

Université de Montréal

Utilisation d'un modèle de co-culture cellulaire pour l'évaluation *in vitro* du
transport inverse du cholestérol

Par

Roberta-Daila Carling

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
de maîtrise ès sciences en Sciences biomédicales
Option générale

Novembre 2012

© Roberta-Daila Carling, 2012

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Utilisation d'un modèle de co-culture cellulaire pour l'évaluation *in vitro*
du transport inverse du cholestérol

présenté par

Roberta-Daila Carling

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Yahye Mehri, président-rapporteur

Dr Jean-Claude Tardif, directeur de recherche

Dr Éric Rhéaume, co-directeur de recherche

Dr Jean Davignon, examinateur externe

RÉSUMÉ

De nouveaux modèles cellulaires *in vitro* par transfert de milieu et par co-culture ont été mis au point afin d'évaluer la capacité des HDL à éliminer l'excès de cholestérol des tissus périphériques et de le transporter vers le foie afin d'être excrété par le foie, un processus nommé le transport inverse du cholestérol (TIC).

Le système cellulaire par transfert *in vitro* où des macrophages J774 sont gorgés de LDL acétylées et marqués au ³H-cholestérol a été préalablement établi afin de mesurer par scintillation l'efflux de cholestérol marqué vers le milieu de culture contenant des accepteurs de cholestérol. Ce milieu conditionné est transféré sur des cellules HepG2 afin d'étudier l'influx du cholestérol marqué. Ce dernier nous permet d'observer un transport de cholestérol de 25 % hors des J774 et un transport de 39 000 cpm dans les HepG2 en utilisant un milieu contenant 2 % de sérums humains mis en commun. Une stimulation des cellules J774 par l'AMPc augmente l'efflux et l'influx d'environ 45 %.

Des tests de preuve de concept ont été effectués sur le système cellulaire par co-culture qui utilise des chambres de Boyden où les J774 sont localisées au fond d'un puits et les HepG2 dans un insert, et où le milieu est partagé entre les deux types cellulaires. On a déterminé qu'une confluence densité de 60 000 cellules/cm² sur un insert constitué d'une membrane de polyester avec des pores de 3,0 µm, sans autre revêtement, permet d'observer un influx spécifique au sérum d'environ 6 000 cpm associés aux cellules HepG2, où 50 % des comptes radioactifs sont dans les cellules et l'autre moitié présente à la surface cellulaire.

Mots clés : HDL, transport inverse du cholestérol, modèle cellulaire *in vitro*, co-culture, athérosclérose.

ABSTRACT

To assess the ability of HDL particles to remove excess cