levels were normal. These metabolic changes translated into a substantial decrease in the rate of macrophage-to-feces RCT. Therefore, key features of RCT are impaired in P2Y₁₃^{-/-} mice.

In order to investigate the role of P2Y₁₃ in a dyslipidemic context, we studied the phenotype of P2Y₁₃^{-/-} mice fed high cholesterol diet (HCD) for 16 weeks. Our results show that chronically increased cholesterol intake accentuates the metabolic phenotype of P2Y₁₃^{-/-} mice, with impaired hepatobiliary metabolism. Specifically, (i) hepatic HDL uptake mediated by P2Y₁₃ plays an important role in regulating liver cholesterol content, (ii) P2Y₁₃ receptor is essential for normal biliary lipid secretions, (iii) These effects of P2Y₁₃ activity on the flux of HDL-cholesterol toward the liver does not affect HDL levels per se or HDL functions. Overall, this work emphasizes the essential role of P2Y₁₃ in RCT in a dyslipidemic context.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Diets. The animals were caged in an animal facility with alternating 12h periods of light (07:00 am-7:00 pm) and dark (7:00 pm-07:00 am). 8 week-old male P2Y₁₃^{-/-} and P2Y₁₃^{+/+} littermates mice (C57BL/6 background) were fed for 16 weeks a high cholesterol diet (Harlan TD 96335). All animal procedures were in accordance with the guidelines of the Committee on Animals of the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license.

Plasma lipoprotein analyses. Plasma samples were collected from 3h-fasted mice. Total cholesterol and triglycerides were measured with commercial kits (CHOD-PAP for cholesterol and GPO-PAP for triglycerides; BIOLABO SA, Maizy, France). Quantification of plasma lipoproteins was performed using an Ultimate® 3000 HPLC system (Dionex, USA) as previously described [4].

Hepatic lipid analyses. Hepatic cholesterol and triglycerides were analyzed as previously described [3].

Cannulation of the Common Bile Duct and bile lipid analysis. 8 weeks old mice (n ≥ 8 per group) were fasted for 3 hours and were then anesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. Gallbladder cannulation as well as bile acid, phospholipid and cholesterol analysis was performed as previously reported [4].

Hepatic gene expression. Liver RNA isolation, reverse transcription and real-time quantitative PCR analysis were performed as previously described [4].

HDL functionality. Anti-oxidative properties, anti-inflammatory properties of HDL, and cholesterol efflux measurements were assessed as previously described [5].

Aortic sinus quantization. The lesions were estimated according to Paigen and collaborators [6] Briefly, each heart was frozen on a cryostat mount with OCT compound (Tissue-Tek), and stored at -80°C. Hearts were cut using a Leica CM3050S cryostat. Aortic sinus sections were stained with oil red O and counterstained with Mayer's hematoxylin.

Statistical analysis. All results are presented as means ± SEM. Comparisons between groups were made using the Mann-Whitney test for independent samples. Outcomes of p < 0.05 were considered significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 6 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Since Dueland et al. reported that HCD increases plasma HDL in C57BL/6 mice [7], we addressed the question whether P2Y₁₃ deletion would influence HDL plasma levels after 16 weeks of HCD. Plasma total cholesterol, HDL-C, LDL-C and triglycerides in P2Y₁₃^{-/-} mice did not differ from wild-type (WT, C57BL/6) mice (Table 1). Body weight and liver weight were unchanged between P2Y₁₃^{-/-} and WT mice (data not shown). However, as summarized in Table 2, liver total cholesterol content was significantly lower in P2Y₁₃^{-/-} mice with decreases in both cholesterol ester and free cholesterol, most likely attributable to the described role of P2Y₁₃ in HDL hepatic uptake [3,8]. RCT allows peripheral excessive cholesterol to be transported back to the liver for final secretion into the bile [9]. As such, biliary cholesterol secretion is an essential step in RCT [10]. To assess a potential effect of P2Y₁₃ on biliary lipid secretion, we collected bile for 30 min subsequent to gallbladder cannulation. Biliary flow was significantly decreased, and biliary secretions of cholesterol, bile acids and phospholipids were also significantly reduced in P2Y₁₃^{-/-} mice after 16 weeks of HCD (Table 3). Interestingly, P2Y₁₃ deficiency seems to decrease biliary lipid secretion in mice after 16 weeks of HCD in a more dramatic way than previously observed with chow diet feeding [3].

Of note, P2Y₁₃ deficiency results in a ~40% decrease of hepatic messenger RNA (mRNA) expression of the heterodimeric ATP-binding transporter *abcg5* and *abcg8* (Table 4), suggesting that the cholesterol derived from HDL that has been internalized through P2Y₁₃ receptor might use the *abcg5/g8* dependent pathway for apical biliary cholesterol secretion [11]. However, hepatic gene expression of the other transporters controlling bile acid and phospholipid fluxes in the liver, such as biliary phospholipid transport protein (*abcb4/mdr3*), bile salt export pump (*abcb11/bsep*), basolateral transporter sodium taurocholate cotransporting polypeptide (*ntcp*) and organic anion transport polypeptide (*oatp*), were unchanged, indicating that further investigation is required to determine the mechanism by which P2Y₁₃-mediated HDL endocytosis regulates biliary lipid secretion process. Indeed, although recent studies evidenced that HDL internalized by hepatocytes are transported to two intracellular pools – a rapid turnover retroendocytic pool involving endosomal recycling compartment (ERC) and a slow-turnover pool, involving multivesicular bodies, that is eventually further transported to lysosomes for degradation [12], the process by which intracellular HDL trafficking governs biliary lipid secretion is still poorly characterized.

Interestingly, mRNA expression of *de novo* HDL formation genes, *abca1* and *abcg1*, which

contribute to cellular cholesterol efflux towards lipid-poor apoA-I and HDL particles, respectively [11], was significantly decreased in P2Y₁₃^{-/-} mice after 16 weeks of HCD (Table 4). These results might suggest that the decrease of hepatobiliary cholesterol secretion observed in P2Y₁₃^{-/-} mice fed a HCD is associated with a decrease of *de novo* HDL synthesis, thus explaining the unchanged plasma HDL-cholesterol levels *per se*, as previously proposed for P2Y₁₃^{-/-} mice fed a chow diet [3]. Alternatively, the P2Y₁₃-mediated HDL endocytosis pathway might efficiently drive cholesterol from HDL towards biliary lipid secretions but could be quantitatively negligible regarding the steady state concentration of plasma HDL. Accordingly, it is now well established that macrophage-derived cholesterol represents only a minor proportion of the cholesterol transported by HDL particles but is essential to prevent foam cell formation [14] supporting the concept that the dynamics of HDL particles are essential for RCT but not necessary correlated to the static measure of plasma HDL concentration.

To assess HDL functionality in these mice, we tested whether P2Y₁₃ deletion would influence HDL functionalities regarding either their anti-inflammatory or anti-oxidative functions, or their capacity to elicit efflux from cholesterol-loaded macrophages. However, P2Y₁₃-deficient mice did not show any change in these respective HDL functionalities after 16 weeks of HCD (Figure 1), suggesting that P2Y₁₃ deletion neither interferes with HDL pleiotropic functions, nor HDL-mediated efflux from cholesterol-loaded macrophages. Furthermore, feeding the HCD for 16 weeks did not result in an increased lipid deposition in the aortic sinus of P2Y₁₃^{-/-} compared to WT mice (Figure 2). Not surprisingly, these results indicate that P2Y₁₃ deletion in C57BL/6 mice does not initiate atherosclerosis development. To formally assess the hypothesis whether P2Y₁₃ receptor plays a role in atherosclerosis development, mice lacking P2Y₁₃ would have to be crossed with a proatherogenic mouse model.

We previously demonstrated the importance of P2Y₁₃ in RCT, mainly due to its role in HDL endocytosis by the liver [3, 8]. Indeed, chow-fed P2Y₁₃ deficient mice display impaired hepatic HDL uptake and biliary cholesterol and phospholipid secretion [3]. In the present study, we observed that a chronic high cholesterol intake accentuates this hepatobiliary phenotype. Overall, our work emphasizes the importance of P2Y₁₃ activity in hypercholesterolemia, by regulating biliary lipid output without affecting HDL levels *per se* or HDL functions. This supports the emerging concept that mechanisms regulating HDL metabolism do not necessarily have an effect on HDL steady state levels. Thus, this study open the way to reconsider pharmacological approaches to target HDL metabolism,

particularly with regard to mechanistic aspects of RCT, by improving the flux of circulating HDL towards the liver (e.g., by stimulating P2Y₁₃) rather than increasing plasma HDL levels.

LIST OF ABBREVIATIONS

HDL: High Density Lipoprotein

LDL: Low Density Lipoprotein

ApoA-I: apolipoprotein A-I

HCD: High Cholesterol Diet

RCT: Reverse Cholesterol Transport

Ecto-F₁ATPase: ectopic F₁-ATPase

ATP: Adenosine triphosphate

ADP: Adenosine Diphosphate

Abca1: ATP binding cassette subfamily A member 1

Abcb4: ATP binding Cassette subfamily B member 4

Abcg1: ATP binding cassette subfamily G member 1

Abcg5: ATP binding Cassette subfamily G member 5

Abcg8: ATP binding Cassette subfamily G member 8

Oatp: organic anion transport polypeptide

Ntcp: sodium taurocholate cotransporting polypeptide

WT: wild-type

COMPETING INTERESTS

None.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

LOM conceived the study and participated in its design and coordination. BR and JMB conceived P2Y₁₃ knockout mice and participated in the design of the study. NS, LL and GC carried out animal metabolic studies and participated in the design of the study. WA and UJFT carried out HDL functionality assays and analyzed the data. LOM, NS and LL have interpreted the overall data and drafted the manuscript. BP and ML revised the manuscript critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technical service of the animal facility (Genotoul Anexplo Platform, Toulouse). We thank J. Bertrand-Michel and V. Roques (MetaToul-Lipidomic Core Facility INSERM UMR 1048, France, part of Toulouse Metatoul Plateform) and Eric Lacoste (Synelvia, Prologue Biotech, Labège, France) for lipidomic analysis, advice and technical assistance.

FUNDING

This study was supported by the National Research Agency (ANR Emergence and GENO #102 01) and the Midi-Pyrénées Region. LL is a recipient of the Marie Curie IEF fellowship.

REFERENCES

1. Pöss J, Custodis F, Werner C, Weingärtner O, Böhm M LU: **Cardiovascular disease and dyslipidemia: beyond LDL.** *Curr Pharm Des* 2011, **17** (9):861–70.
2. Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, Pineau T, Georgeaud V, Walker JE, Terce F, Collet X, Perret B, Barbaras R: **Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis.** *Nature* 2003, **421** (6918):75–9.
3. Fabre AC, Malaval C, Ben Addi A, Verdier C, Pons V, Serhan N, Lichtenstein L, Combes G, Huby T, Briand F, Collet X, Nijstad N, Tietge UJF, Robaye B, Perret B, Boeynaems JM, Martinez, LO: **P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport.** *Hepatology* 2010, **52** (4):1477–83.
4. Serhan N, Cabou C, Verdier C, Lichtenstein L, Malet N, Perret B, Laffargue M, Martinez LO: **Chronic pharmacological activation of P2Y13 receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion.** *Biochimica et biophysica acta* 2013, **1831** (4):719–25.
5. Nijstad N, de Boer JF, Lagor WR, Toelle M, Usher D, Annema W, Van der Giet M, Rader DJ, Tietge UJF: **Overexpression of apolipoprotein O does not impact on plasma HDL levels or functionality in human apolipoprotein A-I transgenic mice.** *Biochimica et biophysica acta* 2011 **1811** (4):294–9.
6. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D WR: **Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice.** *Atherosclerosis* 1987, **68** (3):231–40.
7. Dueland S, France D, Wang SL, Trawick JD, Davis R a: **Cholesterol 7alpha-hydroxylase influences the expression of hepatic apoA-I in two inbred mouse strains displaying different susceptibilities to atherosclerosis and in hepatoma cells.** *Journal of lipid research* 1997, **38** (7):1445–53.
8. Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, Sak K, Rolland C, Perez C, Nauze M, Champagne E, Terce F, Gachet C, Perret B, Collet X, Boeynaems JM, Barbaras R: **The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis.** *Cell Mol Life Sci.* 2005, **62** (21):2508–15.
9. DeGoma EM, DeGoma RL, Rader DJ: **Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels evaluating high-density lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches.** *Journal of the American College of Cardiology* 2008, **51** (23):2199–211.
10. Nijstad N, Gautier T, Briand F, Rader DJ, Tietge UJF: **Biliary sterol secretion is required for functional in vivo reverse cholesterol transport in mice.** *Gastroenterology* 2011, **140** (3):1043–51.
11. Dijkers A, Freak de Boer J, Annema W, Groen AK, Tietge UJF: **Scavenger receptor BI and ABCG5/G8 differentially impact biliary sterol secretion and reverse cholesterol transport in mice.** *Hepatology* 2013, **58** :293–303.
12. Röhrl C, Pagler TA, Ellinger A, Pavelka M, Meisslitzer-ruppitsch C : **Group Characterization of endocytic compartments after holo-high density lipoprotein particle uptake in HepG2 cells.** *Histochem Cell Biol* 2011, **133** :261–272.
13. Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A: **Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1.** *Biochimica et biophysica acta* 2006, **1761** (7):655–66.
14. Haghpassand M, Bourassa PK, Francone OL, Aiello RJ: **Monocyte / macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels.** *J Clin Invest* 2001, **108** :1315–1320.

FIGURE LEGEND

Figure 1. P2Y₁₃ depletion does not change the functional properties of HDL on HCD.

HDL function was determined as cholesterol efflux (A and B), protection of HUVECs against inflammation (C), protection of LDL against oxidation (D). Data are presented as means \pm SEM, n=10 mice per group.

Figure 2. P2Y₁₃ depletion does not induce atherosclerosis development on HCD.

Aortic sinus sections were stained with oil red O and lipid content was quantified. Data are presented as means \pm SEM, n=10 mice per group.

Table 1. Plasma lipid values in P2Y₁₃^{+/+} (WT) and P2Y₁₃^{-/-} mice fed a HCD for 16 weeks.

	VLDL		LDL		HDL	
	WT	P2Y ₁₃ ^{-/-}	WT	P2Y ₁₃ ^{-/-}	WT	P2Y ₁₃ ^{-/-}
TC (mg/dl)	14.1 ± 1.92	12.2 ± 3.42	25.1 ± 1.31	18.5 ± 0.34	85.01 ± 16.9	90.62 ± 8.88
FC (mg/dl)	4.55 ± 0.71	3.31 ± 0.76	10.3 ± 4.57	6.00 ± 0.20	33.58 ± 2.56	29.45 ± 2.80
EC (mg/dl)	9.86 ± 1.48	8.93 ± 2.65	14.8 ± 3.06	12.5 ± 0.29	53.33 ± 14.2	61.49 ± 6.1
TG (mg/dl)	24.6 ± 1.27	23.5 ± 4.52	7.26 ± 1.05	9.43 ± 1.66	6.75 ± 2.23	2.45 ± 0.27

Values are expressed as means ± SEM; n=4 mice per group.

Table 2. Hepatic lipid values in P2Y₁₃^{+/+} (WT) and P2Y₁₃^{-/-} mice fed a HCD for 16 weeks.

	WT	P2Y ₁₃ ^{-/-}
Total cholesterol (nmol/mg)	67.11 ± 3.84	50.50 ± 2.53*
Free cholesterol (nmol/mg)	13.28 ± 0.96	9.653 ± 0.54*
Esterified cholesterol (nmol/mg)	53.41 ± 3.37	29.71 ± 2.42*
Triglycerides (nmol/mg)	30.69 ± 3.76	18.48 ± 0.37

Values are expressed as means ± SEM; n=10 mice per group.

*Indicates significant difference (p<0.05) from control mice.

Table 3. Biliary lipid values in P2Y₁₃^{+/+} (WT) and P2Y₁₃^{-/-} mice fed a HCD for 16 weeks.

	WT	P2Y ₁₃ ^{-/-}
Bile flow (µl/min/100g BW)	5.58 ± 0.42	4.35 ± 0.26*
Cholesterol secretion (nmol/min/100g BW)	3.79 ± 0.27	2.71 ± 0.36*
Bile acid secretion (nmol/min/100g BW)	209.9 ± 16.0	167.1 ± 10.2*
Phospholipid secretion (nmol/min/100g BW)	15.7 ± 0.2	9.7 ± 0.2*

Values are expressed as means ± SEM; n=10 mice per group.

*Indicates significant difference (p<0.05) from control mice.

Table 4. Effect of HCD in P2Y₁₃^{-/-} mice on hepatic mRNA expression of genes involved in lipid homeostasis.

Gene		Fold-Change	Accession N°	Gene Title
scarb1	1.00 ± 0.12	0.86 ± 0.10	NM_016741	Scavenger receptor class B, member 1
ldlr	1.00 ± 0.17	1.02 ± 0.15	NM_010700	Low density lipoprotein receptor
abca1	1.00 ± 0.16	0.59 ± 0.05*	NM_013454	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1
abcg1	1.00 ± 0.10	0.68 ± 0.07*	NM_009593	ATP-binding cassette, sub-family G, member 1
apoa1	1.00 ± 0.10	0.97 ± 0.07	NM_009692	Apolipoprotein A-I
cyp7a1	1.00 ± 0.23	1.61 ± 0.24	NM_007824	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
cyp27a1	1.00 ± 0.13	1.11 ± 0.13	NM_024264	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
cyp8b1	1.00 ± 0.22	1.64 ± 0.26	NM_010012	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
abcg5	1.00 ± 0.12	0.64 ± 0.05*	NM_031884	ATP-binding cassette, sub-family G, member 5
abcg8	1.00 ± 0.10	0.61 ± 0.07**	NM_026180	ATP-binding cassette, sub-family G, member 8
abcb4	1.00 ± 0.07	0.74 ± 0.08	NM_008830	ATP-binding cassette, sub-family G, member 4
abcb11/ bsep	1.00 ± 0.11	1.33 ± 0.10	NM_021022	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
ntcp/ slc10a1	1.00 ± 0.22	1.51 ± 0.17	NM_011387	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1
oatp/ slco1a1	1.00 ± 0.16	1.33 ± 0.19	NM_013797	Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
hmgcr	1.00 ± 0.01	1.02 ± 0.09	NM_008255	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
srebp2	1.00 ± 0.09	0.74 ± 0.07	NM_033218	Sterol regulatory element binding transcription factor 2

Real-time PCR was performed on individual livers of 3h fasted mice (n=10 mice per group). For all genes, the fold change was calculated by dividing the P2Y₁₃^{-/-} mice value by the wild-type mice value (e.g. an increase of 80% from wild-type is reported as 1.80). *and ** indicate significant difference (p<0.05 and p<0.01 respectively) from wild-type mice.

Figure 1.

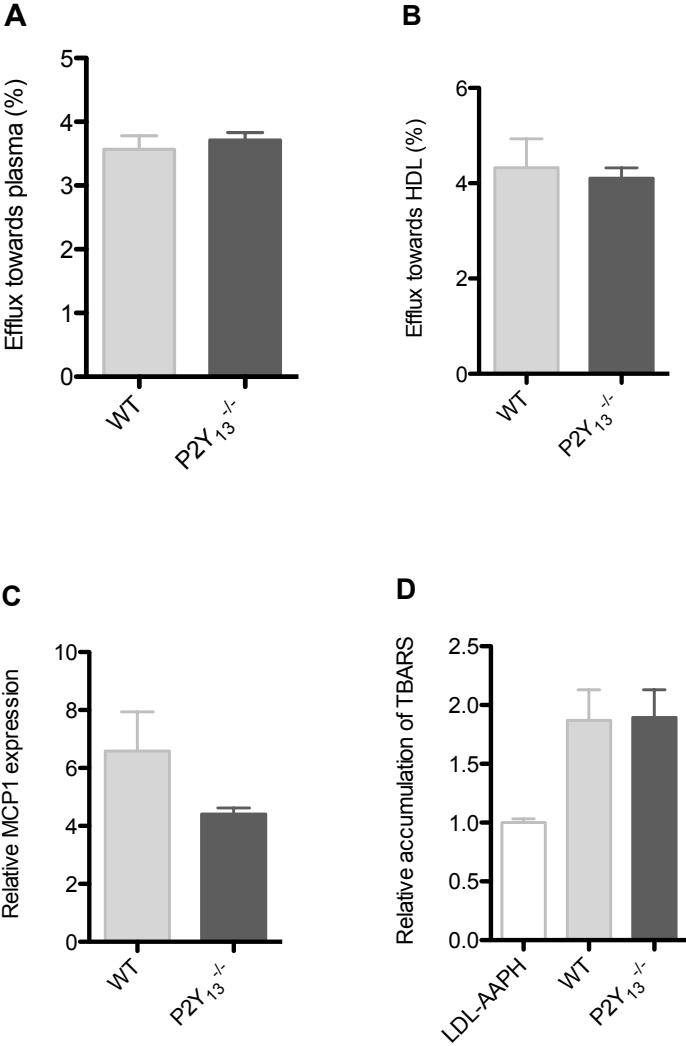
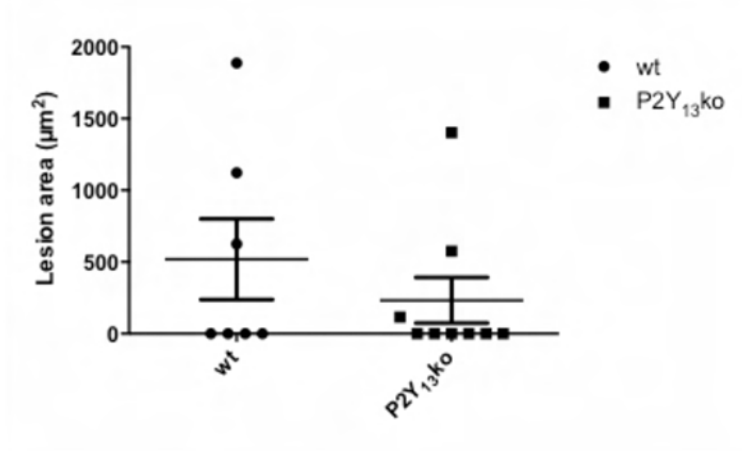


Figure 2.



1.4- Impact de l'inactivation de P2Y₁₃ sur fond apoE^{-/-} sur le développement de l'athérosclérose (En préparation pour soumission dans Hepathology)

1.4.1-Introduction

Nous avons décrit un rôle critique du récepteur P2Y₁₃ dans le RCT (cf. article 1 et 2). Cependant, son implication dans le développement de l'athérosclérose n'est pas encore connue, et n'a pas pu être mise en évidence sur fond C57Bl/6. Nous avons donc entrepris d'étudier l'impact de la délétion du récepteur P2Y₁₃ sur le métabolisme du cholestérol et le développement de l'athérosclérose sur une lignée murine susceptible à l'athérosclérose : les souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (C57Bl/6 apoE^{-/-}). Les souris apoE^{-/-} présentent un profil pro-athérogène caractérisé par une accumulation de lipoprotéines VLDL et LDL et un taux de HDL fortement diminué. Ce profil favorise le développement des lésions d'athérosclérose sous régime normolipidique (chow diet), dès l'âge de 12 semaines (cf. chapitre I paragraphe 3.2.1.3). Le phénotype des souris doublement invalidées pour le P2Y₁₃ et l'apoE (apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-}) a donc été analysé à l'âge de 15 semaines sous régime normolipidique. Dans ces conditions, les souris apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} ont des sécrétions de lipides biliaires diminuées et présentent une diminution d'excrétion de cholestérol et d'acides biliaires dans les fèces comparées aux souris contrôles apoE^{-/-}. De manière inattendu, les taux plasmatiques de HDL-C et LDL-C sont diminués chez les souris apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Ce résultat surprenant pourrait s'expliquer par une augmentation de l'expression hépatique des récepteurs SR-BI et LDLr (ARNm et protéine), observée chez les souris apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-}. Sur ce modèle, nous avons également observé une augmentation de la captation sélective du cholestérol ester des HDL par le foie, ce qui reflèterait une activité plus importante du récepteur SR-BI. Ainsi, il semblerait que ces mécanismes de compensation possibles *via* SR-BI et LDLr, qui favorisent un phénotype plasmatique anti-athérogène (baisse du LDL-C, augmentation de la captation sélective de CE), ne suffisent pas à compenser l'impact pro-athérogène de l'inactivation de P2Y₁₃ sur le métabolisme hépatobiliaire du cholestérol (baisse de l'excrétion du cholestérol), qui *in fine* se traduit par une augmentation des lésions d'athérosclérose d'environ 30% chez les souris apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} par rapport aux souris contrôles apoE^{-/-}.

1.4.1 Article 4

P2Y₁₃ receptor deficiency in apoE knockout mice causes impaired hepatobiliary lipid excretion and promotes atherosclerosis.

Laeticia Lichtenstein^{1,2}, Nizar Serhan^{1,2}, Aurélie Fabre^{1,2}, Bernard Robaye³, Jean-Marie Boyenaems³, Cendrine Cabou^{1,2,4}, Bertrand Perret^{1,2}, Muriel Laffargue^{1,2} and Laurent O. Martinez^{1,2}

¹INSERM, UMR 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, 31000, France,

²Université de Toulouse III, UMR 1048, Toulouse, 31300, France

³Institute of Interdisciplinary Research, IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

⁴Faculté de Pharmacie, Toulouse, 31062, France

Corresponding author:

Laurent O. Martinez, INSERM U1048, Bât. L3, Hôpital Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 04, France.

Tel: + 33 531 224 147; Fax: +33 561 325 616; E-mail: Laurent.Martinez@inserm.fr.

ABSTRACT

Background and aim: The protective effect of high-density lipoproteins (HDL) on atherosclerosis is mainly due to their metabolic function in reverse cholesterol transport (RCT), a process in which excess cholesterol from peripheral tissues is taken up by HDL particles that deliver it to the liver for further metabolism and bile excretion. Uptake of HDL holoparticle (protein + lipid) by the liver occurs independently of the selective cholesterol uptake mediated by SR-BI and involves the purinergic ADP-receptor P2Y₁₃. In this context, hepatobiliary RCT was shown to be impaired in P2Y₁₃ knockout mice (P2Y₁₃ KO) and the aim of the present study was to assess whether P2Y₁₃ deficiency could affect atherosclerosis development.

Methods: P2Y₁₃ KO were crossbred with apoE KO mice, which are a model for atherosclerosis and the phenotype of these mice fed on chow diet was analysed regarding cholesterol metabolism and atherosclerosis development at 15 weeks of age.

Results: We observed that biliary lipid secretions were impaired in apoE x P2Y₁₃ double knockout mice (dKO) when compared to control apoE KO mice and this metabolic phenotype was correlated to an increase in atherosclerotic lipid lesion formation. Unexpectedly, dKO mice had significant lower HDL-cholesterol levels compared to apoE KO, together with a slight but not significant decrease of non-HDL-cholesterol. Interestingly, hepatic gene and protein expression of SR-BI and LDL receptors were upregulated in dKO, suggesting these two lipoprotein receptors might compensate P2Y₁₃ deficiency on lipoprotein levels by increasing hepatic lipoprotein uptake.

Conclusions: Altogether, our results suggest that impaired P2Y₁₃-mediated HDL uptake by the liver is coupled to a decrease of biliary lipid excretion, which translates into an increase of atherosclerosis development on apoE KO background. This phenotype might be partially compensated by an upregulation of hepatic SR-BI and LDL receptors, which would decrease plasma lipoprotein levels (mainly HDL-C) but not sufficiently to compensate the dramatic effect of P2Y₁₃ deficiency on biliary lipid secretions and atherosclerosis development.

1. INTRODUCTION

Atherosclerosis is a multifactorial physiopathologic causation, involving genetic and environmental risk factors. Several large prospective studies have established that high-density lipoprotein (HDL) cholesterol is an independent negative risk factor for coronary artery disease and thus represents a major protective factor against atherosclerosis (Gordon et al., 1989). The protective effect of HDLs is mostly attributed to their central functions in reverse cholesterol transport (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up and processed in HDL particles, and is later delivered to the liver for further metabolism and bile excretion. RCT relies on specific interactions between HDL particles and cells. To date, two pathways for HDL uptake by the liver have been identified. The first one involve the Scavenger Receptor class B type I (SR-BI) that mediate the selective uptake of cholesterol ester-HDL (CE-HDL), whereas, the membrane-associated ecto-F₁-ATPase binds apolipoprotein A-I (apoA-I, the major protein component of HDL) and contributes to the uptake of both protein and lipid moieties of the HDL particle, a process called HDL holoparticle (or holo-HDL) endocytosis. More precisely, apoA-I binds to an entity related to the mitochondrial ATP synthase and localized at the cell surface (further named ecto-F₁-ATPase), which stimulates extracellular ATP hydrolysis. The generated extracellular ADP selectively activates the purinergic ADP-receptor P2Y₁₃ (Communi et al., 2001), resulting in cytoskeleton reorganization and subsequent clathrin-dependent holo-HDL endocytosis through a still unknown low-affinity receptor [3, 4, 5, 6]. Once internalized, cholesterol from HDL is preferentially eliminated in biliary secretions as free or transformed into bile acids (BA). This elimination is the last step of RCT. According to this molecular mechanism, P2Y₁₃ knockout mice (P2Y₁₃ KO) display a significant decrease in biliary lipids secretions and impaired RCT as compared to littermates wild type mice (Blom et al., 2010; Fabre et al., 2010). Conversely, *in vivo* P2Y₁₃ activation by bolus injection of its partial agonist cangrelor (AR-C69931MX) increases biliary lipids secretions in wild type but not P2Y₁₃ KO mice. Altogether, these previous work demonstrated a critical role of P2Y₁₃ in the final steps of RCT but whether its function impact on atherosclerosis development is still unknown. Thus, in the present study, we intent to evaluate the impact of P2Y₁₃ extinction in the apoE KO mice model for atherosclerosis (Andrew S. Plump, Jonathan D. Smith, Tony Hayek, Katriina

Aalto-Setälä, Annemarie Walsh, Judy G. Verstuyft, Edward M. Rubin, 1992) by characterizing P2Y₁₃ / apoE dKO mice with respect to plasma lipids, HDL metabolism, biliary lipid secretions, and atherosclerosis susceptibility.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

¹²⁵I-Na was obtained from GE-Healthcare. *Hydrazine hydrate* was from Acros. *3-alpha-OH steroid dehydrogenase* was from MP biochemicals. *Phospholipase D* was from ENZO. All other reagents (analytical grade) were from SIGMA.

2.2. Animals and Diets

All mice used in this study were 15 weeks old male mice on C57/Bl6 background. P2Y₁₃KO, generated as previously described (Fabre et al., 2010), were crossed with apoE KO to obtain apoE / P2Y₁₃ DKO mice. Mice were caged in animal rooms with alternating 12 h periods of light (07:00 am - 7:00 pm) and dark (7:00 pm - 07:00 am) and fed *ad libitum* with a normal mouse chow diet (# R04-10, SAFE, France) for 15 weeks. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Animals of the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license.

2.3. Plasma lipoprotein analyses

Individual plasma samples were collected from 3h-fasted mice. Total cholesterol and total triglycerides were measured with commercial kits (CHOD-PAP for cholesterol and GPO-PAP for triglycerides; BIOLABO SA, Maizy, France). Quantification of plasma lipoproteins was performed using an Ultimate[®] 3000 HPLC system (Dionex, USA). 10 µL of plasma was injected and lipoproteins were separated on Superose[®] 6 10/300 GL columns (GE Healthcare, USA) with PBS at pH 7.4 as mobile phase at a 0.5 mL / min flow rate. The column effluent was split equally into 2 lines by a microsplitter 50:50, mixing with cholesterol and/or triglyceride reagents (Biolabo, France), thus achieving a simultaneous profile from single injection. The two enzymatic reagents were each pumped at a rate of 0.1 mL / min using ISO-3100 analytical pumps (Dionex, USA). Both enzymatic reactions proceeded at 40°C in a PTFE reactor coil (10 m x 0.5 mm i.d.). Quantification was performed by measuring the

percentage peak area of each lipoprotein (VLDL, LDL & HDL) and by multiplying each percentage to the total amount of cholesterol and/or triglycerides measured in plasma samples.

2.4. Hepatic lipid analyses

Following homogenization of liver samples in methanol / 5 mM EGTA (2:1 v / v), lipids corresponding to an equivalent of 1 mg tissue were extracted in chloroform / methanol / water (2.5:2.5:2.1, v / v / v), in the presence of the internal standard: 3 µg of stigmasterol, 3 µg of cholesterylheptadecanoate and 6 µg of glyceryltriheptadecanoate (Bligh & Dyer, 1959). Neutral lipids were analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5 m x 0.32 mm i.d., 0.50 mm film thickness). Oven temperature was programmed to ramp from 200°C to 350°C at 5°C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector was held at 315°C and the detector at 345°C (Vieu et al., 1996).

2.5. Measurement of HDL clearance and tissue uptake

HDL₃ was prepared from pooled human plasma by sequential ultracentrifugation (density 1.063<d<1.21 g/mL). After extensive dialysis against dialysis buffer (0.15M NaCl, EDTA 1mM, pH_{7.4}), HDL₃ was exchange labeled with cholesterylhexadecylolate (cholesteryl-oleate, Perkin Elmer), as previously described (Tietge et al., 2000). After labeling, the HDL₃ was re-isolated by ultracentrifugation (density 1.063<d<1.21 g/mL), extensively dialyzed. In a second step, HDL₃ was labeled on its protein moiety with ¹²⁵I was performed by the N-bromosuccinimide method (Barbaras, Collet, Chap, & Perret, 1994). Doubled labeled HDL₃ was filter sterilized and stored at 4°C until injection.

Mice 15 weeks old were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. The liver was perfused *in situ* for 10 min at 37°C with PBS medium (Invitrogen) containing 50 µg proteins/mL of ¹²⁵I/³H-HDL₃ (specific radioactivities ranged from 105 to 160 cpm/ng of proteins). Livers were extensively washed at 4°C in PBS and radioactivity associated with the liver was counted (n ≥ 8 per group).

2.6. Cannulation of the Common Bile Duct and Collection of Hepatic Bile

15 weeks old mice ($n \geq 8$ per group) were fasted for 3 hours and were then anesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. The common bile duct was ligated close to the duodenum; and then the gallbladder was punctured and cannulated with a polyethylene-10 catheter. After 30 min, newly secreted bile was collected for 30 min by gallbladder cannulation. During bile collection, body temperature was stabilized using a temperature mattress. Bile flow ($\mu\text{L} / \text{min} / 100 \text{ g}$ of body weight) was determined gravimetrically assuming a density of $1 \text{ g} / \text{mL}$ for bile.

2.7. Biliary lipid analyses

For bile acid analysis, $1 \mu\text{L}$ of bile samples was diluted with $99 \mu\text{L}$ of milliQ water then incubated with the work reagent (6 mg NAD, 0.5 M Hydrazine hydrate buffer, 0.05 M Na-pyrophosphate) for 4 min. The mix was then incubated with a start reagent (0.03 M Tris-EDTA; 0,3 U/ mL 3-alpha-OH steroid dehydrogenase) and measured for 30 minutes, under excitation 340 / 330 nm emission 440 / 420 nm. For phospholipid analysis, $1 \mu\text{L}$ of bile samples was diluted with $49 \mu\text{L}$ of milliQ water then incubated with the work reagent (100mM MOPS, pH 8; 0,55mM HVA; 20 mM CaCl_2 ; 11 U / mL Phospholipase-D; 1.66 U / mL Peroxidase; 0.1% Triton X-100) for 4 minutes. The mix was then incubated with a start reagent (1 M MOPS, pH 8, 50 U / mL Choline oxidase) and measured for 67.5 minutes, under excitation 340 / 330 emission 440 / 40. For cholesterol analysis, $1 \mu\text{L}$ of bile samples was diluted with $29 \mu\text{L}$ of milliQ water then were incubated with the work reagent (100 mM MOPS, pH 8, 0.25 mM HVA; 0.1% Triton X-100) for 4 minutes. The mix was then incubated with a start reagent (0.1 M MOPS, pH 8, 0.06 U / mL cholesterol oxidase, 0.15 U / mL cholesterol esterase, 0.45 U / ml Peroxidase, 0.06 mM Taurocholate) and measured for 45 min, under excitation 340 / 330 nm emission 440 / 420 nm.

2.8. RNA isolation and quality control

After mechanical grinding, total RNA was extracted from each liver sample using the RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen). Genomic DNA contamination was removed using RNase-free DNase set (Qiagen). The RNA was then eluted in DNaseRNase-free water and finally the concentration of each sample was measured at a wavelength of 260 nm. The quality of the RNA was checked by capillary electrophoresis (Agilent[®] RNA Nano chip).

2.9. Reverse transcription

Reverse transcription of mRNA was performed using Superscript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) in the presence of primer p(dT) (Roche Diagnostics) and RNase OUT[™] (Invitrogen). Briefly, 5 µg of total RNA from each sample were used with 2 µL of primer p(dT)₁₅ (20 µmol / L) and 0.5 µL of RNase OUT. After 8 min of incubation at 70°C to inactivate DNase, 100 units of Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) were added and the mixture was incubated at 25°C for 10 minutes and then at 50°C for 1 hour. The RT reaction was ended by heating the mixture at 95°C for 5 minutes, it was then chilled and stored at -80°C until use.

2.10. Analysis of Gene Expression by real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR analysis was performed using SYBR Green I Master (Roche) on LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System. Liver expression of each gene was studied and compared to the expression of the housekeeping gene Haghhydroxyacyl glutathione hydrolase (HAGH/RSP29). PCR reactions were run in a 96-well format with 20 µL reaction mixture containing SYBR Green I Master (10 µL), cDNA from the RT reaction (5 µg, 4 µL) and gene specific primers (100 - 900 nM, 6 µL). Reactions were run with a standard 2-step cycling program, 95°C for 10 seconds and 60°C for 40 seconds, for 40 cycles. Each analysis included both housekeeping gene and gene of interest, primer/probe pairs as multiplexed samples. mRNA expression levels presented (8-9 mice per group) were calculated relative to the average of the housekeeping gene RPS29 and further normalized to the relative expression level of the respective controls, i.e. apoE^{-/-} mice.

2.11. Aortic sinus quantitation

The lesions were estimated according to Paigen et al. (Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, 1987). Briefly, the heart and ascending aorta were washed in phosphate-buffered saline and kept at 4°C for 24 hours. Each heart was frozen on a cryostat mount with OCT compound (Tissue-Tek), and stored at -80°C. Hearts were cut using a Leica CM3050S cryostat. Fifty sections of 10-µm thickness were prepared from the top of the left ventricle, where the aortic valves were first visible, up to a position in the aorta where the valve cusps were just disappearing from the field. After drying for 1 hour, the sections were stained with oil red O and counterstained with Mayer's hematoxylin. Five sections out of the 50, each

separated by 100 μm , were used for specific morphometric evaluation of intimal lesions using a computerized Leica image analysis system, consisting of a Leica DMRE microscope coupled to a video camera and Leica Qwin Imaging software (Leica Ltd, Cambridge, UK). The first and most proximal section to the heart was taken 100 μm distal to the point where the aorta first becomes rounded. Lipid droplets $<500 \mu\text{m}^2$ as well as those located in the media were excluded from the measurements. The mean lesion size (expressed in μm^2) in these 5 sections was used to evaluate the lesion size of each animal. The coded slides were examined blind in two separate analyses by the same examiner and gave consistent results ($r=0.97$).

2.12. Western blot

Liver protein was extracted in RIPA buffer, and 100 μg protein was loaded. Antibodies against SR-BI, LDLr or tubuline were used.

2.13. Statistical analysis

All results are presented as means \pm SEM. Comparison between groups were made using the Mann-Whitney test for independent samples. Outcomes of $p < 0.05$ were considered to be significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 6 software.

3. RESULTS

3.1. Plasma HDL cholesterol levels are decreased in P2Y₁₃ / apoE dKO.

Plasma total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were found to be significantly lower in chow-fed P2Y₁₃ / apoE dKO (further named dKO) when compared to apoE KO mice by about -15 and -25% respectively (each $p < 0.05$, Table 1). To gain more insight into the changes occurring in the lipid composition of each class of lipoproteins (HDL, LDL, VLDL), we subjected the plasma of these mice to fast pressure liquid chromatography (FPLC) and quantified TC, FC and TG. As reported in Table 1, the decrease in TC observed in dKO mice as compared to apoE KO ($n=8$ per group), could be mainly attributed to a decrease in the TC content into HDL ($-33 \pm 6\%$, $p<0.05$) and to a lesser extent into LDL ($-13 \pm 4\%$, $p<0.05$) (Table 1). This lowering in HDL-C and LDL-C was due to a decreased in their content of both FC (%)

and EC, since the FC/TC ratio did not significantly change between lipoproteins from dKO and apoE KO (Table 1). Interestingly, whereas cholesterol content into VLDL particles was slightly decreased in dKO mice but not significantly, their TG content was significantly decreasing, reflecting the lower level of plasma TG observed in dKO mice. Figure 1 illustrated one FPLC lipoprotein profile for TC from one representative mouse of group (i.e dKO and apoE KO). In line with the average lipoprotein cholesterol values reported in table 1, this profile indicates that changes in TC level observed in dKO mice reflected a marked decrease of HDL-C but not exclusively since moderated decrease of non-HDL-C (VLDL and LDL) and reduced LDL particles size were also observed (Figure 1).

	TC (mg/dL)		FC (mg/dL)		FC/TC (%)		TG (mg/dL)	
	apoE ^{-/-}	apoE ^{-/-} P2Y ₁₃ ^{-/-}	apoE ^{-/-}	apoE ^{-/-} P2Y ₁₃ ^{-/-}	apoE ^{-/-}	apoE ^{-/-} P2Y ₁₃ ^{-/-}	apoE ^{-/-}	apoE ^{-/-} P2Y ₁₃ ^{-/-}
Total	452.9 ± 17.6	382.4 ± 16.3*	195.0 ± 9.1	178.9 ± 10.4	41.5±2.6	44.0±0.6	125 ± 12.1	92.02 ± 7.1*
VLDL	194.3 ± 11.7	165.1 ± 7.8	94.4 ± 6.4	84.8 ± 6.8	49.9 ± 0.8	49.2 ± 1.5	91.2 ± 11.9	60.9 ± 7.1*
LDL	231.1 ± 6.3	200.7 ± 8.8*	92.7 ± 3.5	81.7 ± 3.6*	48.7 ± 7.0	40.9 ± 7.3	25.8 ± 1.5	27.5 ± 0.6
HDL	41.1 ± 1.3	27.7 ± 2.6***	17.2 ± 0.9	12.2 ± 0.7***	49.3 ± 7.0	44.3 ± 2.5	6.6 ± 1.6	3.4 ± 0.4

Table 1. Plasma lipoprotein composition in apoE^{-/-} P2Y₁₃^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} mice. Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), cholesteryl ester (CE) and triglycerides (TG) were measured on apoE^{-/-} and apoE^{-/-} P2Y₁₃^{-/-} mice. Data represent mean ± SEM, n=8 per group. *p<0.05, ***p<0,001 versus apoE^{-/-} mice.

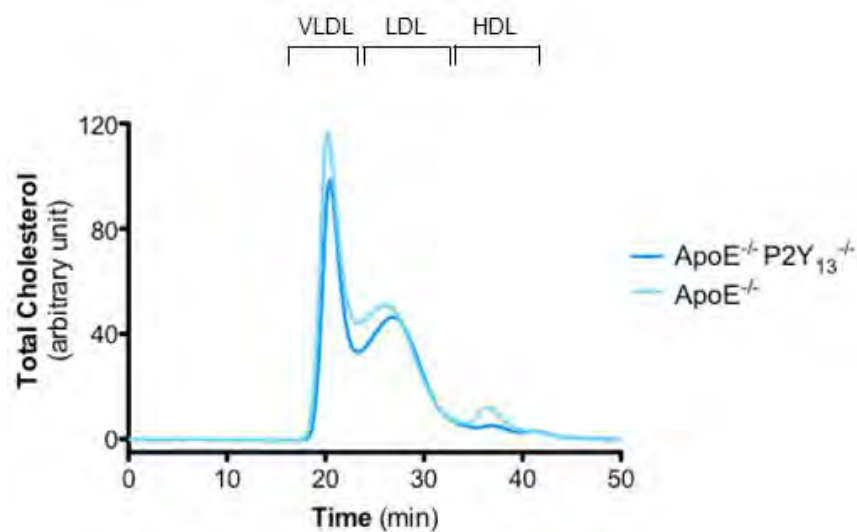


Figure 1. FPLC profiles of representative plasma samples. Dark blue line is representative of plasma from one apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mouse; light blue line is representative of plasma from one control mouse (apoE^{-/-}).

3.2. apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice have decreased hepatic lipid content and biliary lipid secretions.

We have previously demonstrated that P2Y₁₃ is involved in the hepatic endocytosis of the entire HDL particle and promotes lipids elimination into the bile. In order to assess the impact of P2Y₁₃ gene deletion on these processes in mice invalidated for apoE, we examine lipids content in the liver and measure both bile flow and lipids secretions into bile. Our data show that the level of esterified cholesterol is significantly increased in the liver of dKO mice compared to apoE KO mice (1.82 ± 0.16 versus 1.33 ± 0.13 ; $p < 0.05$, table 2). No change was observed in the level of total and free cholesterol between the two groups (Table 2). The TG content in the liver is decreased in the dKO group compared to the apoE KO group (4.06 ± 0.47 versus 6.23 ± 0.25 , $P < 0.05$, table 2).

We did gallbladder cannulation on individual mice fasted for 3 hours, and collected the bile for 30 minutes after 30 minutes of stabilisation. Our data show that bile flow is significantly reduced in dKO mice compared to apoE KO mice (5.27 ± 0.47 versus 7.04 ± 0.48 , $P < 0.05$, table 2). The levels of biliary lipids are also significantly decreased and this reduction is occurred for all the lipids (ie cholesterol, triglycerides and phospholipids, Table 2). In accordance with this observation, the cholesterol and bile acids content are also decreased in faeces collected for 48 hours (Table 2). The reduction in bile acid was observed for the muricholic acid (MCA), the cholic acid (CA), the lithocholic acid (LCD) and the hyodeoxycholic acid (HDCA) (figure 2).

	apoE ^{-/-}	apoE ^{-/-} P2Y ₁₃ ^{-/-}
Liver (nmol/mg of tissue):		
Free Cholesterol	4.38 ± 0.30	3.88 ± 0.18
Cholesteryl ester	1.33 ± 0.13	1.82 ± 0.16*
Triglycerides	6.23 ± 0.25	4.06 ± 0.47*
Biliary lipid:		
Bile flow (µl/min/100g BW)	7.04 ± 0.48	5.27 ± 0.47*
Cholesterol secretion (nmol/min/100g BW)	2.02 ± 0.20	1.35 ± 0.23*
Bile acid secretion (nmol/min/100g BW)	289.4 ± 14.3	212.4 ± 14.8**
Phospholipid secretion (nmol/min/100g BW)	24.63 ± 3.84	13.05 ± 2.32*
Fecal Lipids		
Total Cholesterol (mg/g)	6.55 ± 0.29	5.29 ± 0.45*
Total bile acids (µg/g)	1678 ± 117	1162 ± 52**

Table 2. Hepatic, biliary and fecal lipid values in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} mice. Values are expressed as means ± SEM; n=8 mice per group.

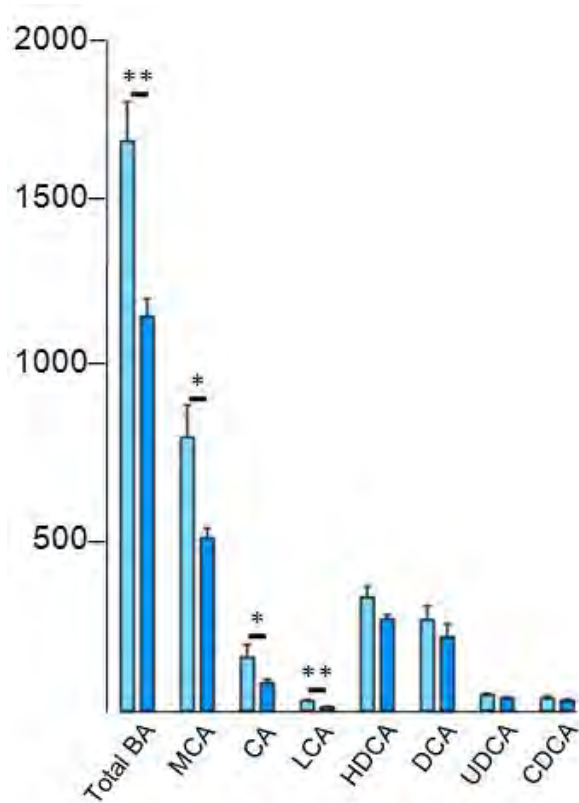


Figure 2. Faecal sterol output in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} and mice. Faeces were collected over a 48 h period, when mice were 15 weeks old. Bile acid and neutral sterol contents of the faeces were determined by GC–MS. Dark blue is representative of plasma from one apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mouse; light blue is representative of plasma from one control mouse (apoE^{-/-}). (* indicates significant differences from apoE^{-/-} mice treated, Student’s t-test, <0.001, n = 8 in each group)

3.3. ApoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} hepatic gene profile.

In an attempt to explain the mechanism that could account for the strong plasma and biliary lipid changes, we measured hepatic gene expression. Expression of genes involved in cholesterol transport and metabolism was determined to assess potential changes due to P2Y₁₃ depletion. As reported in Table 3, a high and strong increase was found in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} mice in the mRNA expression levels of genes involved in hepatic HDL uptake, such as SR-BI (scarb1). Another receptor responsible of hepatic cholesterol uptake, LDL receptor (Ldlr), was also found to be strongly upregulated, both at the mRNA and protein levels (Table 3, Figure 3.a). Those former results seem to illustrate the importance of P2Y₁₃ presence on apoE^{-/-} background. In addition, significant difference was observed in the mRNA expression levels of genes involved in cholesterol efflux towards the blood or the bile, such as ABCA1 (abca1), ABCB4 (abcb4) and ABCG5/G8 (abcg5/g8) but not ABCG1 (abcg1). These observations show depletion of P2Y₁₃^{-/-} on apoE^{-/-} background does

affect gene expression level of proteins involved in HDL-mediated hepatic cholesterol fluxes. Moreover, hepatic mRNA expression of enzymes catalyzing key steps in bile acid synthesis (cyp7a1, cyp27a1 and cyp8b1), or transporters controlling hepatic bile acid fluxes (abcb11/bsep, ntcp, oatp) remained unchanged in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} mice. Interestingly, a significant increase in hepatic mRNA expression level of the key enzyme involved in cholesterol neosynthesis, HMG-CoA reductase (hmgcr), by about 194% (p < 0.01, Table 3) was observed in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} mice. ApoAI (apoA-I) was strongly and significantly upregulated by about 160% (p<0,01, Table 3). Hepatic gene expression of SREBP2 was also increased, by more than 138% (p < 0.01, Table 3). Taken together these data indicate that depletion of P2Y₁₃^{-/-} on apoE^{-/-} background increases SREBP2 target genes involved in cholesterol synthesis or metabolism, suggesting that mice have adjusted their mRNA expression to accommodate the metabolic changes they undergo on this genotype.

3.4. Hepatic HDL uptake is compensated by SR-BI in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice.

In order to explain the means by which depletion of P2Y₁₃ in apoE^{-/-} background induce an opposite HDL lipoprotein pattern to what would have been expected, we did a liver perfusion of double labelled HDL in those mice. Liver uptake of either ¹²⁵I or ³H was counted on individual mice. Uptake of ³H-HDL was highly increased in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} mice (2.09 ± 0.60 vs 5.6 ± 2.3), illustrating that in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} SR-BI tend to strongly participate to hepatic HDL CE uptake. ¹²⁵I-HDL hepatic was slightly lower in livers from apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} (Figure 3B), due to the lack of P2Y₁₃. The resulting selective uptake was increased in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice (0.73 ± 0.50 vs 4.6 ± 2.6), confirming here the trend of SR-BI to compensate the lack of HDL uptake in the apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice.

Gene	Accession N°	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} P2Y ₁₃ ^{-/-}	Gene Title
scarb1	NM_016741	1.00 ± 0.10	2.67 ± 0.29***	Scavenger receptor class B, member 1
ldlr	NM_010700	1.00 ± 0.11	1.77 ± 0.14**	Low density lipoprotein receptor
abca1	NM_013454	1.00 ± 0.09	1.35 ± 0.13*	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1
abcg1	NM_009593	1.00 ± 0.11	1.18 ± 0.18	ATP-binding cassette, sub-family G, member 1
apoa1	NM_009692	1.00 ± 0.12	1.60 ± 0.06**	Apolipoprotein A-I
srebp2	NM_033218	1.00 ± 0.06	1.38 ± 0.08**	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
hmgcr	NM_008255	1.00 ± 0.09	1.94 ± 0.33**	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
abcg5	NM_031884	1.00 ± 0.09	1.50 ± 0.08**	ATP-binding cassette, sub-family G, member 5
abcg8	NM_026180	1.00 ± 0.10	1.55 ± 0.16**	ATP-binding cassette, sub-family G, member 8
abcb4	NM_008830	1.00 ± 0.11	1.46 ± 0.07*	ATP-binding cassette, sub-family G, member 4
abcb11/ bsep	NM_021022	1.00 ± 0.09	1.37 ± 0.20	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
cyp7a1	NM_007824	1.00 ± 0.17	1.17 ± 0.17	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
cyp27a1	NM_024264	1.00 ± 0.13	1.20 ± 0.07*	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
cyp8b1	NM_010012	1.00 ± 0.05	1.13 ± 0.07	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
ntcp/ slc10a1	NM_011387	1.00 ± 0.10	1.27 ± 0.14	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1
oatp/ slco1a1	NM_013797	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.20	Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
acat1	NM_144784	1.00 ± 0.06	1.31 ± 0.08 *	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1
acat2	NM_146064	1.00 ± 0.10	0.91 ± 0.08	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2
lcat3	NM_008490	1.00 ± 0.31	4.05 ± 0.48**	Lecithincholesterolacyltransferase

Table 3. Hepatic Gene Expression Levels of apoE^{-/-}x P2Y₁₃^{-/-} compared to apoE^{-/-}. Real-time PCR was performed on separate livers of 3h fasted mice (n=8 males mice per group, 15 weeks old, chow diet). For all genes scored, mRNA expression levels were calculated relative to the average of the housekeeping gene RPS29 and further normalized to the relative expression level of the respective controls, i.e. apoE^{-/-} mice. Values are expressed as means ± SEM. * and ** Indicate respective significant difference (p<0.05, p<0.01) from apoE^{-/-} mice.

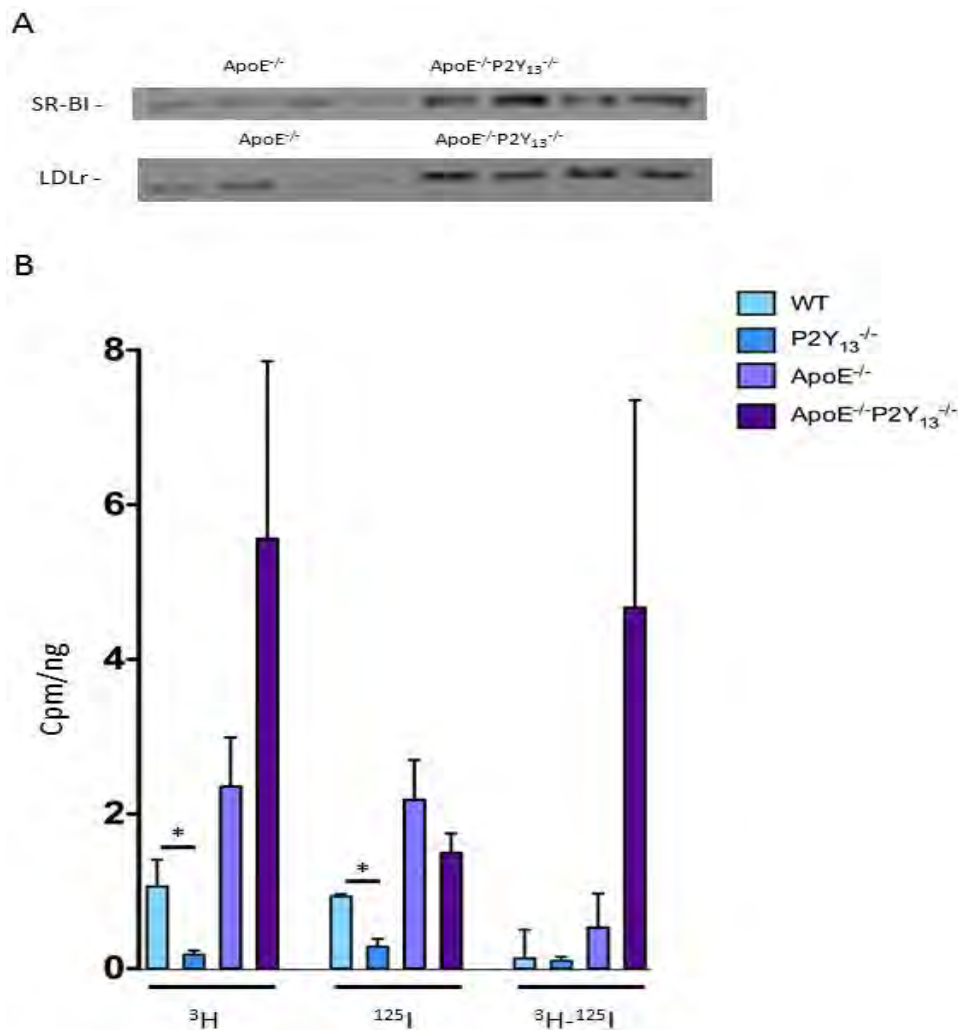


Figure 3. Western blot of apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} and apoE^{-/-} mice livers. Kinetics of ¹²⁵I-HDL₃ in apoE^{-/-} and apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-}. A, Relative protein levels were determined by Western blotting using specific antibodies (against SR-BI and LDLr) and were normalized with tubulin. B, Values are the liver count of wt (light blue), P2Y₁₃^{-/-} (dark blue), apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice (dark purple) or apoE^{-/-} mice (light purple). Uptake of ¹²⁵I/[³H] HDL by liver of apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice (dark purple) or apoE^{-/-} mice. ¹²⁵I/[³H] HDL was individually perfused in livers on apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} and apoE^{-/-} mice. Data are given as mean ± S.D.; n = 8 mice / group; NS = not significant p-value; Mann-Whitney test.

3.5. P2Y₁₃ protects against atherosclerosis development on apoE^{-/-} background.

We showed in this paper that SR-BI compensates the absence of P2Y₁₃ by increasing the selective CE-HDL uptake. In order to see to what extent this compensatory mechanism plays a role in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice, we measured the lesion area in aortic arches. The aortic lesion size is greater in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice compare to apoE^{-/-} mice (Figure 4a,b).

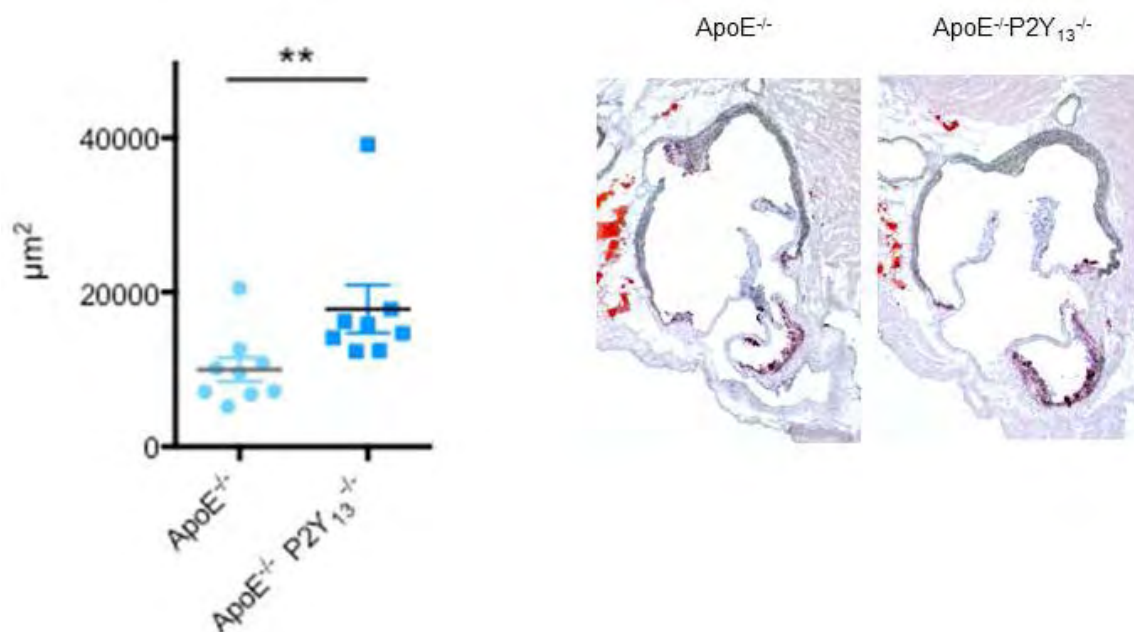


Figure 4. P2Y₁₃ deletion affects atherosclerotic lesion area. A, Cross sectional aortic root lesion quantification from apoE^{-/-} mice and apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice. Each dot represents the mean of plaque/aortic root area from 5 sections of the sinus of Valva from each mouse. Dark blue squares are representative of plasma from one apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mouse; light blue squares are representative of plasma from one control mouse (apoE^{-/-}). B, Representative image of ORO-staining aortic roots from apoE^{-/-} mice and apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice. Data are given as mean ± S.D.; n > 8 mice / group; p-value; Mann-Whitney test.

4. DISCUSSION

We previously showed that P2Y₁₃ plays an important role in HDL uptake as its inactivation decreases the uptake, and activation stimulates the uptake of HDL (Fabre et al., 2010). Furthermore, our earlier *in vivo* results demonstrated that P2Y₁₃ mediated holo-HDL endocytosis by the liver is independent of SR-BI (Fabre et al., 2010). Indeed, we reported that P2Y₁₃ knock out mice had decreased HDL uptake and biliary cholesterol secretion, and on the opposite, that bolus administration of cangrelor could stimulate HDL uptake and biliary lipid secretions by the liver in wild type.

In the present study, we further evaluated the importance of P2Y₁₃ on hepatobiliary metabolism in a proatherosclerotic model: apoE knockout background. Due to the high potency of this model to develop advanced and severe atherosclerotic plaques, we decided to study mice at 15 weeks of chow diet. Our findings indicate that inactivation of P2Y₁₃ on apoE knock out background markedly changes HDL metabolism. Plasma HDL concentrations

were opposite to our expectation, lower rather than higher, likely due to the contribution of SR-BI. It appeared that liver upregulation of SR-BI is parallel to increase the clearance of HDL particles from the circulation by the liver and decreased plasma HDL-cholesterol level. We report here a strong decrease in biliary lipids secretion in the apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice. Moreover this decrease was followed by a strong decrease in biliary acid output. To date, genetically modified mice for SR-BI explained the specific contribution of SR-BI in, on the one hand, hepatic HDL uptake, and on the other hand, the biliary secretion and excretion. Indeed, in transgenic or adenovirus-transduced mice overexpressing SR-BI specifically in the liver, HDL cholesterol concentrations were decreased as a consequence of increased liver HDL uptake (Ueda et al., 1999; Wang, Arai, Ji, Rinninger, & Tall, 1998). SR-BI invalidated mice show impaired biliary cholesterol secretions [17, 18]. On the opposite, transient over expression of SR-BI stimulate biliary cholesterol secretions (Kozarsky et al., 1997).

ApoE knock out mice has elevated plasma cholesterol and triglyceride, mainly due to the high β -VLDL concentration present in those mice as a consequence of chylomicron remnant accumulation. As such they develop spontaneous atherosclerosis (Andrew S. Plump, Jonathan D. Smith, Tony Hayek, Katriina Aalto-Setälä, Annemarie Walsh, Judy G. Verstuyft †, Edward M. Rubin, 1992; Reddick, Zhang, & Maeda, 1994). SR-BI was previously described to mediate β -VLDL uptake (Röhrli et al., 2010). Moreover, depletion of SR-BI and apoE lead to extensive accelerated atherosclerosis combined with decreased biliary cholesterol (Trigatti et al., 1999) and lethality by the age of 8 weeks (A. Braun, B. L. Trigatti, M. J. Post, K. Sato, M. Simons, J. M. Edelberg, R. D. Rosenberg, M. Schrenzel, 2002) due to the β -VLDL plasma accumulation.

In the present work, apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} mice show decreased VLDL concentrations compare to apoE^{-/-} mice, possibly due the hepatic, mRNA and protein, upregulation of SR-BI of these mice. Our previous work, characterizing P2Y₁₃ depletion in mice (Fabre et al., 2010) did not show any compensatory mechanism by SR-BI, in fact we did demonstrate the P2Y₁₃ mediated HDL uptake is totally independent of SR-BI. Here the role of SR-BI is likely to palliate to the lack of P2Y₁₃ on apoE knock out background.

Besides bile acids, we observed a reduction in cholesterol out-put in the feces of apoE^{-/-} P2Y₁₃^{-/-} mice. It could be explained by the decreased conversion of cholesterol into bile acids since the depletion of P2Y₁₃^{-/-} could reduce cholesterol uptake by the liver. However we observed an increase in the expression of the cholesterol transporters Abcg5 and Abcg8,

major regulators of biliary cholesterol excretion. Genetically modified mice for those transporters showed that their regulation correlates with neutral sterol output [24, 25]. Horton and colleagues saw a strong upregulation of *Abcg5* and *Abcg8* in SREBP2 transgenic mice (Horton et al., 2003). Intracellular cholesterol depletion activates SREBP2, which ends in an endogenous oxysterol ligands production that activate LXR (DeBose-Boyd, Ou, Goldstein, & Brown, 2001), which in turn transcriptionally activates expression of ABCG5 and ABCG8.

SREBP2 is involved in cholesterol homeostasis and stimulates genes responsible of cholesterol synthesis and LDLr. Interestingly, we saw a similar gene regulation profile suggesting the importance of P2Y₁₃ on hepatobiliary metabolism. We could draw the following hypothesis: in the absence of P2Y₁₃, hepatic cholesterol concentration decreases as a consequence of impaired holo-HDL uptake. SREBP2 would be activated to regulate the *de novo* cholesterol synthesis, thus inducing target genes, for cholesterol synthesis on one hand, and cholesterol uptake on the other hand. New synthesized cholesterol would be prone to nascent HDL lipidation, with the concur of *Abca1* and apoA-I upregulation, likely to avoid the atherosclerosis development. Unfortunately, those compensatory mechanisms would not be capable to counteract the atherosclerosis development in apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-}.

Selective uptake experiment on apoE^{-/-} mice versus WT showed that apoE plays an important role in CE selective uptake: despite higher SR-BI expression apoE^{-/-} mice had lower hepatic HDL clearance (Arai et al., 1999). One could assume the reason of such impaired CE-HDL uptake would be the different HDL structure that is found in apoE^{-/-} mice. In fact it is more likely that apoE helps SR-BI in this selective uptake (Varban et al., 1998). In our work we see the additive effect of apoE^{-/-} background and P2Y₁₃ depletion: holo-HDL uptake is impaired, illustrated by the protein moiety uptake decrease, and CE-HDL is increased due to the upregulation of SR-BI. As a consequence, selective uptake is increased, relating the importance of P2Y₁₃ in hepatic HDL clearance. As SR-BI could also contribute to HDL uptake of the holo-HDL particle (Sun, Eckhardt, Shetty, Van der Westhuyzen, & Webb, 2006; Wang et al., 1998), it could contribute here to protein moiety uptake, explaining the absence of significance in ¹²⁵I liver count, compared as what we previously saw on P2Y₁₃ simple knock out mice (Fabre et al., 2010).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technical service of the animal facility (GenotoulAnexplo Platform, Toulouse).

We thank J. Bertrand-Michel and V. Roques (MetaToul-Lipidomic Core Facility INSERM UMR 1048, France, part of Toulouse MetatoulPlatform) and Eric Lacoste (Synelvia, Prologue Biotech, Labège, France) for lipidomic analysis, advice and technical assistance.

Funding.

This study was supported by the INSERM Avenir Grant, the National Research Agency (ANR Emergence and GENO #102 01) and the Midi-Pyrénées Region. LL is a recipient of the Marie Curie IEF fellowship.

REFERENCES

- A. Braun, B. L. Trigatti, M. J. Post, K. Sato, M. Simons, J. M. Edelberg, R. D. Rosenberg, M. Schrenzel, M. K. (2002). Loss of SR-BI Expression Leads to the Early Onset of Occlusive Atherosclerotic Coronary Artery Disease, Spontaneous Myocardial Infarctions, Severe Cardiac Dysfunction, and Premature Death in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation Research*, 90(3), 270–276.
- Andrew S. Plump★, Jonathan D. Smith★, Tony Hayek★, Katriina Aalto-Setälä★, Annemarie Walsh★, Judy G. Verstuyft†, Edward M. Rubin†, J. L. B. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343–353.
- Arai, T., Rinninger, F., Varban, L., Fairchild-Huntress, V., Liang, C. P., Chen, W., Seo, T., et al. (1999). Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 12050–5.
- Barbaras, R., Collet, X., Chap, H., & Perret, B. (1994). Specific binding of free apolipoprotein A-I to a high-affinity binding site on HepG2 cells: Characterization of two high-density lipoprotein sites. *Biochemistry*, 33, 2335–2340.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911–917.
- Blom, D., Yamin, T.-T., Champy, M.-F., Selloum, M., Bedu, E., Carballo-Jane, E., Gerckens, L., et al. (2010). Altered lipoprotein metabolism in P2Y(13) knockout mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(12), 1349–60. doi:10.1016/j.bbali.2010.08.013
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Dethieux, M., Brézillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of biological chemistry*, 276(44), 41479–85. doi:10.1074/jbc.M105912200
- DeBose-Boyd, R. a, Ou, J., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2001). Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1477–82.
- Fabre, A. C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., Lichtenstein, L., et al. (2010). P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(4), 1477–83. doi:10.1002/hep.23897
- Garcia, A., Barbaras, R., Collet, X., Bogyo, A., Chap, H., & Perret, B. (1996). High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry*, 35(40), 13064–13071.
- Gordon, D. J., Probstfield, J. L., Garrison, R. J., Neaton, J. D., Castelli, W. P., Knoke, J. D., Jacobs Jr., D. R., et al. (1989). High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*, 79(1), 8–15.
- Horton, J. D., Shah, N. a, Warrington, J. a, Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and

- knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12027–32.
- Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L. O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., Nauze, M., et al. (2005). The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(21), 2508–15.
doi:10.1007/s00018-005-5194-0
- Ji, Y., Wang, N., Ramakrishnan, R., Sehayek, E., Huszar, D., Breslow, J. L., & Tall, a R. (1999). Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *The Journal of biological chemistry*, 274(47), 33398–402.
- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R., & Krieger, M. (1997, May 22). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. doi:10.1038/387414a0
- Malaval, C., Laffargue, M., Barbaras, R., Rolland, C., Peres, C., Champagne, E., Perret, B., et al. (2009). RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cellular signalling*, 21(1), 120–7.
doi:10.1016/j.cellsig.2008.09.016
- Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., Miettinen, H. E., et al. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research*, 42(2), 170–80.
- Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., et al. (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 421(6918), 75–79.
- Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, W. R. (1987). Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, 68(3), 231–40.
- Reddick, R. L., Zhang, S. H., & Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression [published erratum appears in *Arterioscler Thromb* 1994 May;14(5):839]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(1), 141–147.
- Röhrl, C., Fruhwürth, S., Schreier, S. M., Lohninger, A., Dolischka, A., Hüttinger, M., Zemmann, N., et al. (2010). Scavenger receptor, Class B, Type I provides an alternative means for beta-VLDL uptake independent of the LDL receptor in tissue culture. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(2), 198–204.
- Sun, B., Eckhardt, E. R. M., Shetty, S., Van der Westhuyzen, D. R., & Webb, N. R. (2006). Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts. *Journal of lipid research*, 47(8), 1700–13.
- Tietge, U. J., Maugeais, C., Cain, W., Grass, D., Glick, J. M., De Beer, F. C., & Rader, D. J. (2000). Overexpression of secretory phospholipase A(2) causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. *The Journal of biological chemistry*, 275(14), 10077–84.

- Trigatti, B., Rayburn, H., Viñals, M., Braun, A., Miettinen, H., Penman, M., Hertz, M., et al. (1999). Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9322–7.
- Ueda, Y., Royer, L., Gong, E., Zhang, J., Cooper, P. N., Francone, O., & Rubin, E. M. (1999). Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 274(11), 7165–71.
- Van der Velde, A. E., Vrans, C. L. J., Van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R. P. J., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*, 133(3), 967–75.
doi:10.1053/j.gastro.2007.06.019
- Varban, M. L., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Gosselin, M. L., et al. (1998). Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4619–24.
- Vieu, C., Jaspard, B., Barbaras, R., Manent, J., Chap, H., Perret, B., & Collet, X. (1996). Identification and quantitation of diacylglycerols in HDL and accessibility to lipase. *J Lipid Res*, 37, 1153–1161.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., & Tall, a R. (1998). Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 273(49), 32920–6.
- Yu, L., Li-hawkins, J., Hammer, R. E., Berge, K. E., Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol, 110(5).
doi:10.1172/JCI200216001.Introduction

Chapitre IV
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

D'abord, ces travaux ont permis de démontrer l'implication physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans le processus de transport retour du cholestérol *in vivo* chez la souris. Ensuite, l'activation chronique de ce récepteur par le cangrelor diminue les taux plasmatiques en HDL-C et augmente leur captation ainsi que leur sécrétion sous forme d'acides biliaires. Enfin, P2Y₁₃ joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose chez la souris apoE^{-/-}. L'ensemble de ces résultats ouvre de nombreuses perspectives de recherche dans le but de mieux caractériser ce récepteur, puis de valider ce récepteur en tant que cible thérapeutique destinée au traitement de l'athérosclérose.

2.1-P2Y₁₃ une cible potentielle dans le traitement de l'athérosclérose

Nos résultats suggèrent que le récepteur P2Y₁₃ est une cible potentielle thérapeutique dans la lutte contre l'athérosclérose en jouant un rôle clé dans le RCT. L'activation pharmacologique de P2Y₁₃ augmente l'endocytose hépatique des HDL, le RCT et baisse les taux de HDL-C circulant, alors que son invalidation chez la souris apoE^{-/-} a un effet non négligeable sur le métabolisme du HDL-C et sur le développement de l'athérosclérose. Ces données supportent le concept selon lequel une stratégie thérapeutique visant à stimuler le RCT éliminerait de manière efficace le cholestérol excédentaire de l'organisme, en particulier celui stocké dans les macrophages spumeux de la paroi vasculaire, sans augmenter le taux circulant de HDL, mais au contraire en l'abaissant.

Dans ce but, des molécules activatrices de P2Y₁₃ pourraient facilement activer ce récepteur au niveau hépatique sans moduler l'activité des récepteurs P2Y₁₃ extra-hépatiques en étant dégradées au cours de leur passage dans le foie. Actuellement, le seul agoniste pharmacologique à notre disposition est le cangrelor (AR-C69931MX). Cette molécule nous a permis de mieux comprendre le rôle de P2Y₁₃ dans le métabolisme de cholestérol et le RCT. Cependant, cette molécule présente des caractéristiques pharmacologiques et pharmacocinétiques qui ne permettent pas d'envisager son utilisation pour la thérapeutique visant ce récepteur. Premièrement, le cangrelor est également un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂, actuellement utilisé en clinique chez l'homme comme anti-thrombotique (Gachet, 2008). Deuxièmement, son utilisation thérapeutique est dépendante de sa faible demi-vie plasmatique ($t_{1/2} < 9\text{min}$ chez l'homme) (Storey et al., 2001). Le manque de spécificité et le faible temps de demi-vie de cette molécule nous amènent à

chercher ou à synthétiser de nouveaux agonistes spécifiques et plus stables du récepteur P2Y₁₃.

2.2-P2Y₁₃ et la biogenèse des HDL

L'analyse de l'expression génique au niveau du foie lors de l'inactivation de P2Y₁₃ entraîne une diminution des ARNm codant pour les transporteurs ABCA1 et ABCG1, impliqués dans l'efflux du cholestérol cellulaire (cf. chapitre I). La modulation de l'expression de ces gènes montre que l'inhibition de l'endocytose des HDL par la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ pourrait avoir un impact important sur l'homéostasie du cholestérol.

ABCA1 est un transporteur impliqué dans la néogenèse des HDL à travers l'efflux du cholestérol cellulaire vers l'apoA-I délipidée. Nous proposons que, suite à l'inactivation de P2Y₁₃, la diminution de la captation hépatique des HDL pourrait être compensée par une diminution de l'efflux du cholestérol hépatique *via* ABCA1, ce qui pourrait également être à l'origine de l'absence de modification des concentrations plasmatiques en HDL-C (cf. Article 1).

La validation de cette hypothèse implique des expériences d'efflux de cholestérol radiomarqué avec des hépatocytes primaires, isolés de souris invalidées pour P2Y₁₃ et de souris sauvages. En parallèle, pour tester si ce mécanisme de compensation peut être transposé à l'homme, des expériences similaires pourront être réalisées sur des hépatocytes primaires humains ou des cellules HepG2 dans lesquels P2Y₁₃ serait invalidé par ARN interférence.

Rayner *et al.* ont montré que l'utilisation d'antagonistes de miR-33 augmente l'expression hépatique d'ABCA1 et ABCG1. Ces modulations sont associées à une augmentation des concentrations plasmatiques en HDL-C ainsi qu'à une stimulation du RCT (cf. chapitre II 2.2.1) (K. Rayner & Sheedy, 2011). Le traitement de souris invalidées pour P2Y₁₃ avec un antagoniste de miR-33 permettrait d'évaluer l'impact d'une restauration de l'expression d'ABCA1 et d'ABCG1 sur les concentrations plasmatiques en HDL-C.

2.3-Activation de P2Y₁₃ et RCT

Nous avons montré que, sur des souris sauvage C57BL/6, l'activation chronique du récepteur P2Y₁₃ par le cangrelor diminuait les concentrations plasmatiques en HDL-C, conséquence d'une augmentation de leur captation hépatique. *In fine*, le cangrelor stimule l'élimination du cholestérol dans la bile sous la forme d'acides biliaires (cf. Article 2). Ces résultats suggèrent qu'une activation pharmacologique de récepteur P2Y₁₃ pourrait stimuler le RCT.

Afin de valider cette hypothèse, nous pourrions envisager une expérience de transport retour de cholestérol des macrophages vers les fèces chez des souris traitées ou non au cangrelor. Pour cela, des macrophages péritonéaux de souris sauvages marqués au ³H-cholestérol seront injectés aux souris traitées avec le cangrelor et la radioactivité sera ensuite comptée dans le plasma et dans les fèces pendant 48h, ainsi que dans le foie et la bile.

2.4-P2Y₁₃ et le développement de l'athérosclérose

Au travers de l'étude de l'implication de P2Y₁₃ dans le développement de l'athérosclérose sous fond C57BL/6 apoE^{-/-}, nous avons pu observer une augmentation de l'expression hépatique du gène codant pour SR-BI, impliqué dans la captation sélective du cholestérol estérifié des HDL et du récepteur au LDL (LDLr) (cf. Article 3). L'augmentation de l'expression de ces 2 récepteurs pourrait être responsable de la diminution de la concentration plasmatique en HDL-C et non HDL observée chez les souris apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} en comparaison au souris apoE^{-/-}. SR-BI pourrait aussi contribuer à l'augmentation de la captation du cholestérol estérifié par le foie chez les souris apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-}. Cependant, malgré la possible augmentation de l'activité anti-athérogène de ces 2 récepteurs, nous observons une initiation du développement de la plaque d'athérome chez les souris apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-} par rapport aux témoins. Ainsi, ces mécanismes de compensation possible *via* SR-BI et LDLr ne suffiraient pas à compenser le phénotype métabolique pro-athérogène induit par la perte d'expression du récepteur P2Y₁₃.

Afin de mettre en évidence une éventuelle compensation de SR-BI et de mieux appréhender le rôle athéroprotecteur de P2Y₁₃, nous envisageons de traiter les souris apoE^{-/-}

x P2Y₁₃^{-/-} par un adénovirus shRNA ciblant spécifiquement SR-BI et d'analyser les lipoprotéines plasmatiques, l'endocytose des HDL ainsi que les sécrétions biliaires.

Afin d'étudier l'impact du récepteur P2Y₁₃ sur le développement de l'athérosclérose, il serait également intéressant d'étudier l'effet du cangrelor ou d'un autre agoniste plus spécifique du récepteur P2Y₁₃, sur des souris apoE^{-/-}. Pour cela, les souris apoE^{-/-} seraient chroniquement traitées pendant 2 mois au cangrelor, sous forme d'injection continue *via* l'utilisation de pompes osmotiques de type alzet®. A la fin de l'étude, les différents paramètres lipidiques et les lésions d'athérome seront étudiés.

2.5-Etude du développement de l'athérosclérose et de RCT dans un modèle de souris « humanisées »

Le modèle murin est un bon modèle d'étude *in vivo* par sa taille et sa vitesse de reproduction. Cependant, le métabolisme des lipoprotéines de ces animaux est très différent de celui de l'homme, notamment en raison de l'absence totale de CETP. Chez l'homme, la CETP transfère les esters de cholestérol des HDL aux lipoprotéines contenant l'apoB (LDL, VLDL). En conséquence, l'activité de la CETP modifie la composition qualitative des HDL, impactant de manière significative sur le développement de l'athérosclérose car elle participe au contrôle du catabolisme des HDL par le biais des récepteurs hépatiques. Des travaux portant sur des souris transgéniques pour la CETP (CETP tg) ont montré que la CETP augmente le catabolisme du HDL-CE, ainsi que le RCT. De plus, l'induction de la CETP chez la souris sauvage induit une augmentation du développement de l'athérosclérose après un régime riche en cholestérol (cf. chapitre I). El Bouhassani *et al.* ont croisé les souris SR-BI KO^{Liver} avec les souris CETP Tg. Sous un régime riche en cholestérol, les auteurs ont observé chez ces souris une baisse importante des HDL de large diamètre et riches en cholestérol, comparée aux souris SR-BI KO^{Liver}. De plus, l'expression de la CETP stimule l'endocytose hépatique de HDL-C. Ces changements métaboliques sont associés à une réduction significative de l'athérosclérose (El Bouhassani et al., 2011). Ainsi, dans ce contexte humanisé, cette étude suggère un effet athéroprotecteur de la CETP lorsque SR-BI est déficient. Dans ce contexte, le croisement des souris CETP Tg avec les souris invalidées pour P2Y₁₃ et les souris doublement invalidées pour P2Y₁₃ et SR-BI nous permettrait d'évaluer la *in vivo* sur un modèle de souris « humanisées ».

Une autre différence entre l'homme et la souris est l'expression de NPC1L1. Alors que chez l'homme NPC1L1 est exprimé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, chez la souris NPC1L1 est présent seulement au niveau entérocytaire. Au niveau hépatique, NPC1L1 semble jouer un rôle dans la réabsorption du cholestérol de la bile vers l'hépatocyte. En effet, l'expression hépatique de NPC1L1 chez la souris, entraîne une diminution importante de la concentration de cholestérol biliaire et le traitement de ces souris avec l'Ezétimibe (inhibiteur de NPC1L1) restaure les concentrations biliaires en cholestérol au niveau des souris sauvages (cf. Chapitre I). Ainsi, en réabsorbant le cholestérol dans la bile, NPC1L1 pourrait contrecarrer les effets bénéfiques d'une activation de P2Y₁₃ sur l'élimination biliaire du cholestérol. Il serait intéressant d'étudier les effets de la modulation du récepteur P2Y₁₃ sur la régulation des sécrétions biliaires et du transport retour du cholestérol chez les souris exprimant NPC1L1 au niveau hépatique. Si l'expression de NPC1L1 au niveau hépatique inhibe les effets bénéfiques d'une activation du récepteur P2Y₁₃, l'association d'un activateur de P2Y₁₃ avec l'Ezétimibe pourrait être envisagée comme stratégie thérapeutique chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- Aiello, R. J. (2002). Increased Atherosclerosis in Hyperlipidemic Mice With Inactivation of ABCA1 in Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(4), 630–637. doi:10.1161/01.ATV.0000014804.35824.DA
- Albers, J. J., & Cheung, M. C. (2004). Emerging roles for phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 255–260. doi:10.1097/01.mol.0000130098.84876.ac
- Alexander, E. T., Weibel, G. L., Joshi, M. R., Vedhachalam, C., De la Llera-Moya, M., Rothblat, G. H., Phillips, M. C., et al. (2009). Macrophage reverse cholesterol transport in mice expressing ApoA-I Milano. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(10), 1496–501. doi:10.1161/ATVBAHA.109.191379
- Allen, R. M., Marquart, T. J., Albert, C. J., Suchy, F. J., Wang, D. Q.-H., Ananthanarayanan, M., Ford, D. a, et al. (2012). miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO molecular medicine*, 4(9), 882–95. doi:10.1002/emmm.201201228
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Zhu, L.-J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P. N., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5661), 1201–4. doi:10.1126/science.1093131
- Amigo, L., Mardones, P., Ferrada, C., Zanlungo, S., Nervi, F., Miquel, J. F., & Rigotti, A. (2003). Biliary lipid secretion, bile acid metabolism, and gallstone formation are not impaired in hepatic lipase-deficient mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(3), 726–34. doi:10.1053/jhep.2003.50379
- Amigo, L., Quiñones, V., Leiva, A., Busso, D., Zanlungo, S., Nervi, F., & Rigotti, A. (2011). Apolipoprotein A-I deficiency does not affect biliary lipid secretion and gallstone formation in mice. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31(2), 263–71. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02421.x
- Amigo, L., Quiñones, V., Mardones, P., Zanlungo, S., Miquel, J. F., Nervi, F., & Rigotti, A. (2000). Impaired biliary cholesterol secretion and decreased gallstone formation in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-cholesterol diet. *Gastroenterology*, 118(4), 772–9. doi:10.1053/gg.2000.5947
- Amisten, S., Meidute-Abaraviciene, S., Tan, C., Olde, B., Lundquist, I., Salehi, A., & Erlinge, D. (2010). ADP mediates inhibition of insulin secretion by activation of P2Y13 receptors in mice. *Diabetologia*, 53(9), 1927–34. doi:10.1007/s00125-010-1807-8
- Annema, W., Dijkers, A., Freark de Boer, J., Gautier, T., Rensen, P. C. N., Rader, D. J., & Tietge, U. J. F. (2012). ApoE promotes hepatic selective uptake but not RCT due to increased ABCA1-mediated cholesterol efflux to plasma. *Journal of lipid research*, 53(5), 929–40. doi:10.1194/jlr.M020743
- Annema, W., & Tietge, U. J. F. (2011). Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Current atherosclerosis reports*, 13(3), 257–65. doi:10.1007/s11883-011-0175-2

- Baldán, A., Pei, L., Lee, R., Tarr, P., Tangirala, R. K., Weinstein, M. M., Frank, J., et al. (2006). Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(10), 2301–7. doi:10.1161/01.ATV.0000240051.22944.dc
- Barcat, D., Amadio, A., Palos-Pinto, A., Daret, D., Benlian, P., Darmon, M., & Bérard, a M. (2006). Combined hyperlipidemia/hyperalphalipoproteinemia associated with premature spontaneous atherosclerosis in mice lacking hepatic lipase and low density lipoprotein receptor. *Atherosclerosis*, 188(2), 347–55. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.022
- Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J. P., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., et al. (2007). Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *The New England journal of medicine*, 357(21), 2109–22. doi:10.1056/NEJMoa0706628
- Barter, P. J., & Kastelein, J. J. P. (2006). Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and management of cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(3), 492–9. doi:10.1016/j.jacc.2005.09.042
- Basso, F., Amar, M. J., Wagner, E. M., Vaisman, B., Paigen, B., Santamarina-Fojo, S., & Remaley, A. T. (2006). Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochemical and biophysical research communications*, 351(2), 398–404. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.044
- Basso, F., Freeman, L. a, Ko, C., Joyce, C., Amar, M. J., Shamburek, R. D., Tansey, T., et al. (2007). Hepatic ABCG5/G8 overexpression reduces apoB-lipoproteins and atherosclerosis when cholesterol absorption is inhibited. *Journal of lipid research*, 48(1), 114–26. doi:10.1194/jlr.M600353-JLR200
- Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Coméra, C., Schaak, S., et al. (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *The Journal of biological chemistry*, 281(11), 7214–9. doi:10.1074/jbc.M508868200
- Bloedon, L. T., Dunbar, R., Duffy, D., Pinell-Salles, P., Norris, R., DeGroot, B. J., Movva, R., et al. (2008). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *Journal of lipid research*, 49(6), 1344–52. doi:10.1194/jlr.P800003-JLR200
- Blom, D., Yamin, T.-T., Champy, M.-F., Selloum, M., Bedu, E., Carballo-Jane, E., Gerckens, L., et al. (2010). Altered lipoprotein metabolism in P2Y(13) knockout mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(12), 1349–60. doi:10.1016/j.bbalip.2010.08.013
- Braschi, S., Couture, N., Gambarotta, A., Gauthier, B. R., Coffill, C. R., Sparks, D. L., Maeda, N., et al. (1998). Hepatic lipase affects both HDL and ApoB-containing lipoprotein levels in the mouse. *Biochimica et biophysica acta*, 1392(2-3), 276–90.
- Briand, F., Naik, S. U., Fuki, I., Millar, J. S., Macphee, C., Walker, M., Billheimer, J., et al. (2009). Both the peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist, GW0742, and ezetimibe promote reverse cholesterol transport in mice by reducing intestinal

- reabsorption of HDL-derived cholesterol. *Clinical and translational science*, 2(2), 127–33.
- Brown, R. J., Lagor, W. R., Sankaranarayanan, S., Yasuda, T., Quertermous, T., Rothblat, G. H., & Rader, D. J. (2010). Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Circulation research*, 107(3), 357–64. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219188
- Brunham, L. R., Kruit, J. K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J. M., Pape, T. D., Coburn, B. A., et al. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 116(4), 1052–62. doi:10.1172/JCI27352
- Brunham, L. R., Singaraja, R. R., Duong, M., Timmins, J. M., Fievet, C., Bissada, N., Kang, M. H., et al. (2009). Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(4), 548–54. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182303
- Burgess, B., Naus, K., Chan, J., Hirsch-Reinshagen, V., Tansley, G., Matzke, L., Chan, B., et al. (2008). Overexpression of human ABCG1 does not affect atherosclerosis in fat-fed ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(10), 1731–7. doi:10.1161/ATVBAHA.108.168542
- Calabresi, L., Tedeschi, G., Treu, C., Ronchi, S., Galbiati, D., Airoidi, S., Sirtori, C. R., et al. (2001). Limited proteolysis of a disulfide-linked apoA-I dimer in reconstituted HDL. *Journal of lipid research*, 42(6), 935–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369801>
- Calpe-Berdiel, L., Rotllan, N., Fiévet, C., Roig, R., Blanco-Vaca, F., & Escolà-Gil, J. C. (2008). Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8. *Journal of lipid research*, 49(9), 1904–11. doi:10.1194/jlr.M700470-JLR200
- Canner, P. L., Berge, K. G., Wenger, N. K., Stamler, J., Friedman, L., Prineas, R. J., & Friedewald, W. (1986). *Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin*. *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 8, pp. 1245–1255). American College of Cardiology Foundation.
- Cannon, C. P., Shah, S., Dansky, H. M., Davidson, M., Brinton, E. A., Gotto, A. M., Stepanavage, M., et al. (2010). Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *The New England journal of medicine*, 363(25), 2406–15. doi:10.1056/NEJMoa1009744
- Cao, G., Beyer, T. P., Yang, X. P., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Bensch, W. R., Kauffman, R. F., et al. (2002). Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 277(42), 39561–5. doi:10.1074/jbc.M207187200
- Castellani, L. W., Navab, M., Van Lenten, B. J., Hedrick, C. C., Hama, S. Y., Goto, a M., Fogelman, a M., et al. (1997a). Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice

- converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *The Journal of clinical investigation*, 100(2), 464–74. doi:10.1172/JCI119554
- Castellani, L. W., Navab, M., Van Lenten, B. J., Hedrick, C. C., Hama, S. Y., Goto, a M., Fogelman, a M., et al. (1997b). Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *The Journal of clinical investigation*, 100(2), 464–74. doi:10.1172/JCI119554
- Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., & Von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochimica et biophysica acta*, 1761(7), 655–66. doi:10.1016/j.bbaliip.2006.04.012
- Cefali, E. A., Simmons, P. D., Stanek, E. J., & Shamp, T. R. (2006). Improved control of niacin-induced flushing using an optimized once-daily, extended-release niacin formulation. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 44(12), 633–40.
- Chen, Z., O'Neill, E. A., Meurer, R. D., Gagen, K., Luell, S., Wang, S.-P., Ichetovkin, M., et al. (2012). Reconstituted HDL elicits marked changes in plasma lipids following single-dose injection in C57Bl/6 mice. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 17(3), 315–23. doi:10.1177/1074248411426144
- Chung, S., Sawyer, J. K., Gebre, A. K., Maeda, N., & Parks, J. S. (2011). Adipose tissue ATP binding cassette transporter A1 contributes to high-density lipoprotein biogenesis in vivo. *Circulation*, 124(15), 1663–72. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025445
- Clark, R. W., Sutfin, T. A., Ruggeri, R. B., Willauer, A. T., Sugarman, E. D., Magnus-Aryitey, G., Cosgrove, P. G., et al. (2004). Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(3), 490–7. doi:10.1161/01.ATV.0000118278.21719.17
- Coller, B. S. (2005). Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(4), 658–70. doi:10.1161/01.ATV.0000156877.94472.a5
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brézillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of biological chemistry*, 276(44), 41479–85. doi:10.1074/jbc.M105912200
- Cooney, M. T., Dudina, A., De Bacquer, D., Wilhelmsen, L., Sans, S., Menotti, A., De Backer, G., et al. (2009). HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis*, 206(2), 611–6. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.041
- Covey, S. D., Krieger, M., Wang, W., Penman, M., & Trigatti, B. L. (2003). Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(9), 1589–94. doi:10.1161/01.ATV.0000083343.19940.A0

- De Grooth, G. J., Kuivenhoven, J. A., Stalenhoef, A. F. H., De Graaf, J., Zwinderman, A. H., Posma, J. L., Van Tol, A., et al. (2002). Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study. *Circulation*, *105*(18), 2159–65.
- De Grouw, E. P. L. M., Raaijmakers, M. H. G. P., Boezeman, J. B., Van der Reijden, B. A., Van de Locht, L. T. F., De Witte, T. J. M., Jansen, J. H., et al. (2006). Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia*, *20*(4), 750–4. doi:10.1038/sj.leu.2404131
- Di Angelantonio, E., Sarwar, N., Perry, P., Kaptoge, S., Ray, K. K., Thompson, A., Wood, A. M., et al. (2009a). Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, *302*(18), 1993–2000. doi:10.1001/jama.2009.1619
- Di Angelantonio, E., Sarwar, N., Perry, P., Kaptoge, S., Ray, K. K., Thompson, A., Wood, A. M., et al. (2009b). Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, *302*(18), 1993–2000. doi:10.1001/jama.2009.1619
- Dichek, H. L., Qian, K., & Agrawal, N. (2004). The bridging function of hepatic lipase clears plasma cholesterol in LDL receptor-deficient “apoB-48-only” and “apoB-100-only” mice. *Journal of lipid research*, *45*(3), 551–60. doi:10.1194/jlr.M300459-JLR200
- Dormandy, J. A., Charbonnel, B., Eckland, D. J. A., Erdmann, E., Massi-Benedetti, M., Moules, I. K., Skene, A. M., et al. (2005). Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*, *366*(9493), 1279–89. doi:10.1016/S0140-6736(05)67528-9
- Dullens, S. P. J., Plat, J., & Mensink, R. P. (2007). Increasing apoA-I production as a target for CHD risk reduction. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, *17*(8), 616–28. doi:10.1016/j.numecd.2007.05.001
- El Bouhassani, M., Gilibert, S., Moreau, M., Saint-Charles, F., Tréguier, M., Poti, F., Chapman, M. J., et al. (2011). Cholesteryl ester transfer protein expression partially attenuates the adverse effects of SR-BI receptor deficiency on cholesterol metabolism and atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry*, *286*(19), 17227–38. doi:10.1074/jbc.M111.220483
- Elferink, R. P. J. O., Ottenhoff, R., Wijland, M. Van, Frijters, C. M. G., Nieuwkerk, C. Van, & Groen, A. K. (1996). Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdr2 P-glycoprotein. *Journal of lipid research*, *37*, 1065–1075.
- Ericsson, C. G., Hamsten, A., Nilsson, J., Grip, L., Svane, B., & De Faire, U. (1996). Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *Lancet*, *347*(9005), 849–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622389>

- Fabre, A. C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., Lichtenstein, L., et al. (2010). P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(4), 1477–83. doi:10.1002/hep.23897
- Falany, C. N., Johnson, M. R., Barnes, S., & Diasio, R. B. (1994). Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 269(30), 19375–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8034703>
- Figge, A., Lammert, F., Paigen, B., Henkel, A., Matern, S., Korstanje, R., Shneider, B. L., et al. (2004). Hepatic overexpression of murine Abcb11 increases hepatobiliary lipid secretion and reduces hepatic steatosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(4), 2790–9. doi:10.1074/jbc.M307363200
- Föger, B., Chase, M., Amar, M. J., Vaisman, B. L., Shamburek, R. D., Paigen, B., Fruchart-Najib, J., et al. (1999). Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 274(52), 36912–20.
- Forrest, M. J., Bloomfield, D., Briscoe, R. J., Brown, P. N., Cumiskey, A.-M., Ehrhart, J., Hershey, J. C., et al. (2008). Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *British journal of pharmacology*, 154(7), 1465–73. doi:10.1038/bjp.2008.229
- Furbee, J. W., Sawyer, J. K., & Parks, J. S. (2002). Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knockout mice. *The Journal of biological chemistry*, 277(5), 3511–9. doi:10.1074/jbc.M109883200
- Gachet, C. (2008). P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thrombosis and haemostasis*, 99, 466–472.
- Gao, Z.-G., Ding, Y., & Jacobson, K. A. (2010). P2Y₁₃ receptor is responsible for ADP-mediated degranulation in RBL-2H3 rat mast cells. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 62(6), 500–5. doi:10.1016/j.phrs.2010.08.003
- Garber, D. W., Datta, G., Chaddha, M., Palgunachari, M. N., Hama, S. Y., Navab, M., Fogelman, a M., et al. (2001). A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet-induced atherosclerosis. *Journal of lipid research*, 42(4), 545–52.
- Garcia, A., Barbaras, R., Collet, X., Bogyo, A., Chap, H., Perret, B., & Inserm, U. (1996). High-Density Lipoprotein 3 Receptor-Dependent Endocytosis Pathway in a Human. *Biochemistry*, 2960(95), 13064–13071.
- Genoux, A., Pons, V., Radojkovic, C., Roux-Dalvai, F., Combes, G., Rolland, C., Malet, N., et al. (2011). Mitochondrial inhibitory factor 1 (IF1) is present in human serum and is

- positively correlated with HDL-cholesterol. *PloS one*, 6(9), e23949.
doi:10.1371/journal.pone.0023949
- Giorgio, V., Bisetto, E., Franca, R., Harris, D. a, Passamonti, S., & Lippe, G. (2010). The ectopic F(O)F(1) ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor protein IF1. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 42(2), 117–23.
doi:10.1007/s10863-010-9270-2
- Goldberg, A. S., & Hegele, R. a. (2012). Cholesteryl ester transfer protein inhibitors for dyslipidemia: focus on dalcetrapib. *Drug design, development and therapy*, 6, 251–9.
doi:10.2147/DDDT.S34976
- Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., & Dawber, T. R. (1977a). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *The American journal of medicine*, 62(5), 707–14.
- Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., & Dawber, T. R. (1977b). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *The American journal of medicine*, 62(5), 707–14.
- Graf, G., Li, W., & Gerard, R. (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *Journal of Clinical ...*, 110(5), 659–669. doi:10.1172/JCI200216000.Introduction
- Graham, T. L., Mookherjee, C., Suckling, K. E., Palmer, C. N. A., & Patel, L. (2005). The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis*, 181(1), 29–37. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.028
- Groot, P. H. E., Groen, A. K., & Kuipers, F. (2005). Increased Fecal Neutral Sterol Loss Upon Liver X Receptor Activation Is Independent of Biliary Sterol Secretion in Mice. *Gastroenterology*, 128, 147–156. doi:10.1053/j.gast.2004.10.006
- Groot, P. H. E., Pearce, N. J., Yates, J. W., Stocker, C., Sauermelch, C., Doe, C. P., Willette, R. N., et al. (2005). Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *Journal of lipid research*, 46(10), 2182–91. doi:10.1194/jlr.M500116-JLR200
- Guendouzi, K., Collet, X., Perret, B., Chap, H., & Barbaras, R. (1998). Remnant high density lipoprotein2 particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG2). *Biochemistry*, 37(42), 14974–80. doi:10.1021/bi9810508
- Guendouzi, Karim, Collet, X., & Perret, B. (1998). Remnant high density lipoprotein2 particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (. *Biochemistry*, 14974–14980.
- Haghpasand, M., Bourassa, P. K., Francone, O. L., & Aiello, R. J. (2001). Monocyte / macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J.Clinical Investigation*, 108(9), 1273–1275. doi:10.1172/JCI200112810.Introduction

- Harada, L. M., Amigo, L., Cazita, P. M., Salerno, A. G., Rigotti, A. a, Quintão, E. C. R., & Oliveira, H. C. F. (2007). CETP expression enhances liver HDL-cholesteryl ester uptake but does not alter VLDL and biliary lipid secretion. *Atherosclerosis*, *191*(2), 313–8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.036
- Hartman, H. B., Gardell, S. J., Petucci, C. J., Wang, S., Krueger, J. a, & Evans, M. J. (2009). Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR^{-/-} and apoE^{-/-} mice. *Journal of lipid research*, *50*(6), 1090–100. doi:10.1194/jlr.M800619-JLR200
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2008). Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Postgraduate medical journal*, *84*(997), 590–8. doi:10.1136/hrt.2007.125401
- Hayek, T., Oiknine, J., Brook, J., & Aviram, M. (1994). Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. *Biochemical and biophysical ...*, *201*, 1567–1574.
- Henkel, A. S., Kavesh, M. H., Kriss, M. S., Dewey, A. M., Rinella, M. E., & Green, R. M. (2011). Hepatic overexpression of abcb11 promotes hypercholesterolemia and obesity in mice. *Gastroenterology*, *141*(4), 1404–11, 1411.e1–2. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.062
- Hoekstra, M., Berkel, T. J. C. Van, & Eck, M. Van. (2010). Scavenger receptor BI : A multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol*, *16*(47), 5916–5924. doi:10.3748/wjg.v16.i47.5916
- Homanics, G. E., Silava, H., Osada, J., Zhang, S. H., Wong, H., Borensztajn, J., & Maeda, N. (1995). Mild Dyslipidemia in mice following targeted inactivation of thr hepatic lipase gene. *The Journal of biological chemistry*, *270*(7), 2974–2980.
- Hu, X., Dietz, J. D., Xia, C., Knight, D. R., Loging, W. T., Smith, A. H., Yuan, H., et al. (2009). Torcetrapib induces aldosterone and cortisol production by an intracellular calcium-mediated mechanism independently of cholesteryl ester transfer protein inhibition. *Endocrinology*, *150*(5), 2211–9. doi:10.1210/en.2008-1512
- Huby, T., Doucet, C., Dachet, C., Ouzilleau, B., Ueda, Y., Afzal, V., Rubin, E., et al. (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J.Clin.Invest*, *116*(10), 2767–2776. doi:10.1172/JCI26893.In
- Hui, D. Y., & Howles, P. N. (2005). Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Seminars in cell & developmental biology*, *16*(2), 183–92. doi:10.1016/j.semcd.2005.01.003
- Ingall, A. H., Dixon, J., Bailey, A., Coombs, M. E., Cox, D., McNally, J. I., Hunt, S. F., et al. (1999). Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, *42*(2), 213–20. doi:10.1021/jm981072s
- Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P. K., Herz, J., & Russell, D. W. (1996). Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid

- and vitamin supplementation. *The Journal of biological chemistry*, 271(30), 18017–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663429>
- Ishida, T., Choi, S. Y., Kundu, R. K., Spin, J., Yamashita, T., Hirata, K., Kojima, Y., et al. (2004). Endothelial lipase modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*, 279(43), 45085–92. doi:10.1074/jbc.M406360200
- Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L. O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., Nauze, M., et al. (2005). The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(21), 2508–15. doi:10.1007/s00018-005-5194-0
- Ji, Y., Wang, N., Ramakrishnan, R., Sehayek, E., Huszar, D., Breslow, J. L., & Tall, a R. (1999). Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *The Journal of biological chemistry*, 274(47), 33398–402.
- Jiang, X. C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O. L., & Tall, a R. (1999). Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *The Journal of clinical investigation*, 103(6), 907–14. doi:10.1172/JCI5578
- Jiang, X. C., Qin, S., Qiao, C., Kawano, K., Lin, M., Skold, A., Xiao, X., et al. (2001). Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nature medicine*, 7(7), 847–52. doi:10.1038/89977
- Jiang, X.-C., Jin, W., & Hussain, M. M. (2012). The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism. *Nutrition & metabolism*, 9(1), 75. doi:10.1186/1743-7075-9-75
- Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. a, Collins, A. R., Laffitte, B. a, Chen, M., et al. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7604–9. doi:10.1073/pnas.112059299
- Joyce, C., Freeman, L., Brewer, H. B., & Santamarina-Fojo, S. (2003). Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(6), 965–71. doi:10.1161/01.ATV.0000055194.85073.FF
- Kamanna, V. S., & Kashyap, M. L. (2008). Mechanism of Action of Niacin. *The American Journal of Cardiology*, 101(8), S20–S26. doi:10.1016/j.amjcard.2008.02.029
- Kawashiri, M., Zhang, Y., Puré, E., & Rader, D. J. (2002). Combined effects of cholesterol reduction and apolipoprotein A-I expression on atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Atherosclerosis*, 165(1), 15–22.
- Kitajima, K., Marchadier, D. H. L., Miller, G. C., Gao, G., Wilson, J. M., & Rader, D. J. (2006). Complete prevention of atherosclerosis in apoE-deficient mice by hepatic human apoE gene transfer with adeno-associated virus serotypes 7 and 8. *Arteriosclerosis*,

thrombosis, and vascular biology, 26(8), 1852–7.
doi:10.1161/01.ATV.0000231520.26490.54

- Ko, K. W. S., Paul, A., Ma, K., Li, L., & Chan, L. (2005). Endothelial lipase modulates HDL but has no effect on atherosclerosis development in apoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mice. *Journal of lipid research*, 46(12), 2586–94. doi:10.1194/jlr.M500366-JLR200
- Kosters, A., Kunne, C., & Looije, N. (2006). The mechanism of ABCG5/ABCG8 in biliary cholesterol secretion in mice. *Journal of lipid ...*, 47(9), 1959–1966.
- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Glick, J. M., Krieger, M., & Rader, D. J. (2000). Gene Transfer and Hepatic Overexpression of the HDL Receptor SR-BI Reduces Atherosclerosis in the Cholesterol-Fed LDL Receptor-Deficient Mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(3), 721–727. doi:10.1161/01.ATV.20.3.721
- Kuipers, F., Van Ree, J. M., Hofker, M. H., Wolters, H., In't Veld, G., Havinga, R., Vonk, R. J., et al. (1996). Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(1), 241–7. doi:10.1002/hep.510240138
- Kuivenhoven, J. a, Pritchard, H., Hill, J., Frohlich, J., Assmann, G., & Kastelein, J. (1997). The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *Journal of lipid research*, 38(2), 191–205.
- Kuivenhoven, J. A., De Grooth, G. J., Kawamura, H., Klerkx, A. H., Wilhelm, F., Trip, M. D., & Kastelein, J. J. P. (2005). Effectiveness of inhibition of cholesteryl ester transfer protein by JTT-705 in combination with pravastatin in type II dyslipidemia. *The American journal of cardiology*, 95(9), 1085–8. doi:10.1016/j.amjcard.2004.12.064
- Kuwabara, P. E., & Labouesse, M. (2002). The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends in genetics : TIG*, 18(4), 193–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932020>
- Lambert, G., Sakai, N., Vaisman, B. L., Neufeld, E. B., Marteyn, B., Chan, C. C., Paigen, B., et al. (2001). Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*, 276(18), 15090–8. doi:10.1074/jbc.M008466200
- Lee, F. Y., Lee, H., Hubbert, M. L., Edwards, P. a, & Zhang, Y. (2006). FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends in biochemical sciences*, 31(10), 572–80. doi:10.1016/j.tibs.2006.08.002
- Lee, J.-Y., Timmins, J. M., Mulya, A., Smith, T. L., Zhu, Y., Rubin, E. M., Chisholm, J. W., et al. (2005). HDLs in apoA-I transgenic Abca1 knockout mice are remodeled normally in plasma but are hypercatabolized by the kidney. *Journal of lipid research*, 46(10), 2233–45. doi:10.1194/jlr.M500179-JLR200
- Leon, A. S., & Sanchez, O. A. (2001). Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Medicine and science in sports and exercise*, 33(6 Suppl), S502–15; discussion S528–9.

- Li, A. C., Brown, K. K., Silvestre, M. J., Willson, T. M., Palinski, W., & Glass, C. K. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, *106*(4), 523–31. doi:10.1172/JCI10370
- Li-Hawkins, J., Gåfväls, M., Olin, M., Lund, E. G., Andersson, U., Schuster, G., Björkhem, I., et al. (2002). Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *The Journal of clinical investigation*, *110*(8), 1191–200. doi:10.1172/JCI16309
- Lipscombe, L. L., Gomes, T., Lévesque, L. E., Hux, J. E., Juurlink, D. N., & Alter, D. A. (2007). Thiazolidinediones and cardiovascular outcomes in older patients with diabetes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, *298*(22), 2634–43. doi:10.1001/jama.298.22.2634
- Lopez-Garcia, E., Van Dam, R. M., Li, T. Y., Rodriguez-Artalejo, F., & Hu, F. B. (2008). The relationship of coffee consumption with mortality. *Annals of internal medicine*, *148*(12), 904–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559841>
- Lukasova, M., Malaval, C., Gille, A., Kero, J., & Offermanns, S. (2011). Nicotinic acid inhibits progression of atherosclerosis in mice through its receptor GPR109A expressed by immune cells. *J.Clin.Invest*, *121*(3), 1163–1173. doi:10.1172/JCI41651.on
- Mahley, R., & Innerarity, T. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of lipid ...*, *25*, 1277–1294.
- Malaval, C., Laffargue, M., Barbaras, R., Rolland, C., Peres, C., Champagne, E., Perret, B., et al. (2009). RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cellular signalling*, *21*(1), 120–7. doi:10.1016/j.cellsig.2008.09.016
- Manninen, V., Elo, M. O., Frick, M. H., Haapa, K., Heinonen, O. P., Heinsalmi, P., Helo, P., et al. (1988). Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, *260*(5), 641–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3164788>
- Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., Miettinen, H. E., et al. (2001a). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research*, *42*(2), 170–80.
- Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., Miettinen, H. E., et al. (2001b). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research*, *42*(2), 170–80.
- Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J.-M., et al. (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Molecular pharmacology*, *64*(1), 104–12. doi:10.1124/mol.64.1.104

- Martinez, L O, Georgeaud, V., Rolland, C., Collet, X., Tercé, F., Perret, B., & Barbaras, R. (2000). Characterization of two high-density lipoprotein binding sites on porcine hepatocyte plasma membranes: contribution of scavenger receptor class B type I (SR-BI) to the low-affinity component. *Biochemistry*, 39(5), 1076–82.
- Martinez, Laurent O, Jacquet, S., Esteve, J., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., et al. (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 421(6918), 75–9. doi:10.1038/nature01250
- Maxfield, F. R., & Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438(7068), 612–21. doi:10.1038/nature04399
- Mazzone, T., Meyer, P. M., Feinstein, S. B., Davidson, M. H., Kondos, G. T., D'Agostino, R. B., Perez, A., et al. (2006). Effect of pioglitazone compared with glimepiride on carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 296(21), 2572–81. doi:10.1001/jama.296.21.joc60158
- McNeish, J., Aiello, R. J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K. L., et al. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4245–50.
- Mehlum, a, Gjernes, E., Solberg, L. a, Hagve, T. a, & Prydz, H. (2000). Overexpression of human lecithin:cholesterol acyltransferase in mice offers no protection against diet-induced atherosclerosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 108(5), 336–42.
- Mehlum, a, Staels, B., Duverger, N., Tailleux, A., Castro, G., Fievet, C., Luc, G., et al. (1995). Tissue-specific expression of the human gene for lecithin: cholesterol acyltransferase in transgenic mice alters blood lipids, lipoproteins and lipases towards a less atherogenic profile. *European journal of biochemistry / FEBS*, 230(2), 567–75.
- Meissner, M., Nijstad, N., Kuipers, F., & Tietge, U. J. (2010). Voluntary exercise increases cholesterol efflux but not macrophage reverse cholesterol transport in vivo in mice. *Nutrition & metabolism*, 7, 54. doi:10.1186/1743-7075-7-54
- Méndez-González, J., Julve, J., Rotllan, N., Llaverias, G., Blanco-Vaca, F., & Escolà-Gil, J. C. (2011). ATP-binding cassette G5/G8 deficiency causes hypertriglyceridemia by affecting multiple metabolic pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1811(12), 1186–93. doi:10.1016/j.bbali.2011.07.019
- Millar, J. S., Duffy, D., Gadi, R., Bloedon, L. T., Dunbar, R. L., Wolfe, M. L., Movva, R., et al. (2009). Potent and selective PPAR-alpha agonist LY518674 upregulates both ApoA-I production and catabolism in human subjects with the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(1), 140–6. doi:10.1161/ATVBAHA.108.171223
- Moore, K. J., Rayner, K. J., Suárez, Y., & Fernández-Hernando, C. (2010). microRNAs and cholesterol metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(12), 699–706. doi:10.1016/j.tem.2010.08.008

- Moore, R. E., Kawashiri, M., Kitajima, K., Secreto, A., Millar, J. S., Pratico, D., & Rader, D. J. (2003). Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *23*(10), 1914–20. doi:10.1161/01.ATV.0000092328.66882.F5
- Moore, R. E., Navab, M., Millar, J. S., Zimetti, F., Hama, S., Rothblat, G. H., & Rader, D. J. (2005). Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation. *Circulation research*, *97*(8), 763–71. doi:10.1161/01.RES.0000185320.82962.F7
- Morehouse, L. A., Sugarman, E. D., Bourassa, P.-A., Sand, T. M., Zimetti, F., Gao, F., Rothblat, G. H., et al. (2007). Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *Journal of lipid research*, *48*(6), 1263–72. doi:10.1194/jlr.M600332-JLR200
- Mozaffarian, D., & Rimm, E. B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, *296*(15), 1885–99. doi:10.1001/jama.296.15.1885
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., & Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*, *93*(2), 229–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9568715>
- Naik, S. U., Wang, X., Da Silva, J. S., Jaye, M., Macphee, C. H., Reilly, M. P., Billheimer, J. T., et al. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*, *113*(1), 90–7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.560177
- Nakashima, Y., Plump, a. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *14*(1), 133–140. doi:10.1161/01.ATV.14.1.133
- Nakaya, K., Tohyama, J., Naik, S. U., Tanigawa, H., MacPhee, C., Billheimer, J. T., & Rader, D. J. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation promotes macrophage reverse cholesterol transport through a liver X receptor-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *31*(6), 1276–82. doi:10.1161/ATVBAHA.111.225383
- Navab, M. (2002). Oral Administration of an Apo A-I Mimetic Peptide Synthesized From D-Amino Acids Dramatically Reduces Atherosclerosis in Mice Independent of Plasma Cholesterol. *Circulation*, *105*(3), 290–292. doi:10.1161/hc0302.103711
- Navab, Mohamad, Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Hama, S., Hough, G., Grijalva, V. R., Wagner, A. C., et al. (2004). Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, *109*(25), 3215–20. doi:10.1161/01.CIR.0000134275.90823.87

- Nicholls, S. J., Brewer, H. B., Kastelein, J. J. P., Krueger, K. A., Wang, M.-D., Shao, M., Hu, B., et al. (2011). Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 306(19), 2099–109. doi:10.1001/jama.2011.1649
- Nishimoto, T., Pellizzon, M. a, Aihara, M., Stylianou, I. M., Billheimer, J. T., Rothblat, G., & Rader, D. J. (2009). Fish oil promotes macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(10), 1502–8. doi:10.1161/ATVBAHA.109.187252
- Nissen, S. E., Nicholls, S. J., Wolski, K., Howey, D. C., McErlean, E., Wang, M.-D., Gomez, E. V., et al. (2007). Effects of a potent and selective PPAR-alpha agonist in patients with atherogenic dyslipidemia or hypercholesterolemia: two randomized controlled trials. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 297(12), 1362–73. doi:10.1001/jama.297.12.1362
- Nissen, S. E., Tsunoda, T., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Cooper, C. J., Yasin, M., Eaton, G. M., et al. (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 290(17), 2292–300. doi:10.1001/jama.290.17.2292
- Nissen, S. E., & Wolski, K. (2007). Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *The New England journal of medicine*, 356(24), 2457–71. doi:10.1056/NEJMoa072761
- Olchawa, B., Kingwell, B. A., Hoang, A., Schneider, L., Miyazaki, O., Nestel, P., & Sviridov, D. (2004). Physical fitness and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(6), 1087–91. doi:10.1161/01.ATV.0000128124.72935.0f
- Olson, E. J., Pearce, G. L., Jones, N. P., & Sprecher, D. L. (2012). Lipid effects of peroxisome proliferator-activated receptor- δ agonist GW501516 in subjects with low high-density lipoprotein cholesterol: characteristics of metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2289–94. doi:10.1161/ATVBAHA.112.247890
- Oram, J. F., & Vaughan, A. M. (2006). ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circulation research*, 99(10), 1031–43. doi:10.1161/01.RES.0000250171.54048.5c
- Orriss, I., Syberg, S., Wang, N., Robaye, B., Gartland, A., Jorgensen, N., Arnett, T., et al. (2011). Bone phenotypes of P2 receptor knockout mice. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 3, 1038–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622253>
- Out, R., Hoekstra, M., De Jager, S. C. a, De Vos, P., Van der Westhuyzen, D. R., Webb, N. R., Van Eck, M., et al. (2005). Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice. *Journal of lipid research*, 46(6), 1172–81. doi:10.1194/jlr.M400361-JLR200

- Out, R., Hoekstra, M., Hildebrand, R. B., Kruit, J. K., Meurs, I., Li, Z., Kuipers, F., et al. (2006). Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *26*(10), 2295–300. doi:10.1161/01.ATV.0000237629.29842.4c
- Peeters, S. D. P. W. M., Van der Kolk, D. M., De Haan, G., Bystrykh, L., Kuipers, F., De Vries, E. G. E., & Vellenga, E. (2006). Selective expression of cholesterol metabolism genes in normal CD34⁺CD38⁻ cells with a heterogeneous expression pattern in AML cells. *Experimental hematology*, *34*(5), 622–30. doi:10.1016/j.exphem.2006.01.020
- Pennings, M., Hildebrand, R. B., Ye, D., Kunne, C., Van Berkel, T. J. C., Groen, A. K., & Van Eck, M. (2007). Bone marrow-derived multidrug resistance protein ABCB4 protects against atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice. *Cardiovascular research*, *76*(1), 175–83. doi:10.1016/j.cardiores.2007.05.016
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M., & Maeda, N. (1992a). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(10), 4471–5.
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M., & Maeda, N. (1992b). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(10), 4471–5.
- Plump AS, Smith JD, T, H., Aalto-Setälä K, Walsh A, JG, V., EM, R., et al. (1992a). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, *71*, 343–53.
- Plump AS, Smith JD, T, H., Aalto-Setälä K, Walsh A, JG, V., EM, R., et al. (1992b). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, *71*, 343–53.
- Qin, S., Kawano, K., Bruce, C., Lin, M., Bisgaier, C., Tall, a R., & Jiang, X. (2000). Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low high density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apoA-IV-rich lamellar lipoproteins. *Journal of lipid research*, *41*(2), 269–76.
- Rader, D. (2006). Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(12). doi:10.1172/JCI30163.3090
- Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Yvan-Charvet, L., Welch, C., & Tall, A. R. (2006). Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with *Abcg1*^{-/-} bone marrow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *26*(10), 2308–15. doi:10.1161/01.ATV.0000242275.92915.43
- Rayner, K., Esau, C., & Hussain, F. (2011). Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*, *478*(7369), 404–407. doi:10.1038/nature10486.Inhibition

- Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M. L., Tamehiro, N., Fisher, E. A., et al. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5985), 1570–3. doi:10.1126/science.1189862
- Rayner, K., & Sheedy, F. (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *The Journal of clinical ...*, 121(7), 2921–2931. doi:10.1172/JCI57275.eration
- Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., et al. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & development*, 14(22), 2819–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rigotti, a, Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., & Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12610–5.
- Rittershaus, C. W., Miller, D. P., Thomas, L. J., Picard, M. D., Honan, C. M., Emmett, C. D., Pettey, C. L., et al. (2000). Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(9), 2106–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978256>
- Robins, S. J., Collins, D., Wittes, J. T., Papademetriou, V., Deedwania, P. C., Schaefer, E. J., McNamara, J. R., et al. (2001). Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 285(12), 1585–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268266>
- Rocco, D. D. F. M., Okuda, L. S., Pinto, R. S., Ferreira, F. D., Kubo, S. K., Nakandakare, E. R., Quintão, E. C. R., et al. (2011). Aerobic exercise improves reverse cholesterol transport in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *Lipids*, 46(7), 617–25. doi:10.1007/s11745-011-3555-z
- Roma, P., Gregg, R., & Meng, M. (1993). In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein AI, apo A-IMilano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *Journal of Clinical ...*, 1445–1452.
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Davidson, W. S., Fayad, Z. a, Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., et al. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, 125(15), 1905–19. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589
- Rothblat, G. H., De la Llera-Moya, M., Favari, E., Yancey, P. G., & Kellner-Weibel, G. (2002). Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations. *Atherosclerosis*, 163(1), 1–8.

- Rubins, H. B., Robins, S. J., Collins, D., Fye, C. L., Anderson, J. W., Elam, M. B., Faas, F. H., et al. (1999). Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *The New England journal of medicine*, *341*(6), 410–8. doi:10.1056/NEJM199908053410604
- Ruotolo, G., Ericsson, C. G., Tettamanti, C., Karpe, F., Grip, L., Svane, B., Nilsson, J., et al. (1998). Treatment effects on serum lipoprotein lipids, apolipoproteins and low density lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (B. *Journal of the American College of Cardiology*, *32*(6), 1648–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822092>
- Rye, K.-A., & Barter, P. J. (2004). Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *24*(3), 421–8. doi:10.1161/01.ATV.0000104029.74961.f5
- Sakai, N., Vaisman, B., & Koch, C. (1997). Targeted disruption of the mouse lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) gene. *Journal of Biological ...*, *272*(11), 7506–7510.
- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & development*, *14*(22), 2831–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sevov, M., Elfineh, L., & Cavelier, L. B. (2006). Resveratrol regulates the expression of LXR-alpha in human macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, *348*(3), 1047–54. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.155
- Shah, P. K., Nilsson, J., Kaul, S., Fishbein, M. C., Ageland, H., Hamsten, A., Johansson, J., et al. (1998). Effects of Recombinant Apolipoprotein A-IMilano on Aortic Atherosclerosis in Apolipoprotein E Deficient Mice. *Circulation*, *97*(8), 780–785. doi:10.1161/01.CIR.97.8.780
- Shah, P. K., Yano, J., Reyes, O., Chyu, K.-Y., Kaul, S., Bisgaier, C. L., Drake, S., et al. (2001). High-Dose Recombinant Apolipoprotein A-IMilano Mobilizes Tissue Cholesterol and Rapidly Reduces Plaque Lipid and Macrophage Content in Apolipoprotein E-Deficient Mice : Potential Implications for Acute Plaque Stabilization. *Circulation*, *103*(25), 3047–3050. doi:10.1161/hc2501.092494
- Singaraja, R. R., Van Eck, M., Bissada, N., Zimetti, F., Collins, H. L., Hildebrand, R. B., Hayden, A., et al. (2006). Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation*, *114*(12), 1301–9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621433
- Sprecher, D. L., Massien, C., Pearce, G., Billin, A. N., Perlstein, I., Willson, T. M., Hassall, D. G., et al. (2007). Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist.

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 27(2), 359–65.
doi:10.1161/01.ATV.0000252790.70572.0c

- Spuhler, P., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., & Seelig, J. (1994). Binding of apolipoprotein A-I model peptides to lipid bilayers. Measurement of binding isotherms and peptide-lipid headgroup interactions. *The Journal of biological chemistry*, 269(39), 23904–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929037>
- Stengel, D., Landeloos, M., Lox, M., Le Gat, L., Collen, D., Holvoet, P., & Ninio, E. (2000). Effect of Overexpression of Human Apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 Apo E-Deficient Mice on 2 Lipoprotein-Associated Enzymes, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase and Paraoxonase : Comparison of Adenovirus-Mediated Human Apo A-I Gene Transfer and Human. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(10), e68–e75.
doi:10.1161/01.ATV.20.10.e68
- Stieger, B., Meier, Y., & Meier, P. J. (2007). The bile salt export pump. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 453(5), 611–20. doi:10.1007/s00424-006-0152-8
- Storey, R. F., Oldroyd, K. G., & Wilcox, R. G. (2001). Open multicentre study of the P2T receptor antagonist AR-C69931MX assessing safety, tolerability and activity in patients with acute coronary syndromes. *Thrombosis and haemostasis*, 85(3), 401–7.
- Sugano, M., Makino, N., Sawada, S., Otsuka, S., Watanabe, M., Okamoto, H., Kamada, M., et al. (1998). Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *The Journal of biological chemistry*, 273(9), 5033–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9478952>
- Tailleux, A., Duriez, P., Fruchart, J.-C., & Clavey, V. (2002). Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 164(1), 1–13.
- Tanigawa, H., Billheimer, J. T., Tohyama, J., Fuki, I. V., Ng, D. S., Rothblat, G. H., & Rader, D. J. (2009). Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*, 120(2), 160–9.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.825109
- Tanigawa, H., Billheimer, J. T., Tohyama, J., Zhang, Y., Rothblat, G., & Rader, D. J. (2007). Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport. *Circulation*, 116(11), 1267–73.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.704254
- Tardif, J.-C., Grégoire, J., L'Allier, P. L., Ibrahim, R., Lespérance, J., Heinonen, T. M., Kouz, S., et al. (2007). Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 297(15), 1675–82. doi:10.1001/jama.297.15.jp70004
- Tchoua, U., D'Souza, W., Mukhamedova, N., Blum, D., Niesor, E., Mizrahi, J., Maugeais, C., et al. (2008). The effect of cholesteryl ester transfer protein overexpression and inhibition on reverse cholesterol transport. *Cardiovascular research*, 77(4), 732–9.
doi:10.1093/cvr/cvm087

- Temel, R., Sawyer, J., Yu, L., & Lord, C. (2010). Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell metabolism*, *12*(1), 96–102. doi:10.1016/j.cmet.2010.05.011.Biliary
- Temel, R., Tang, W., & Ma, Y. (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *Journal of Clinical ...*, *117*(7). doi:10.1172/JCI30060.1968
- Terra, S. G., Francone, O. L., Contant, C. F., Gao, X., Lewin, A. J., & Nguyen, T. T. (2008). Efficacy and safety of a potent and selective peroxisome proliferator activated receptor alpha agonist in subjects with dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *The American journal of cardiology*, *102*(4), 434–9. doi:10.1016/j.amjcard.2008.03.076
- Toh, S.-A., Millar, J. S., Billheimer, J., Fuki, I., Naik, S. U., Macphee, C., Walker, M., et al. (2011). PPAR γ activation redirects macrophage cholesterol from fecal excretion to adipose tissue uptake in mice via SR-BI. *Biochemical pharmacology*, *81*(7), 934–41. doi:10.1016/j.bcp.2011.01.012
- Tsukamoto, K., Tangirala, R., Chun, S. H., Pure, E., & Rader, D. J. (1999). Rapid Regression of Atherosclerosis Induced by Liver-Directed Gene Transfer of ApoE in ApoE-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *19*(9), 2162–2170. doi:10.1161/01.ATV.19.9.2162
- Turner, S., Voogt, J., Davidson, M., Glass, A., Killion, S., Decaris, J., Mohammed, H., et al. (2012). Measurement of reverse cholesterol transport pathways in humans: in vivo rates of free cholesterol efflux, esterification, and excretion. *Journal of the American Heart Association*, *1*(4), e001826. doi:10.1161/JAHA.112.001826
- Ueda, Y., Royer, L., Gong, E., Zhang, J., Cooper, P. N., Francone, O., & Rubin, E. M. (1999). Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, *274*(11), 7165–71.
- Uto-Kondo, H., Ayaori, M., Ogura, M., Nakaya, K., Ito, M., Suzuki, A., Takiguchi, S., et al. (2010). Coffee consumption enhances high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Circulation research*, *106*(4), 779–87. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206615
- Valacchi, G., Sticozzi, C., Lim, Y., & Pecorelli, A. (2011). Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1229*, E1–7. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06205.x
- Valenta, D. T., Bulgrien, J. J., Banka, C. L., & Curtiss, L. K. (2006). Overexpression of human ApoAI transgene provides long-term atheroprotection in LDL receptor-deficient mice. *Atherosclerosis*, *189*(2), 255–63. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.019
- Van der Velde, A. E., Vrins, C. L. J., Van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R. P. J., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*, *133*(3), 967–75. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.019

- Van Eck, M., Pennings, M., Hoekstra, M., Out, R., & Van Berkel, T. J. (2005). Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, *16*(3), 307–15.
- Van Eck, M., Singaraja, R. R., Ye, D., Hildebrand, R. B., James, E. R., Hayden, M. R., & Van Berkel, T. J. C. (2006). Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *26*(4), 929–34. doi:10.1161/01.ATV.0000208364.22732.16
- Van Haperen, R., Van Tol, A., Vermeulen, P., Jauhiainen, M., Van Gent, T., Van den Berg, P., Ehnholm, S., et al. (2000). Human Plasma Phospholipid Transfer Protein Increases the Antiatherogenic Potential of High Density Lipoproteins in Transgenic Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *20*(4), 1082–1088. doi:10.1161/01.ATV.20.4.1082
- Van Haperen, R., Samyn, H., Moerland, M., Van Gent, T., Peeters, M., Grosveld, F., Van Tol, A., et al. (2008). Elevated expression of phospholipid transfer protein in bone marrow derived cells causes atherosclerosis. *PloS one*, *3*(5), e2255. doi:10.1371/journal.pone.0002255
- Varban, M. L., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Gosselin, M. L., et al. (1998). Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(8), 4619–24.
- Voight, B. F., Peloso, G. M., Orho-Melander, M., Frikke-Schmidt, R., Barbalic, M., Jensen, M. K., Hindy, G., et al. (2012). Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*, *380*(9841), 572–80. doi:10.1016/S0140-6736(12)60312-2
- Voloshyna, I., & Reiss, A. B. (2011). The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis. *Progress in lipid research*, *50*(3), 213–24. doi:10.1016/j.plipres.2011.02.001
- Waksman, R., Torguson, R., Kent, K. M., Pichard, A. D., Suddath, W. O., Satler, L. F., Martin, B. D., et al. (2010). A first-in-man, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, *55*(24), 2727–35. doi:10.1016/j.jacc.2009.12.067
- Wang, L.-J., & Song, B.-L. (2012). Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochimica et biophysica acta*, *1821*(7), 964–72. doi:10.1016/j.bbali.2012.03.004
- Wang, M., Kong, Q., Gonzalez, F. A., Sun, G., Erb, L., Seye, C., & Weisman, G. A. (2005). P2Y nucleotide receptor interaction with alpha integrin mediates astrocyte migration. *Journal of neurochemistry*, *95*(3), 630–40. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03408.x
- Wang, M.-D., Franklin, V., & Marcel, Y. L. (2007). In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *27*(8), 1837–42. doi:10.1161/ATVBAHA.107.146068

- Wang, R., Salem, M., Yousef, I. M., Tuchweber, B., Lam, P., Childs, S. J., Helgason, C. D., et al. (2001). Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 2011–6. doi:10.1073/pnas.031465498
- Wang, X., & Collins, H. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Journal of Clinical ...*, 117(8). doi:10.1172/JCI32057DS1
- Warden, C., & Hedrick, C. (1993a). Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science (New York, ...)*, 261.
- Warden, C., & Hedrick, C. (1993b). Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science (New York, ...)*, 261.
- Weisgraber, K., & Bersot, T. (1980). A-Imilano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the AI apoprotein from human high density lipoproteins. *Journal of Clinical ...*, 66(November).
- Weng, W., & Breslow, J. L. (1996). Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14788–94.
- Westerterp, M., Gourion-Arsiquaud, S., Murphy, A. J., Shih, A., Cremers, S., Levine, R. L., Tall, A. R., et al. (2012). Regulation of hematopoietic stem and progenitor cell mobilization by cholesterol efflux pathways. *Cell stem cell*, 11(2), 195–206. doi:10.1016/j.stem.2012.04.024
- Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Kuipers, F., & Tietge, U. J. F. (2009a). Hepatic SR-BI, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. *Journal of lipid research*, 50(8), 1571–80. doi:10.1194/jlr.M800434-JLR200
- Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Kuipers, F., & Tietge, U. J. F. (2009b). Hepatic SR-BI, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. *Journal of lipid research*, 50(8), 1571–80. doi:10.1194/jlr.M800434-JLR200
- Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Oude Elferink, R. P. J., Kuipers, F., & Tietge, U. J. F. (2009). Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(4), 1263–72. doi:10.1002/hep.23112
- Wu, J. E., Basso, F., Shamburek, R. D., Amar, M. J. a, Vaisman, B., Szakacs, G., Joyce, C., et al. (2004). Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 279(22), 22913–25. doi:10.1074/jbc.M402838200

- Wüstner, D. (2006). Quantification of polarized trafficking of transferrin and comparison with bulk membrane transport in hepatic cells. *The Biochemical journal*, 400(2), 267–80. doi:10.1042/BJ20060626
- Yano, S., Tsukimoto, M., Harada, H., & Kojima, S. (2012). Involvement of P2Y13 receptor in suppression of neuronal differentiation. *Neuroscience letters*, 518(1), 5–9. doi:10.1016/j.neulet.2012.04.021
- Yu, L., Hammer, R. E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2002). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16237–42. doi:10.1073/pnas.252582399
- Yu, L., & Li-Hawkins, J. (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *Journal of Clinical ...*, 110(5). doi:10.1172/JCI200216001.Introduction
- Yu, L., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Hobbs, H. H., & Cohen, J. C. (2004). Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *Journal of lipid research*, 45(2), 301–7. doi:10.1194/jlr.M300377-JLR200
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E. L., Avagyan, S., Siry, R. L., Han, S., Welch, C. L., et al. (2010). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5986), 1689–93. doi:10.1126/science.1189731
- Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., Welch, C., et al. (2007). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 117(12), 3900–8. doi:10.1172/JCI33372
- Zanotti, I., Pedrelli, M., Potì, F., Stomeo, G., Gomaschi, M., Calabresi, L., & Bernini, F. (2011). Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(1), 74–80. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213892
- Zhang, L.-H., Kamanna, V. S., Zhang, M. C., & Kashyap, M. L. (2008). Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *Journal of lipid research*, 49(6), 1195–201. doi:10.1194/jlr.M700426-JLR200
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. a., & Maeda, N. (1992a). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), 468–71.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. a., & Maeda, N. (1992b). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), 468–71.
- Zhang, W., Yancey, P. G., Su, Y. R., Babaev, V. R., Zhang, Y., Fazio, S., & Linton, M. F. (2003). Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes

atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 108(18), 2258–63. doi:10.1161/01.CIR.0000093189.97429.9D

Zhang, Yanqiao, Yin, L., Anderson, J., Ma, H., Gonzalez, F. J., Willson, T. M., & Edwards, P. a. (2010). Identification of novel pathways that control farnesoid X receptor-mediated hypocholesterolemia. *The Journal of biological chemistry*, 285(5), 3035–43. doi:10.1074/jbc.M109.083899

Zhang, Yuanyuan, Li, F., Patterson, A. D., Wang, Y., Krausz, K. W., Neale, G., Thomas, S., et al. (2012). Abcb11 deficiency induces cholestasis coupled to impaired β -fatty acid oxidation in mice. *The Journal of biological chemistry*, 287(29), 24784–94. doi:10.1074/jbc.M111.329318

Zhang, YuZhen, Da Silva, J. R., Reilly, M., Billheimer, J. T., Rothblat, G. H., & Rader, D. J. (2005). Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2870–4. doi:10.1172/JCI25327

Zhang, YuZhen, McGillicuddy, F. C., Hinkle, C. C., O'Neill, S., Glick, J. M., Rothblat, G. H., & Reilly, M. P. (2010). Adipocyte modulation of high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation*, 121(11), 1347–55. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.897330

Zhang, YuZhen, Zanotti, I., Reilly, M. P., Glick, J. M., Rothblat, G. H., & Rader, D. J. (2003). Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*, 108(6), 661–3. doi:10.1161/01.CIR.0000086981.09834.E0

ANNEXES

**Role of the ubiquitin-proteasome system in the regulation of P2Y₁₃ receptor
expression: impact on hepatic HDL uptake**

Accepted in CMLS

Véronique Pons^{1,2}, Nizar Serhan^{1,2}, Stéphanie Gayral^{1,2}, Camille Malaval^{1,2}, Michel Nauze^{1,2}, Nicole Malet^{1,2},
Muriel Laffargue^{1,2}, Céline Galès^{1,2} and Laurent O. Martinez^{1,2}

¹INSERM, UMR 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, 31000, France ;

²Université de Toulouse III, UMR 1048, Toulouse, 31300 France.

Keywords: G-protein coupled receptor, ubiquitination, BRET assay, reverse cholesterol transport, lipoproteins

Corresponding authors:

Laurent O. Martinez and Véronique Pons,

INSERM U1048, Bât. L3, Hôpital Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 03, France.

Tel: + 33 531 224 147; Fax: +33 561 325 616;

E-mail: Laurent.Martinez@inserm.fr / veronique.pons@inserm.fr

ABSTRACT

The protective effect of high density lipoproteins (HDL) against atherosclerosis is mainly attributed to their capacity to transport excess cholesterol from peripheral tissues back to the liver for further elimination into the bile, a process called reverse cholesterol transport (RCT). Recently, the importance of the P2Y₁₃ receptor (P2Y₁₃-R) was highlighted in HDL metabolism since HDL uptake by the liver was decreased in P2Y₁₃-R deficient mice, which translated into impaired RCT. Here, we investigated for the first time the molecular mechanisms regulating cell surface expression of P2Y₁₃-R. When transiently expressed, P2Y₁₃-R was mainly detected in the endoplasmic reticulum (ER) and strongly subjected to proteasome degradation while its homologous P2Y₁₂ receptor (P2Y₁₂-R) was efficiently targeted to the plasma membrane. We observed an inverse correlation between cell surface expression and ubiquitination level of P2Y₁₃-R in the ER, suggesting a close link between ubiquitination of P2Y₁₃-R and its efficient targeting to the plasma membrane. The C-terminus tail exchange between P2Y₁₃-R and P2Y₁₂-R strongly restored plasma membrane expression of P2Y₁₃-R, suggesting the involvement of the intra-cytoplasmic tail of P2Y₁₃-R in expression defect. Accordingly, proteasomal inhibition increased plasma membrane expression of functionally active P2Y₁₃-R in hepatocytes, and consequently stimulated P2Y₁₃-R-mediated HDL endocytosis. Importantly, proteasomal inhibition strongly potentiated HDL hepatic uptake (>200%) in wild-type but not in P2Y₁₃-R deficient mice, thus reinforcing the role of P2Y₁₃-R expression in regulating HDL metabolism. Therefore, specific inhibition of the ubiquitin-proteasome system might be a novel powerful HDL therapy to enhance P2Y₁₃-R expression and consequently promote the overall RCT.

INTRODUCTION

Several prospective studies have established that plasma level of high density lipoprotein (HDL) cholesterol (HDL-C) is an independent negative risk factor for coronary heart diseases and thus represents a major protective factor against atherosclerosis. HDL exert direct vasculo-protective functions through their anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-thrombotic and cyto-protective properties but their main atheroprotective action is attributed to their metabolic role in reverse cholesterol transport (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up from peripheral cells (cholesterol efflux), processed into HDL particles, and then later delivered to the liver (cholesterol uptake) for further metabolism and bile excretion. RCT relies on specific interactions between HDL particles and both peripheral cells and hepatocytes. Among cellular proteins interacting with HDL, some contribute to the cholesterol efflux such as cellular ATP binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1 [1], whereas others are involved in hepatic HDL cholesterol uptake. To date, two distinct cell surface receptors are known to contribute to HDL uptake by the liver: i) the scavenger receptor class B type I (SR-BI) that is involved in selective uptake of cholesterol ester from HDL [2], ii) the membrane-associated ecto-F₁-ATPase identified as a high affinity receptor for the major protein component of HDL, apolipoprotein A-I (apoA-I) and involved in the uptake of both protein and lipid moieties of the HDL particles, a process called HDL holoparticle endocytosis [3]. Basically, apoA-I binds the ecto-F₁-ATPase at the cell surface of hepatocytes, promoting ATP hydrolysis into ADP which in turn leads to subsequent activation of a G-protein coupled receptor (GPCR) – namely P2Y₁₃ receptor (P2Y₁₃-R). P2Y₁₃-R activation leads to a Rho/ROCKI signaling pathway and actin cytoskeleton reorganization that eventually stimulate HDL holoparticle endocytosis through an unknown low affinity receptor that is different from SR-BI [3–5].

We and others recently highlighted the physiological importance of P2Y₁₃-R *in vivo* since RCT was impaired in mice deficient for P2Y₁₃-R [6, 7]. Conversely, *in vivo* P2Y₁₃-R activation by bolus injection of its partial agonist Cangrelor (AR-C69931MX) increased biliary lipid secretions in wild-type but not P2Y₁₃-R knock-out mice [6]. Similarly, chronic pharmacological activation of P2Y₁₃-R by Cangrelor in mice increased hepatic HDL uptake and bile acid secretion [8]. Thus, P2Y₁₃-R appears as a promising pharmacological target in the field of emergent HDL-therapies aiming at modulating RCT and treating/preventing the development of atherosclerosis. Interestingly, nowadays, an important concept is that increasing HDL-C levels may not necessarily be the optimal target for the development of new therapies targeted toward HDL because the protective ability of HDL may be more related to cholesterol elimination through the RCT pathway. Thus, some new therapeutic

approaches are now focusing on promoting RCT, without necessarily raising HDL-C levels *per se*, supporting the notion that the function of HDL is more important than its concentration. Therefore, therapies that improve HDL “function”, even if they do not increase HDL-C levels, may have important anti-atherogenic and vascular protective effects. With this in mind, we hypothesized that enhancing P2Y₁₃-R expression at the cell surface of hepatocytes could be highly relevant to increase HDL hepatic uptake and consequently promote RCT and cholesterol elimination.

P2Y₁₃-R belongs to the GPCR family and shares a high homology sequence with P2Y₁₂ receptor (P2Y₁₂-R), another ADP receptor, as well as similar functional features such as G α i protein coupling [9]. In addition to cholesterol metabolism, P2Y₁₃-R has also been implicated in other physiological processes, including neuronal differentiation [10], insulin secretion [11], mast cell degranulation [12], ATP release by red blood cells [13] or bone homeostasis [14]. However, so far, the molecular mechanisms that regulate trafficking and cell surface expression of P2Y₁₃-R have not been investigated yet.

In this study, we investigated for the first time the regulation of cell surface expression of P2Y₁₃-R. To our surprise, we found that P2Y₁₃-R exhibited poor general protein expression as well as poor cell surface expression in different cell types when compared to P2Y₁₂-R. Interestingly, we demonstrated that P2Y₁₃-R was subjected to a constitutive ubiquitination in the endoplasmic reticulum (ER), thus promoting proteasome-mediated receptor degradation, and thereby preventing its expression at the plasma membrane. Finally, we also demonstrated that proteasomal inhibition, which drastically increased cell surface expression of P2Y₁₃-R in HepG2 cells, greatly potentiated P2Y₁₃-R-mediated hepatic HDL endocytosis *in vivo*, thus giving promising applications for future improvements for HDL therapies.

RESULTS

P2Y₁₃ receptor is poorly expressed and does not exhibit cell surface expression

To investigate cell surface expression of P2Y₁₃-R, we first tagged the receptor with a myc epitope in N-terminus extracellular region (Myc-P2Y₁₃) and transiently expressed the construct in HeLa cells. Surprisingly, Myc-P2Y₁₃ was detected at very low levels and in only few cells (Fig. 1a). Interestingly, when detected, Myc-P2Y₁₃ receptor was rarely found at the plasma membrane and mostly localized in the endoplasmic reticulum (ER) as shown by the colocalization with DsRed2-ER marker (Fig. 1b). By contrast, when overexpressed, Myc-

P2Y₁₂ receptor, another ADP receptor, was strongly detected in almost all the cells and exhibited efficient plasma membrane targeting (Fig. 1a).

We further confirmed these observations by precisely quantifying total expression of each receptor as well as receptor density at the plasma membrane. For that purpose, we fused P2Y₁₃ or P2Y₁₂ receptors either with a Renilla luciferase tag (RLuc8) in their C-terminus region or with a myc epitope in N-terminus extracellular region as mentioned above. After transfection of identical amounts of the different receptor-encoding vectors, luciferase luminescence was measured as an indicator of total receptor expression (Fig. 1c) while cell surface density of myc-tagged receptors was classically determined by ELISA and revealed with an anti-myc antibody on non permeabilized cells (Fig. 1d). In agreement with fluorescence imaging experiments, results showed a huge difference in receptor expression levels between P2Y₁₃ and P2Y₁₂ receptors. Indeed, P2Y₁₃-R was poorly expressed (Fig. 1c), and almost not detected at the plasma membrane (Fig. 1d) compared to P2Y₁₂-R. To rule out any variations in transfection efficiency between vectors encoding P2Y₁₃ and P2Y₁₂ receptors which could in part support receptor expression differences, we quantified cell surface expression of both P2Y₁₂ and P2Y₁₃ receptors following transfection of increasing amounts of each encoding vector (Fig. 1e). While detection of P2Y₁₂-R was increased with increasing amounts of encoding vector until reaching a plateau, P2Y₁₃-R was still undetectable, even after transfection with the highest amount of encoding vector (Fig. 1e). Similar results were obtained when the two P2Y receptors were expressed in other cell lines, including HepG2 cells, indicating that the regulation of P2Y₁₃-R expression did not depend on the cell type (Supplementary Fig. S1).

Altogether, these data demonstrate that P2Y₁₃-R is poorly expressed, and mostly retained in the ER.

P2Y₁₃ receptor expression is regulated through its C-terminal tail

P2Y₁₃-R displays high homology sequence with P2Y₁₂-R, especially in transmembrane domains and alignment between P2Y₁₃-R and P2Y₁₂-R amino acid sequences reveals that both receptors share ~50% identity and ~70% homology. The highest variability is found in the C-terminus cytoplasmic tail, which is known to regulate GPCR trafficking and expression (Fig. 2a). To evaluate the influence of the C-terminus tail of P2Y₁₃-R in cell surface expression of this receptor, we constructed two chimeric receptors consisting of the exchange of the C-terminus tail of P2Y₁₃ and P2Y₁₂ between the two receptors, namely P2Y₁₃₋₁₂ (P2Y₁₃-R core domain containing the C-terminus tail of P2Y₁₂-R) and P2Y₁₂₋₁₃ (P2Y₁₂-R core domain containing the C-terminus tail of P2Y₁₃-R) (Fig. 2b). Wild-type and chimeric receptors were C-terminally fused to GFP or RLuc8 and next transiently expressed in HeLa cells to investigate expression levels of the receptors. Strikingly, the replacement

of the C-terminus tail of P2Y₁₃-R by the one of P2Y₁₂-R strongly increased general expression of P2Y₁₃-R (Fig. 2c-d) and restored its cell surface expression (Fig. 2c), suggesting that the cytoplasmic tail of P2Y₁₃-R was involved in the specific expression defect of this receptor. Conversely, the P2Y₁₂₋₁₃ chimera total expression was significantly reduced compared to P2Y₁₂-R expression (Fig. 2d), thus demonstrating that the C-terminus tail of P2Y₁₃-R could drive the degradation of a part of P2Y₁₂-R. Cell surface expression of myc-tagged receptors was further quantified by ELISA experiments (Fig. 2e) and revealed by using an anti-myc antibody on non permeabilized cells. Again, and in agreement with fluorescence imaging, P2Y₁₃-R expression at the plasma membrane was markedly and significantly increased when its C-terminus tail is replaced by the one of P2Y₁₂-R. However, whereas the replacement of the C-terminus tail of P2Y₁₂-R by the one of P2Y₁₃-R decreased total expression level of P2Y₁₂-R, it did not impact on P2Y₁₂-R cell surface expression (Fig. 2d-e), suggesting that the C-terminal of P2Y₁₃-R was most probably regulating receptor expression in the ER rather than receptor cell surface trafficking *per se*.

Altogether, these data demonstrated that the expression of P2Y₁₃-R is tightly regulated through its C-terminus intra-cytoplasmic tail.

P2Y₁₃ receptor is constitutively ubiquitinated at steady state

The ER constitutes the limiting compartment for GPCR maturation and thus expression. Generally, misfolded transmembrane receptors in the ER then become ubiquitinated to finally undergo proteasomal degradation [15]. Given the propensity of P2Y₁₃-R to naturally limit its expression in the ER, we thus hypothesized that expression of P2Y₁₃-R might be regulated through ubiquitination of its C-terminus tail. To test this hypothesis, we monitored the real-time ubiquitination of the P2Y₁₃-R and P2Y₁₂-R in living cells using BRET² (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)-based ubiquitination probes as previously described [16]. This assay is based on the nonradiative transfer of energy between a luminescent energy donor (here, Renilla luciferase, RLuc8) fused to the protein of interest and a fluorescent energy acceptor (here, green fluorescent protein, GFP²) fused to the N-terminus of ubiquitin (GFP²-Ub) and has been previously successfully used to study the dynamic ubiquitination of signaling proteins [16]. Therefore, to monitor P2Y₁₃-R and P2Y₁₂-R ubiquitination, wild-type and chimeric P2Y₁₃ and P2Y₁₂ receptors were fused to their C-terminal to RLuc8 and receptor ubiquitination was measured using the GFP²-Ub fusion protein (Fig. 3a). We first performed saturation BRET curves [17] in HEK293T cells by co-expressing a constant level of P2Y₁₃-RLuc8 or P2Y₁₂-RLuc8 encoding vector with increasing concentrations of GFP²-Ub. As shown in Figure 3b, a basal BRET² signal could

be detected between P2Y₁₃-R and ubiquitin which increased hyperbolically as a function of the GFP²-Ub expression level and saturated at high GFP²-Ub concentration, thus demonstrating the specificity of the BRET signal, and consequently that P2Y₁₃-R undergoes constitutive ubiquitination (Fig. 3b). By contrast, a very weak BRET² signal was detected when experiments were performed with P2Y₁₃-RLuc8 receptor and soluble GFP² as a negative control. This BRET signal is independent of the GFP² expression level leading to linear saturation BRET curves, most likely reflecting bystander BRET (random collision) (Fig. 3b). Similar results were obtained when measuring ubiquitination of P2Y₁₂-R, indicating that P2Y₁₂-R also undergoes basal ubiquitination (Fig. 3c). However, it is noteworthy that the basal BRET ratio between P2Y₁₂-R-RLuc8 and GFP²-Ub was much lower to that of measured in the presence of P2Y₁₃-R which could be indicative of less P2Y₁₂-R basal ubiquitination.

Interestingly, when BRET was measured between P2Y₁₃₋₁₂ chimeric receptor and GFP²-Ub, the signal was significantly decreased when compared to wild-type P2Y₁₃-R. Conversely, when considering P2Y₁₂₋₁₃ receptor, the ubiquitination was significantly increased compared to wild-type P2Y₁₂ (fig. 3d). The differences in the BRET signals detected between GFP²-Ub and the different P2Y receptors could not rely on variations in receptor expression since all BRET² experiments were performed using similar luminescence levels indicative of receptor expression (Fig. 3d, see inset).

Altogether, these results indicated that P2Y₁₃-R and most likely its C-terminus tail was highly ubiquitinated at steady state when compared to P2Y₁₂-R. Moreover, the data showed an inverse correlation between cell surface expression and ubiquitination level of P2Y₁₃-R, suggesting a close link between ubiquitination of P2Y₁₃-R and its efficient targeting to the plasma membrane.

P2Y₁₃ receptor is ubiquitinated in the endoplasmic reticulum

BRET signals measuring ubiquitination of P2Y receptors were conducted on intact cells and thus cannot provide direct information on the subcellular localization of the detected interactions. Therefore, we performed BRET measurements after cell fractionation using sucrose step gradient to determine the precise location of the P2Y₁₃-R ubiquitination. After cell membrane solubilization and fractionation, luciferase intensity (Fig 4a) and BRET² assay (Fig 4b) were assessed on each fraction to detect P2Y₁₃-R expression and ubiquitination respectively. The gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor R1 (GABA B-R1), another GPCR which is retained in the ER [18], was used as an index of ER membrane enrichment while P2Y₁₂-R represents an

indicator of the plasma membrane (PM)-enriched fractions. As expected, P2Y₁₂-R was mainly found in fractions 4 to 6 whereas GABA B-R1 was mainly detected in fractions 7 to 10, thus delineating the distribution of PM- and ER-enriched fractions respectively (Fig 4a). Despite low expression, P2Y₁₃-R could be detected in both PM and ER-enriched fractions (Fig 4a). Interestingly, when we measured BRET between P2Y₁₃-RLuc8 and GFP²-Ub on sucrose fractions, we observed that BRET² signal was mostly detected in ER-enriched fractions – and not in PM-enriched fractions – (Fig 4b), demonstrating that ubiquitination of P2Y₁₃-R occurred mainly in the ER.

Proteasome inhibition induces expression of P2Y₁₃ receptor at the cell surface of human hepatocytes

Since proteasomal proteolysis is closely linked to the ubiquitination of the target molecules for degradation, we analyzed whether P2Y₁₃-R was degraded through proteasome by using specific inhibitors. After proteasomal inhibition with MG-132, a strong expression of P2Y₁₃-GFP was observed in almost all the cells (Fig. 5a). By contrast, when we inhibited the lysosomal degradative pathway with leupeptin, an inhibitor of lysosomal enzymes, P2Y₁₃-GFP expression was not modified, and the receptor was still poorly detected (Fig. 5a), as in non treated cells (Fig. 1a). Consistent with these observations, western blot analysis showed that P2Y₁₃-GFP was not detected after overexpression in HeLa cells, much like after leupeptin treatment. Conversely, inhibition of proteasome induced a strong expression of P2Y₁₃-GFP (Fig. 5b).

Altogether, these data showed that P2Y₁₃-R was degraded through the proteasome pathway.

We then investigated the effects of proteasomal inhibition on cell surface expression of P2Y₁₃-R in human hepatocytes, using HepG2 cells. When expressed in HepG2 cells, much like in HeLa cells, P2Y₁₃-R was still poorly expressed and mostly detected in the ER as shown by the colocalization with the DsRed2-ER marker (Supplementary Fig S1). In agreement with our results obtained on HeLa cells (Fig. 5a-b), proteasome inhibition with two different specific inhibitors – MG-132 or bortezomib – led to an increase in P2Y₁₃-R expression compared to non treated cells as demonstrated by both fluorescence (Fig. 5c) and western blot (Fig. 5d) experiments. Interestingly, proteasome inhibition induced a striking accumulation of the receptor at the cell surface (Fig. 5c). Expression of P2Y₁₃-R at the plasma membrane was further quantified by ELISA assay after expression of N-terminally myc-tagged receptor. Both MG-132 and bortezomib treatment induced a significant increase of cell surface expression of P2Y₁₃-R (Fig. 5e). Thus, proteasome inhibition on human hepatocytes promotes plasma membrane expression of P2Y₁₃-R.

Proteasome inhibition promotes P2Y₁₃-mediated hepatic HDL uptake

Since proteasome inhibition induced a strong expression of P2Y₁₃-R at the cell surface of hepatocytes (Fig. 5c,e), we first examined HDL uptake in HepG2 cells by using fluorescent HDL₃ after MG-132 treatment. Endocytosis of fluorescent AlexaFluor[®]568-HDL₃ particles showed a weak pattern in non-treated hepatocytes. In contrast, when cells were treated with proteasome inhibitor MG-132, the staining was strikingly increased, suggesting that promoting P2Y₁₃-R at the cell surface greatly enhanced HDL endocytosis in hepatocytes (Fig. 6a-b).

Therefore, we investigated the hepatic HDL uptake *in vivo* after bortezomib injection in both wild-type mice and P2Y₁₃-R-deficient mice. Hepatic uptake of radiolabeled ¹²⁵I-HDL₃ in wild-type mice was dramatically increased after bortezomib treatment (+ 233% ± 29%). Remarkably, proteasome inhibition no longer stimulated HDL uptake in liver from P2Y₁₃-R-deficient mice (Fig. 6c), demonstrating that bortezomib-induced hepatic HDL uptake was specifically mediated by P2Y₁₃-R.

Altogether, these data suggested that proteasomal inhibition promoted plasma membrane expression of functionally active P2Y₁₃-R, and consequently greatly potentiated P2Y₁₃-mediated HDL endocytosis by the liver.

DISCUSSION

Regulation of P2Y₁₃-R cell surface expression is a key step in modulating hepatic HDL uptake but the underlying mechanisms remained unknown. In this study, we investigated for the first time the regulation of P2Y₁₃-R expression and provided evidence that P2Y₁₃-R is tightly regulated by constitutive ubiquitination in the ER, and subsequent proteasome degradation. We also unraveled the role of the C-terminus tail in P2Y₁₃-R ubiquitination and plasma membrane expression, since the exchange of the intra-cytoplasmic tail of P2Y₁₃-R with the one of P2Y₁₂-R led to a concomitant decrease of receptor ubiquitination and an increase of cell surface expression of P2Y₁₃-R.

In our previous work, we showed that stimulating P2Y₁₃-R activation by using a P2Y₁₃-R agonist – namely Cangrelor – stimulated HDL uptake (>34,9%) [6]. We showed here that proteasome inhibition induced a much more potent up-regulation of HDL endocytosis (>233%) suggesting that probably, increasing P2Y₁₃-R expression at the cell surface – rather than stimulating P2Y₁₃-R activation – might be a better way to increase HDL endocytosis. With this in mind, we hypothesized that in normal conditions P2Y₁₃-R is weakly expressed at the cell surface of hepatocytes, and is responsible for basal hepatic HDL uptake. By contrast, under certain

conditions – which are still unknown but that could include fasting, cholesterol depletion... – P2Y₁₃-R expression might be rapidly and strongly increased at the cell surface to achieve HDL uptake in the liver. Such a tight regulation of P2Y₁₃-R expression could be mediated by inhibiting the degradation process through activation/expression of specific deubiquitinating enzymes that would rescue the receptor from proteasome degradation. Alternatively, it is also possible that E3 ubiquitin ligases responsible for receptor ubiquitination were down-regulated. Interestingly, the expression/activation of deubiquitinating enzymes as well as E3 ubiquitin ligases should be fine-tuned and an increasing number of reports showed that those enzymes could be spatially and temporally regulated during certain conditions including embryogenesis, pathogenesis... [19, 20].

It is now established that basal ubiquitination and deubiquitination are important for controlling cell surface expression and cellular responsiveness of various GPCR [21]. While ligand-induced ubiquitination usually serves as a sorting signal to target receptor to lysosomal degradation, non-ligand-mediated ubiquitination can relay distinct functions, including regulation of trafficking and receptor density at the cell surface.

Constitutive ubiquitination of GPCR can occur at the plasma membrane to regulate cell surface level of receptors. In *Drosophila*, ubiquitination of the GPCR-related seven transmembrane protein Smo – a signal transducer in Hedgehog signaling – plays a key role in the downregulation of Smo in the absence of the ligand. In the presence of ligand Hedgehog, the deubiquitinating enzyme UBPY/USP8 prevents Smo ubiquitination, thereby promoting Smo accumulation at the cell surface [22, 23]. Similarly, under basal conditions, the chemokine receptor CXCR7 is constitutively ubiquitinated at the cell surface and activation of CXCR7 by CXCL12 induced a rapid receptor deubiquitination. Importantly, a CXCR7 mutant in which all lysine residues in the C-terminus tail had been replaced by alanines is not detected anymore at the cell surface, demonstrating that ubiquitination is a key modification responsible for the correct trafficking of CXCR7 from and to the plasma membrane [24].

However, the ubiquitination status of GPCR can also directly be modulated in the ER, thereby affecting the density of functional receptors at the cell surface and cellular responsiveness. Accordingly, we demonstrated here that the ubiquitination status of P2Y₁₃-R in the ER is inversely correlated with cell surface expression. Much like P2Y₁₃-R, the adenosine receptor A2A is also subjected to ubiquitination in the ER, promoting subsequent proteasome degradation of functional newly synthesized receptors. Interestingly, the deubiquitinating enzyme USP4 has been shown to deubiquitinate the adenosine receptor A2A during biogenesis, resulting in an increased cell surface expression of functionally active A2A receptor [25]. Hence, proteasome-mediated degradation does not seem to be only restricted to misfolded proteins and it is tempting to speculate that some

properly folded P2Y₁₃-R are targeted for proteasome degradation at steady state and released to the cell surface by deubiquitination. Proteasome inhibition might overcome the degradation machinery, leading to the escape of some functional P2Y₁₃-R towards the plasma membrane. This would be in agreement with our results showing that proteasomal inhibition drastically potentiated hepatic HDL uptake in wild-type mice but not in P2Y₁₃ knock-out mice.

Interestingly, ubiquitin proteasome system has been already described in cholesterol metabolism. Indeed, proteasome inhibition strongly increases protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCA1/ABCG1 [26], that both play essential roles in cholesterol efflux from macrophages [27]. Likewise, gp78, another E3 ubiquitin ligase, is involved in the sterol-induced degradation of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase in the ER [28, 29]. The HMG CoA reductase catalyzes the rate limiting reaction of cholesterol synthesis and is inhibited by the statins that are widely used in cholesterol-lowering therapies to reduce the incidence of coronary artery diseases. In this case, gp78-mediated ubiquitination marks the reductase for proteasome degradation when cellular sterol levels rise. Thus the ubiquitin-proteasome system seems to regulate central pathways for regulation of cholesterol metabolism and thus might constitute a new attractive target to control dyslipidaemia.

In addition, Idol (inductible degrader of the LDL receptor), an E3 ubiquitin ligase, ubiquitinates the precursor of LDL receptor (LDLR), thereby targeting it for degradation. Consequently, Idol knockdown in hepatocytes increases LDLR protein levels and promotes LDL uptake [30]. Hence, given the importance of both HDL- and LDL-cholesterol metabolism in cardiovascular disease risk, a better understanding of those ubiquitin-regulated pathways could lead to new therapeutic opportunities.

In addition to ubiquitination, many additional/complementary mechanisms could limit surface expression of P2Y₁₃ receptor as already described for many other GPCR. In particular, some receptors might necessitate the specialized assistance of general or specific chaperone/escort proteins in the ER to fold properly and exit from the ER to navigate towards the Golgi [31]. Glycosylation may also represent an absolute requirement for the cell surface expression of some GPCR. Thus, mutations in the glycosylation sites of AT1a angiotensin II receptor resulted in the retention of mutated receptors in the ER [32]. Finally, homo- or heterodimerization is now well described to participate to the proper export of some GPCR to the plasma membrane and might represent a prerequisite to pass quality-control checkpoints along the biosynthetic pathway. Interestingly, olfactory receptors, which are notoriously difficult to express on their own reached the plasma membrane upon heterodimerization with the β 2-adrenoceptor [33].

We previously studied pharmacological activation of the P2Y₁₃-R by its partial agonist, the Cangrelor. Noteworthy, we demonstrated that Cangrelor administration in mice could promote hepatic HDL endocytosis and biliary lipid excretion and might thus represent a new therapeutic approach to improve hepatobiliary RCT [6, 8]. However, the lack of oral bioavailability of Cangrelor and its very short half-life, as well as its antagonistic action on P2Y₁₂-R, preclude its clinical use. It will therefore be a tremendous challenge to develop an uncharged agonist of P2Y₁₃-R suitable for oral administration. An alternative and attractive way to stimulate P2Y₁₃-R pathway for HDL endocytosis would be to increase the expression of functional P2Y₁₃-R by selectively targeting the ubiquitin-proteasome system that recognizes the receptor as a substrate and thus rescuing P2Y₁₃-R from its proteasome degradation. In this context, identification of E3 ligase or deubiquitinating enzymes specific for the regulation of P2Y₁₃-R ubiquitination in the ER might provide the basis for a novel therapeutic strategy to enhance hepatobiliary RCT and ultimately prevent or treat atherosclerosis.

MATERIALS AND METHODS

Constructs and Reagents. P2Y₁₃ (NCBI Reference Sequence: NM_176894), P2Y₁₂ (NCBI Reference Sequence: NM_022788) and chimerical receptors chimera were amplified by PCR and subcloned into pEGFP-N1, pRLuc8-N1 or fused myc epitope. P2Y₁₂ cDNA was a generous gift from C. Gachet (UMR-S949 INSERM, Strasbourg, France) and Ub-GFP² construct was a generous gift from M. Bouvier (University of Montréal, Montréal, Canada). MG-132 was purchased from Sigma (St. Louis, MO) and bortezomib from Sequoia Research Products (Berkshire, UK).

Cell culture and transfection. HeLa cells (human cervix adenocarcinoma), HepG2 cells (human liver hepatocellular carcinoma) and HEK293T cells (human embryonic kidney) were maintained in DMEM Glutamax (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life technologies) and 100µg/mL penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. HepG2 cells were grown on collagen I coated dishes. Transient transfections were performed using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Applied Science) for HeLa and HepG2 cells and using polyethylenimine (PEI, Polysciences Inc.) for HEK293T cells.

Quantification of cell surface receptors by ELISA. Cells were split into 24-well plates and transiently transfected with pcDNA3.1 (+) (control) or vectors encoding N-terminally myc-tagged receptors. Twenty-four hours post-transfection, cells were treated or not with proteasome inhibitors as indicated for 16h at 37°C. Then cells were fixed in 4% paraformaldehyde, saturated with PBS containing 1% bovine serum albumin and incubated with the primary anti-myc antibody (Clone 9E10, Santa Cruz Biotechnology) and then with HRP-labeled secondary antibody (Sigma). After washing, cells were incubated with HRP substrate: TMB (3,3',4,5'-tetramethylbenzidine). The reaction was stopped with HCl 1N, and the plates were read at 450nm in a microplate reader (Varioscan Flash, Thermo electron corporation). The 570nm optic density (background) was subtracted.

Microscopy. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.05% saponin when necessary, saturated with PBS containing 10% fetal bovine serum and incubated with the primary antibody and then with Cy3-labeled secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Pictures were captured using a Zeiss LSM 710 META confocal microscope equipped with a 63x Plan-Apochromat objective.

Western blot. For protein analysis, cell lysates (50 µg) were subjected to SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions, transferred onto PVDF membranes (Millipore) analyzed by immunoblotting according to standard protocols using indicated antibodies. We used a mouse monoclonal antibody against Myc (clone 9E10) from BD Biosciences, and a mouse monoclonal antibody against GAPDH from Santa Cruz Biotechnology. HRP-labeled secondary antibodies were from Sigma (St. Louis, MO).

Cell Fractionation. Cell fractionation was performed as previously described [34]. Briefly, cells were washed with cold PBS, scraped off, and lysed with cold hypotonic lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.4; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 6 mM magnesium chloride) containing protease inhibitors. After homogenization using a tight-fitting dounce and removal of cellular debris and unlysed cells by centrifugation, the supernatant was adjusted to a final concentration of 0.2 M sucrose. A discontinuous sucrose step gradient was made using lysis buffer. Cell lysate was applied to the top of discontinuous sucrose step gradient (0.5, 0.9, 1.2, 1.35, 1.5, and 2 M) and centrifuged for 16 h at 130,000 x g. Fractions were then subjected to fluorescence/ luminescence analysis and to BRET measurements.

Bioluminescence resonance energy transfer measurement. Constructs encoding RLuc8-fused receptors and GFP²-tagged ubiquitin were transiently cotransfected into HEK293T cells as indicated in the figure legends. Forty-eight hours after transfection, cells were washed with PBS and resuspended in PBS containing 0.1% (w/v) glucose at room temperature. Cells were then distributed (80 µg of proteins per well) in a 96-well microplate (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences). BRET² between RLuc8 and GFP² was measured after the addition of the RLuc8 substrate coelenterazine 400a (5 µM, Interchim). BRET² readings were collected using a modified Infinite F500 (Tecan Group Ltd). The BRET signal was calculated by the ratio of emission of GFP² (510–540 nm) to RLuc8 (BRET², 370–450 nm).

Fluorescent HDL endocytosis. HDL were fluorescently labeled with Alexa Fluor® 568 dye according the instructions of manufacturer (Life technologies). Then, 100 µg/mL Alexa Fluor® 568-HDL particles were endocytosed for 15 min at 37°C in HepG2 cells. Cells were washed 3-times in serum-free DMEM, and then dissociation of extracellular membrane-bound HDL was performed at 4 °C in serum-free DMEM for 90 min. Following washes, cells were fixed using 4% paraformaldehyde and examined using an Olympus IX81 microscope. Quantification was done using Image J software.

Perfused mouse liver experiments. C57BL/6 wild-type mice and P2Y₁₃-R^{-/-} littermates were used in this study, as previously described [6]. Mice were caged in animal rooms with alternating 12 h periods of light (07:00 am - 7:00 pm) and dark (7:00 pm - 07:00 am) and fed *ad libitum* with a normal mouse chow diet (# R04-10, SAFE, France). All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Animals of the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license. For experiment, mice (10-12 weeks old) were treated twice at a five day interval with 0,5mg/kg of bortezomib or the vehicle (PBS) by subcutaneous injection. Five days after the second injection, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. The liver was perfused *in situ* for 10 min at 37°C with PBS (Invitrogen) containing 50µg proteins/mL of ¹²⁵I-HDL3 (specific radioactivities ranged from 1000-1500 cpm/ng of proteins). Livers were extensively washed at 4°C in PBS and radioactivity associated with the liver was counted (n ≥ 6 per group).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nabila Mansouri for technical assistance. We also thank Sophie Allart and Astrid Canivet for technical assistance at the cellular imaging facility (INSERM UMR 1043, Toulouse), the technical service of the animal facility (Genotoul Anexplor Platform) and the DNA sequencing platform (Plateau de génomique GeT-Purpan de la plateforme Génome et Transcriptome de la génopole de Toulouse). This study was supported by the INSERM Avenir Grant, the National Research Agency (ANR Emergence and GENO #102 01) and the Midi-Pyrénées Region. Véronique Pons was supported by the Fondation pour La Recherche Médicale (FRM) and INSERM.

AUTHOR CONTRIBUTION

Conceived and designed the experiments: VP, ML, CG, LOM. Performed the experiments: VP, NZ, SG, CM, MN, NM. Analyzed the data: VP, NZ, ML, CG, LOM. Contributed reagents/materials/analysis tools: SG, MN, NM. Wrote the paper: VP, CG, LOM.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Yvan-Charvet L, Matsuura F, Wang N, et al. (2007) Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:1132–8.
2. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (New York, NY)* 271:518–20.
3. Martinez LO, Jacquet S, Esteve J, et al. (2003) Ectopic b₃-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421:75–79.
4. Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, et al. (2005) The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 62:2508–15.
5. Malaval C, Laffargue M, Barbaras R, et al. (2009) RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y₁₃ ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cellular signalling* 21:120–7.
6. Fabre AC, Malaval C, Ben Addi A, et al. (2010) P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology (Baltimore, Md)* 52:1477–83.
7. Blom D, Yamin T-T, Champy M-F, et al. (2010) Altered lipoprotein metabolism in P2Y₁₃ knockout mice. *Biochimica et biophysica acta* 1801:1349–60.
8. Serhan N, Cabou C, Verdier C, et al. (2013) Chronic pharmacological activation of P2Y₁₃ receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochimica et biophysica acta* 1831:719–25.

9. Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, et al. (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of biological chemistry* 276:41479–85.
10. Yano S, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S (2012) Involvement of P2Y13 receptor in suppression of neuronal differentiation. *Neuroscience letters* 518:5–9.
11. Amisten S, Meidute-Abaraviciene S, Tan C, et al. (2010) ADP mediates inhibition of insulin secretion by activation of P2Y13 receptors in mice. *Diabetologia* 53:1927–34.
12. Gao Z-G, Ding Y, Jacobson K a (2010) P2Y(13) receptor is responsible for ADP-mediated degranulation in RBL-2H3 rat mast cells. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 62:500–5.
13. Wang L, Olivecrona G, Götberg M, et al. (2005) ADP acting on P2Y13 receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells. *Circulation research* 96:189–96.
14. Wang N, Robaye B, Agrawal A (2012) Reduced Bone Turnover in Mice Lacking the P2Y13 Receptor of ADP. *Molecular Endocrinology* 26:142–52.
15. Vembar S, Brodsky J (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:944–957.
16. Perroy J, Pontier S, Charest PG, et al. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nature Methods* 1:203–208.
17. Mercier J-F, Salahpour A, Angers S, et al. (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* 277:44925–31.
18. Margeta-mitrovic M, Jan YN, Jan LY, Francisco S (2000) GABA B Receptor Heterodimerization. *Neuron* 27:97–106.
19. Seliger B, Fedorushchenko A, Brenner W, et al. (2007) Ubiquitin COOH-terminal hydrolase 1: a biomarker of renal cell carcinoma associated with enhanced tumor cell proliferation and migration. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:27–37.
20. Li D, Zhang J, Huang W, et al. (2013) Up-regulation of Smurf1 after spinal cord injury in adult rats. *Journal of molecular histology* 44:381–90.
21. Dores MR, Trejo J (2012) Ubiquitination of G protein-coupled receptors: functional implications and drug discovery. *Molecular pharmacology* 82:563–70.
22. Xia R, Jia H, Fan J, et al. (2012) USP8 promotes smoothed signaling by preventing its ubiquitination and changing its subcellular localization. *PLoS biology* 10:e1001238.
23. Li S, Chen Y, Shi Q, et al. (2012) Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothed trafficking and cell surface expression in *Drosophila*. *PLoS biology* 10:e1001239.
24. Canals M, Scholten DJ, De Munnik S, et al. (2012) Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking. *PLoS one* 7:e34192.
25. Milojevic T, Reiterer V, Stefan E, et al. (2006) The Ubiquitin-Specific Protease Usp4 Regulates the Cell Surface Level of the A 2a Receptor. *Molecular pharmacology* 69:1083–1094.
26. Ogura M, Ayaori M, Terao Y, et al. (2011) Proteasomal inhibition promotes ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 expression and cholesterol efflux from macrophages in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31:1980–7.

27. Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, Von Eckardstein A (2006) Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochimica et biophysica acta* 1761:655–66.
28. Song B-L, Sever N, DeBose-Boyd R a (2005) Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Molecular cell* 19:829–40.
29. Jo Y, Lee PCW, Sguigna P V, DeBose-Boyd R a (2011) Sterol-induced degradation of HMG CoA reductase depends on interplay of two Insigs and two ubiquitin ligases, gp78 and Trc8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:20503–8.
30. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P (2009) LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science (New York, NY)* 325:100–4.
31. Achour L, Labbé-Jullié C, Scott MGH, Marullo S (2008) An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends in pharmacological sciences* 29:528–35.
32. Deslauriers B, Ponce C, Lombard C, et al. (1999) the plasma membrane. *Biochem J* 339:397–405.
33. Hague C, Uberti M a, Chen Z, et al. (2004) Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13672–6.
34. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, et al. (2003) Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 17:677–91.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: P2Y₁₃ receptor is poorly expressed and does not exhibit cell surface expression

(a) HeLa cells expressing N-terminally Myc-tagged P2Y₁₃ or P2Y₁₂ were processed for immunofluorescence using an anti-myc antibody. Nuclei were stained with 5µg/mL DAPI. Scale bar indicates 10µm. (b) HeLa cells co-expressing Myc-P2Y₁₃ and the ER marker, DsRed2-ER, were processed for immunofluorescence using an anti-myc antibody. Nuclei were stained with 5µg/mL DAPI. Scale bar indicates 10µm. (c) HEK293T cells were transfected with identical amounts of DNA constructs encoding RLuc8-tagged receptors and luciferase intensity was measured forty-eight hours after transfection. Results are expressed as the mean ± s.e.m of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (***, p<0,001). (d) HeLa cells expressing Myc-tagged P2Y₁₃ or P2Y₁₂ were analyzed by ELISA using an anti-myc antibody to quantify cell surface expression of the different receptors. Results are expressed as the mean of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (***, p<0,001). Standard errors are indicated. (e) HeLa cells were transfected with increasing amounts of vectors encoding N-terminally Myc-tagged P2Y₁₃ or P2Y₁₂ (ranging from 15ng to 500ng/well).

Then cell surface expression of the different receptors was analyzed by ELISA using an anti-myc antibody. Results are expressed as the mean of at least three independent experiments. Standard errors are indicated.

Figure 2: Surface expression of P2Y₁₃ receptor is regulated through its C-terminal tail

(a) Alignment of amino acid sequences of the C-terminus tail of Homo sapiens P2Y₁₂ and P2Y₁₃. (b) Schematic representation of P2Y₁₃, P2Y₁₂ as well as chimerical receptors consisting of the exchange of the C-terminus tail of P2Y₁₃ and P2Y₁₂ receptors. (c) HeLa cells expressing N-terminally Myc-tagged P2Y₁₃, P2Y₁₂ or the two chimeras P2Y₁₃₋₁₂ or P2Y₁₂₋₁₃ were processed for immunofluorescence using an anti-myc antibody. Nuclei were stained with 5µg/mL DAPI. Scale bar indicates 10µm. (d) HEK293T cells were transfected with identical amounts of DNA constructs encoding RLuc8-tagged P2Y₁₃, P2Y₁₂ or the two chimeras P2Y₁₃₋₁₂ or P2Y₁₂₋₁₃ and luciferase intensity was measured forty-eight hours after transfection. Results are expressed as the mean ± s.e.m of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (**, p<0,005; ***, p<0,001). (e) HeLa cells expressing N-terminally Myc-tagged P2Y₁₃, P2Y₁₂ or the two chimeras P2Y₁₃₋₁₂ or P2Y₁₂₋₁₃ were analyzed by ELISA using an anti-myc antibody to quantify cell surface expression of the different receptors. Results are expressed as the mean of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (**, p<0,005). Standard errors are indicated.

Figure 3: P2Y₁₃ receptor is highly ubiquitinated at steady state

(a) Schematic representation of BRET² assay between P2Y₁₃-RLuc8 and GFP²-Ub. Upon degradation of its substrate (DeepBlueC coelenterazine), the RLuc8 fused to the C-terminus of the P2Y₁₃ receptor emits a blue light with an emission peak at 395 nm. If the P2Y₁₃ receptor is ubiquitinated, a nonradiative transfer of energy will occur between RLuc8 and the GFP² fused to the N-terminus of ubiquitin, resulting in re-emission of light with an emission peak at 510 nm. (b-c) HEK293T cells were co-transfected with constant concentrations of P2Y₁₃-RLuc8 (B) or P2Y₁₃-RLuc8 (C) DNA constructs and increasing concentrations of plasmids encoding GFP²-Ub or GFP² alone as control. The curves were fitted using a nonlinear regression equation, assuming a single binding site (GraphPad Prism). (d) BRET² was measured on HEK293T cells co-expressing RLuc8-tagged receptor and GFP²-Ub. Results are expressed as the mean ± s.e.m of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (*, p<0,05; **, p<0,005). In the inset, HEK293T cells were transfected with DNA constructs encoding RLuc8-tagged receptors and luciferase intensity was measured forty-eight hours after transfection. Results are expressed as the mean ± s.e.m of at least three independent experiments.

Figure 4: P2Y₁₃ receptor is ubiquitinated in the endoplasmic reticulum

(a-b) HEK293T cells co-expressing RLuc8-tagged receptor and GFP²-Ub (■) were lysed and applied to the top of a discontinuous sucrose gradient. Fractions were collected and subjected to luminescence analysis (a) and to BRET measurements (b). RLuc8-tagged P2Y₁₂ receptor (●) and RLuc-fused GABA B1 receptor (▲) is used as marker of plasma membrane (PM) and endoplasmic reticulum (ER) respectively. The subcellular distribution patterns of receptors as well as BRET values are representative of at least three independent experiments.

Figure 5: Proteasome inhibition promotes cell surface expression of P2Y₁₃ receptor

(a) HeLa cells expressing P2Y₁₃-GFP were treated for 16 hours with 250µg/mL leupeptin or 10µM MG-132 and then analyzed by fluorescence microscopy. Nuclei were stained with 5µg/mL DAPI. Scale bar indicates 10µm. (b) HeLa cells expressing P2Y₁₃-GFP or not (Ctrl) were treated or not (-) for 16 hours with 250µg/mL leupeptin (leu) or 10µM MG-132 (MG). Cell lysates were analyzed by SDS gel electrophoresis and western blotting using an anti-GFP antibody. (c) HepG2 cells expressing GFP-tagged P2Y₁₃ were treated or not with 2µM MG-132 or 2µM bortezomib for 16 hours and then analyzed by fluorescence microscopy. Nuclei were stained with 5µg/mL DAPI. Scale bar indicates 10µm. (d) HepG2 cells expressing N-terminally Myc-tagged P2Y₁₃ or not (Ctrl) were treated or not (-) with 2µM MG-132 (MG) or 2µM bortezomib (Bort) for 16 hours. Cell lysates were then analyzed by SDS gel electrophoresis and western blotting using an anti-myc antibody. GAPDH was used as equal loading marker. (e) HepG2 cells expressing or not (Ctrl) N-terminally myc-tagged P2Y₁₃ were treated or not (-) with different concentrations of MG-132 or bortezomib for 16 hours. Cell surface expression of P2Y₁₃ receptor was then analyzed by ELISA using an anti-myc antibody. Results are expressed as the mean ± s.e.m of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (*, p<0,05; **, p<0,005).

Figure 6: Proteasome inhibition stimulates P2Y₁₃-mediated HDL hepatic uptake

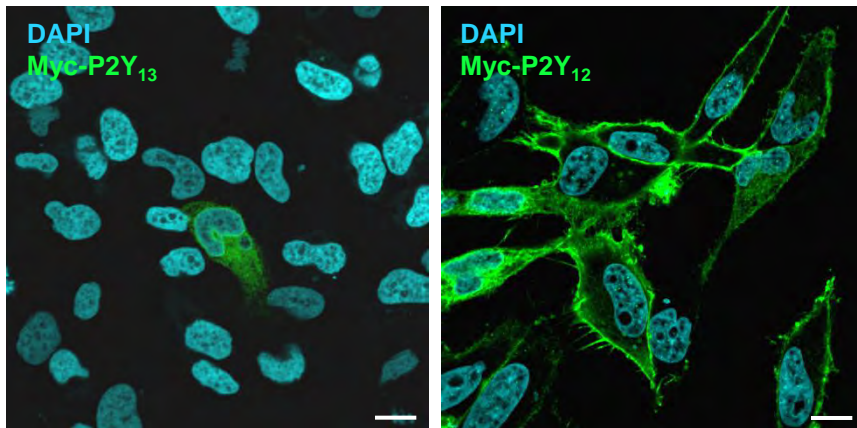
(a) HepG2 cells were treated or not (Ctrl) with 10µM MG-132 for 16 hours, then incubated for 15 minutes at 37°C with 100 µg/mL Alexa Fluor 568®-labeled HDL and then analyzed by fluorescence microscopy. Scale bar indicates 200µm. (b) Endocytosis of Alexa Fluor 568®-labeled HDL described in (A) was quantified. Results are expressed as the mean ± s.e.m of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (***, p<0,001). (c) Wild-type (WT) or P2Y₁₃-R knock-out mice (P2Y₁₃ KO) were administered twice at a five day interval either 0,5 mg/kg per day bortezomib or the vehicle (saline) by subcutaneous injection. Five days after the second injection, hepatic uptake of radiolabeled ¹²⁵I-HDL was measured as described in Materials and

Methods. Values are expressed as the mean \pm s.e.m. n=5-6 mice at least for each group. Data are analyzed by Mann Whitney test (**, $p < 0,005$; ns means no significant).

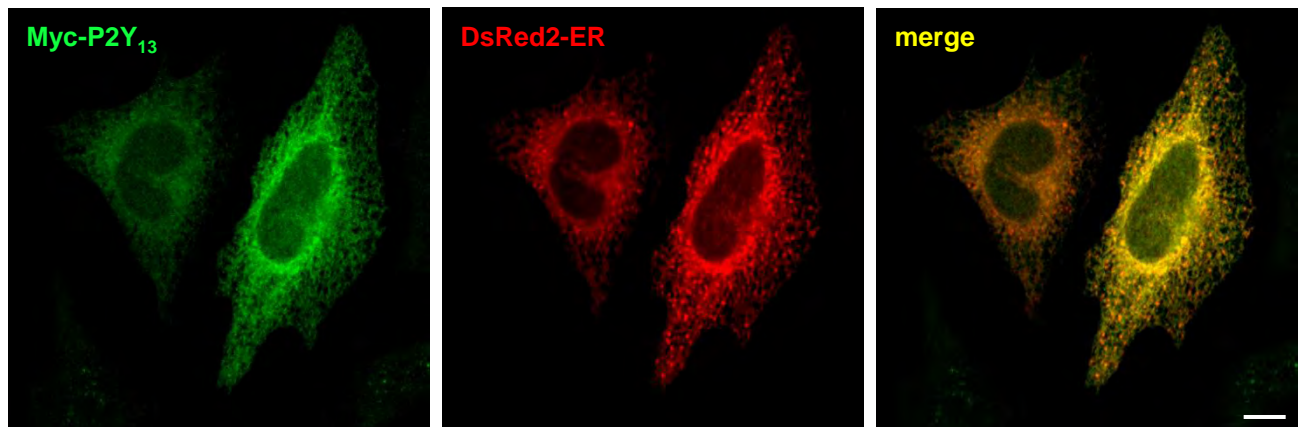
Supplementary Figure S1: P2Y₁₃ receptor is poorly expressed in HepG2 cells

(a) HepG2 cells expressing N-terminally Myc-tagged P2Y₁₃ or P2Y₁₂ were processed for immunofluorescence using an anti-myc antibody. Nuclei were stained with 5 μ g/mL DAPI. Scale bar indicates 10 μ m. (b) HepG2 cells co-expressing Myc-P2Y₁₃ and the ER marker, DsRed2-ER, were processed for immunofluorescence using an anti-myc antibody. Nuclei were stained with 5 μ g/mL DAPI. Scale bar indicates 10 μ m. (c) HepG2 cells expressing Myc-tagged P2Y₁₃ or P2Y₁₂ or not (Ctrl) were analyzed by ELISA using an anti-myc antibody to quantify cell surface expression of the different receptors. Results are expressed as the mean of at least three independent experiments and analyzed by paired t test (***, $p < 0,001$). Standard errors are indicated.

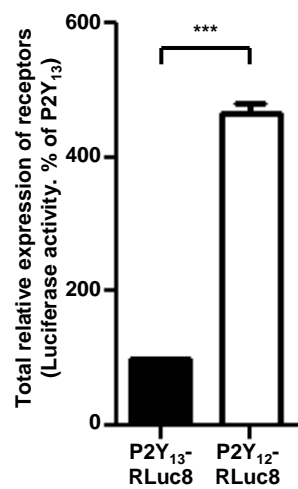
a



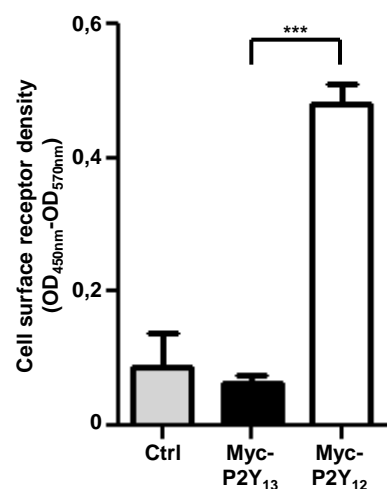
b



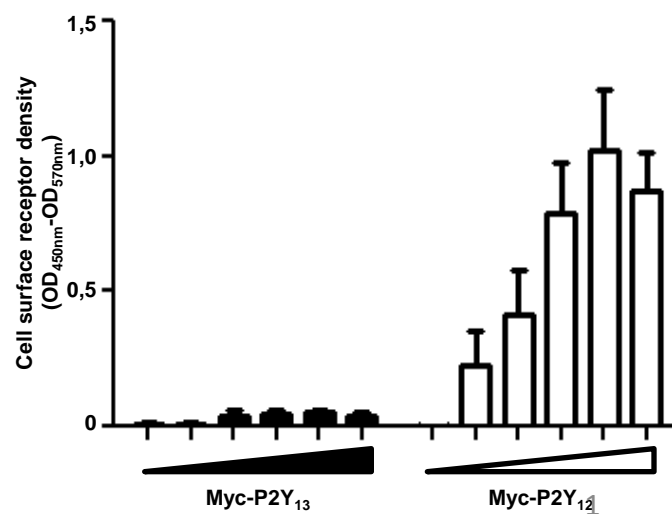
c

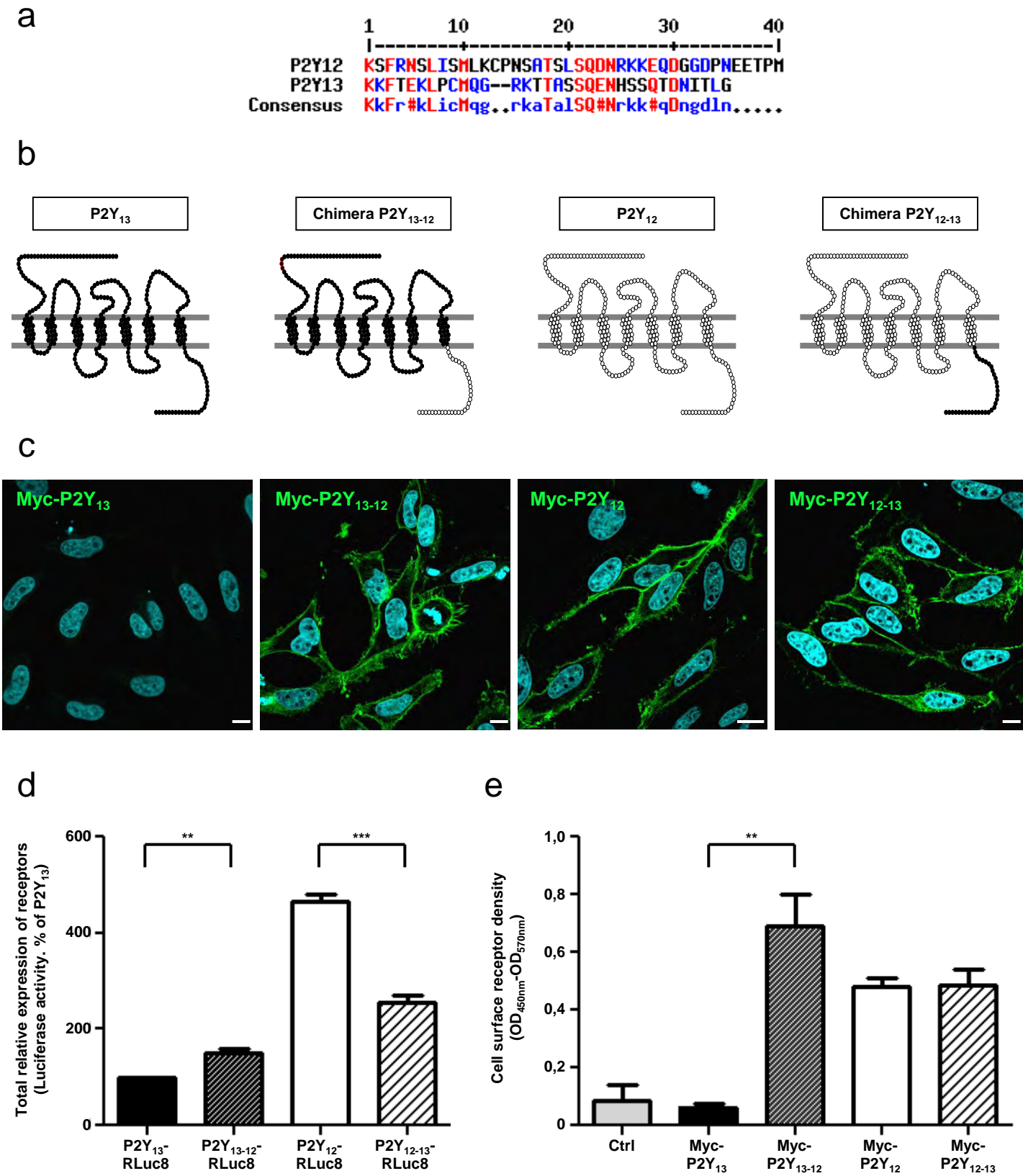


d

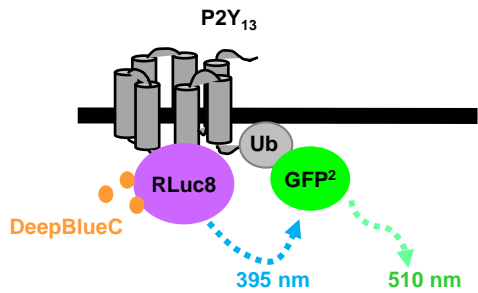


e

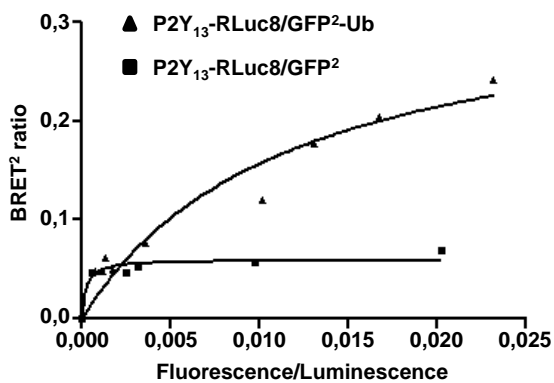




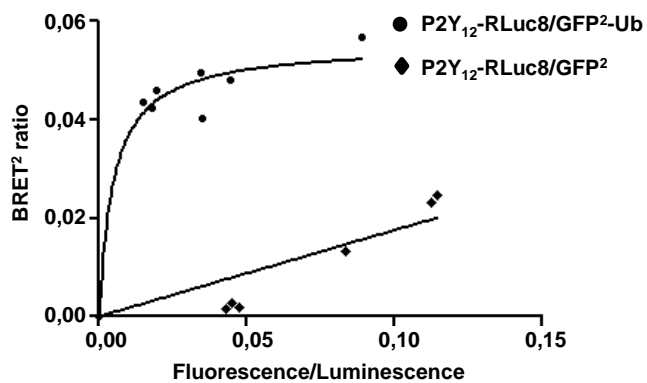
a



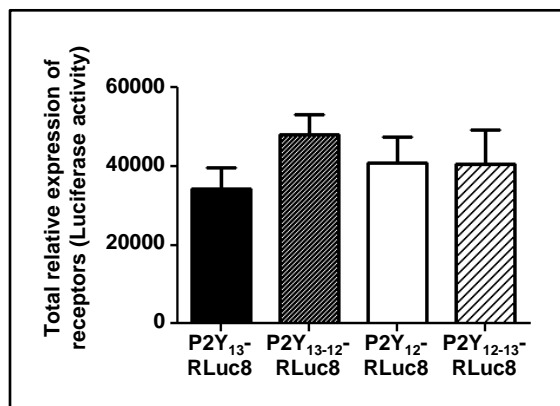
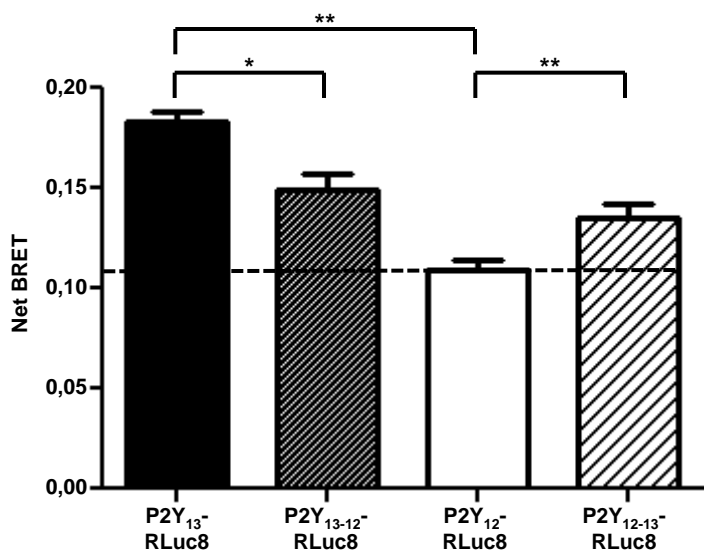
b



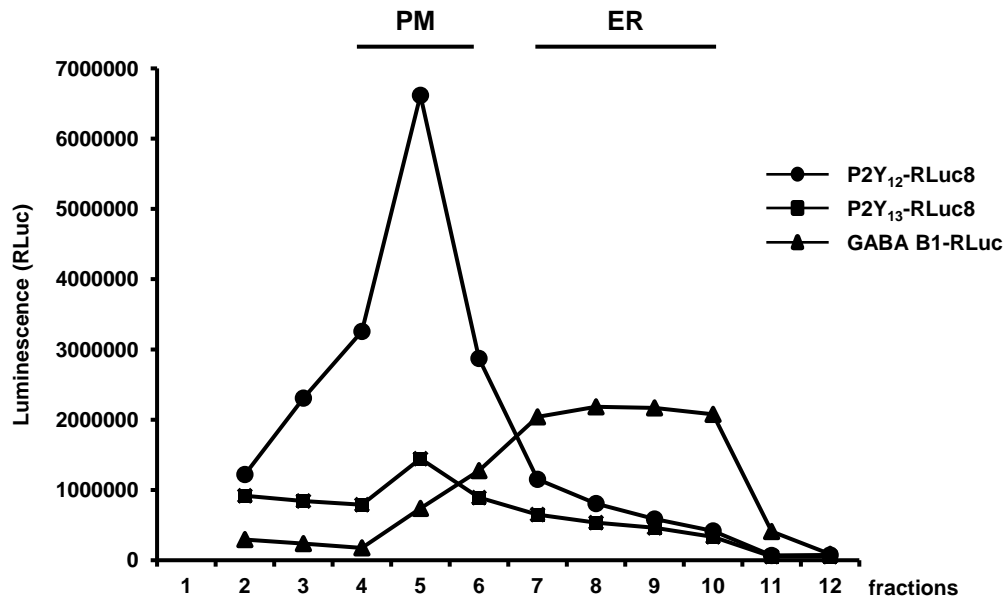
c



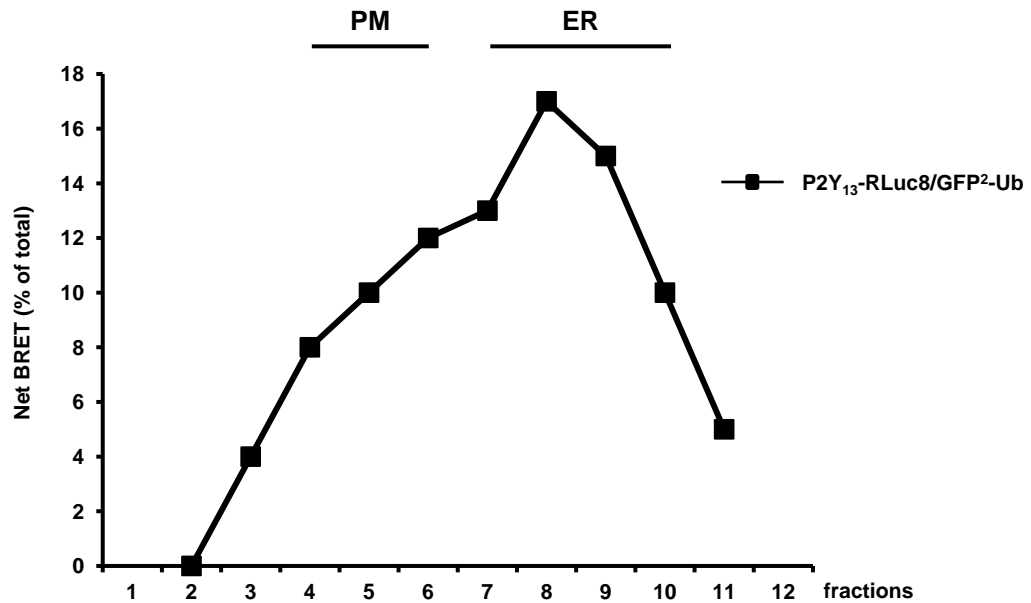
d



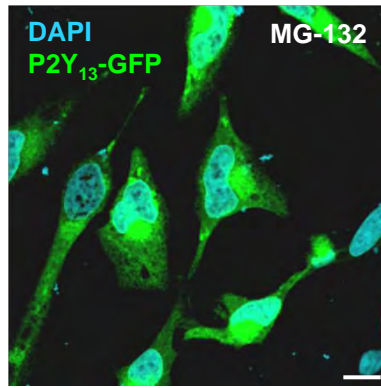
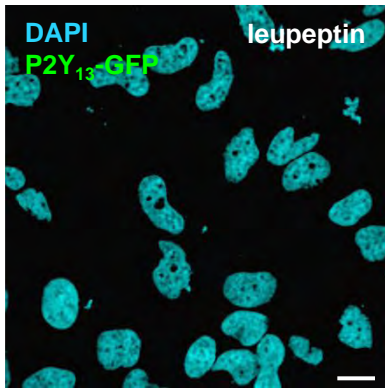
a



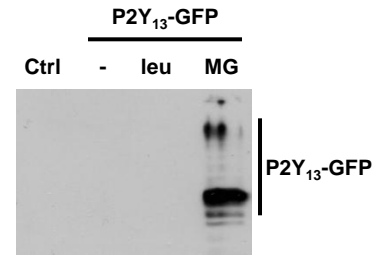
b



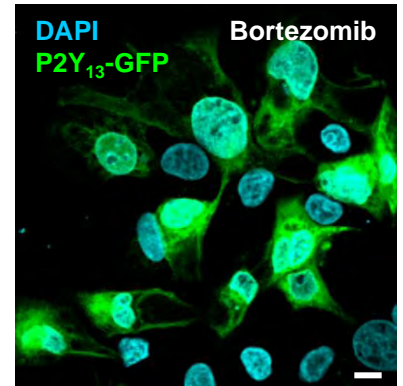
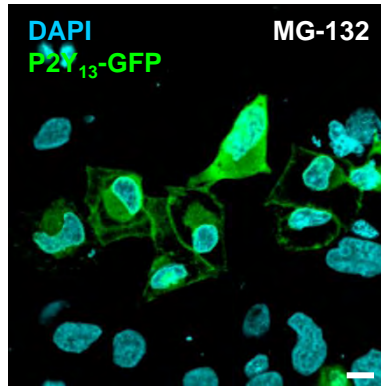
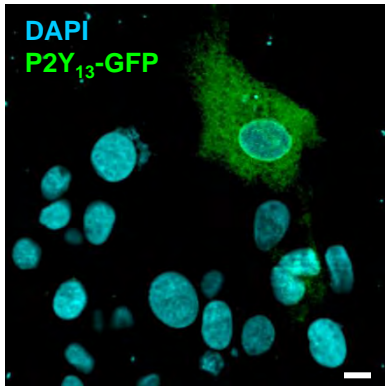
a



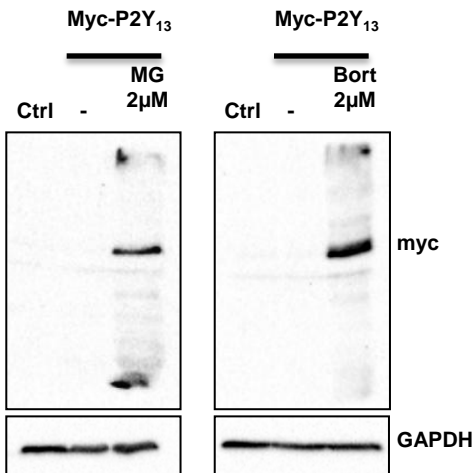
b



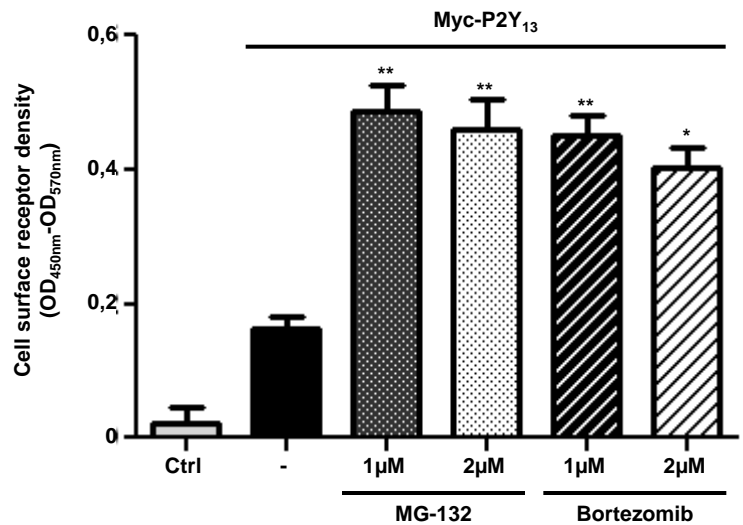
c

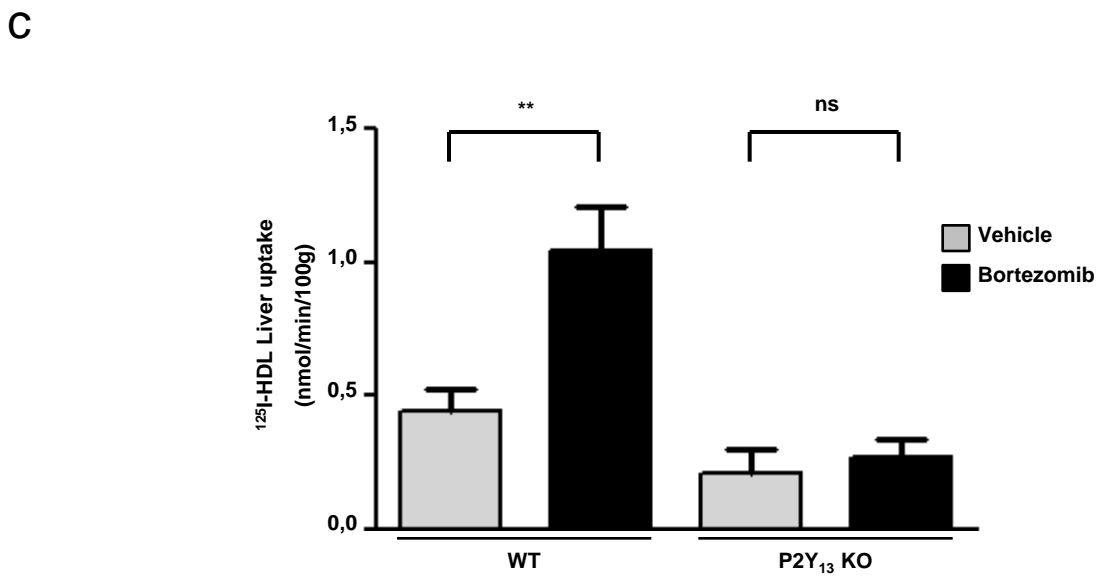
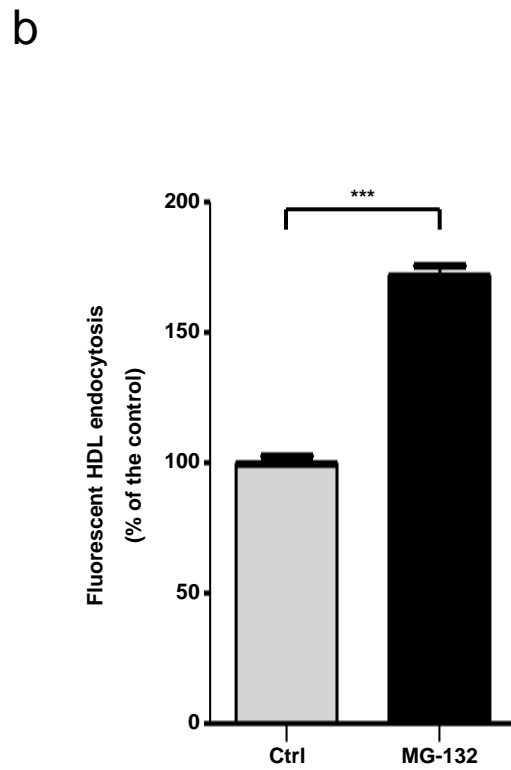
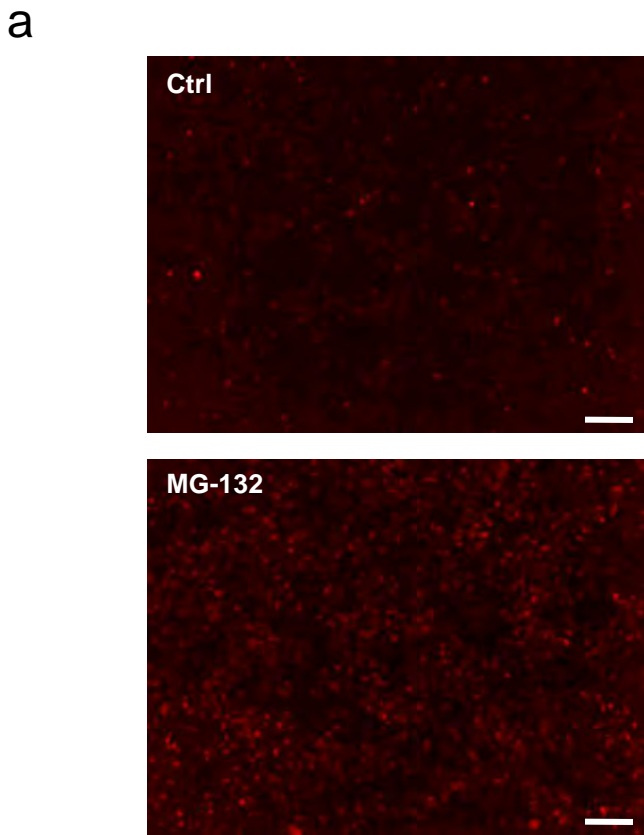


d

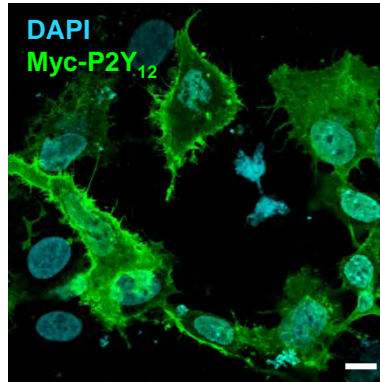
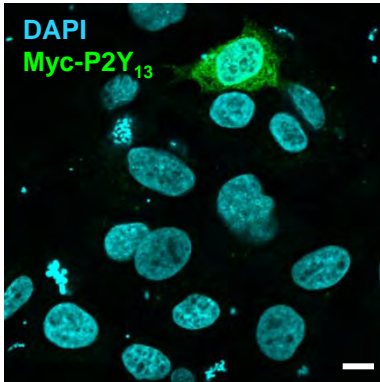


e

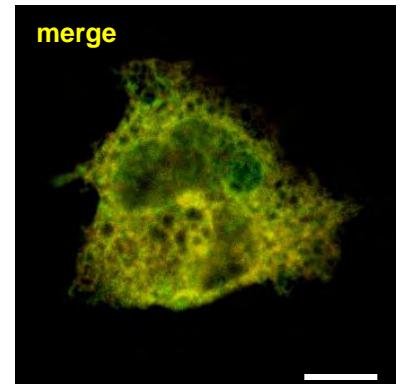
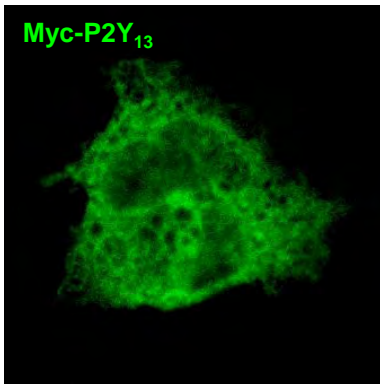




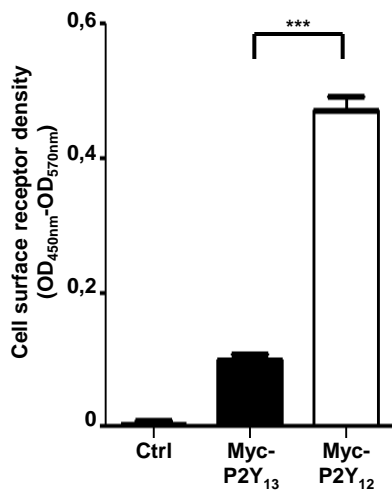
a



b



c



ABSTRACT

Impact of P2Y₁₃ receptor on reverse cholesterol transport and atherosclerosis development

The protective effect of High Density Lipoprotein-Cholesterol (HDL) is mostly attributed to its role in Reverse Cholesterol Transport (RCT), by removing and delivering excess cell cholesterol to the liver for elimination by bile excretion. We have previously identified a new pathway for hepatic HDL uptake, involved in RCT. In this pathway generated ADP by the cell surface ecto-F1-ATPase, which activity is stimulated by apoA-I, activates the P2Y₁₃ ADP receptor and subsequent HDL endocytosis.

In this work, we have demonstrated the physiological implication of P2Y₁₃ in reverse cholesterol transport *in vivo*. Furthermore, a chronic activation of P2Y₁₃ decreases HDL level by increasing hepatic HDL uptake and biliary bile acid secretion. In apoE background our results suggest a protective role of P2Y₁₃ in atherosclerosis development.

Thus, our results suggest that P2Y₁₃ receptor could be a target for therapeutic intervention on HDL, aiming to prevent or reduce the development of atherosclerosis.

Key-words: HDL, reverse cholesterol transport, atherosclerosis, P2Y₁₃

SERHAN Nizar

**Impact du récepteur purinergique P2Y₁₃
sur le transport retour du cholestérol et le développement de l'athérosclérose**

Directeurs de thèse: Dr Laurent MARTINEZ, Dr Cendrine CABOU

Université Toulouse III, LE 31 MAI 2013

L'effet athéroprotecteur des HDLs est principalement attribué à leur rôle dans le Transport Retour du Cholestérol dans lequel le cholestérol excédentaire des tissus périphériques est ramené au foie, où il sera éliminé *via* les voies biliaires. Nos travaux sont focalisés sur l'impact de l'activation ou l'inhibition de la voie F₁-ATPase/P2Y₁₃ sur le Transport Retour de Cholestérol.

Ces travaux mettent en évidence l'implication physiologique de cette voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ dans le RCT *in vivo* chez la souris. De plus, ces travaux démontrent qu'une infusion chronique de cangrelor (un agoniste du P2Y₁₃) diminue les concentrations plasmatique en HDL et stimule les sécrétions d'acides biliaires.

Cette voie pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose.

Mots clés : HDL ; Transport retour du cholestérol ; P2Y₁₃ ; athérosclérose

Discipline : Physiopathologie

Ecole doctorale : Biologie-Santé-Biotechnologie

Unité de recherche : INSERM UMR1048, Institut des maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France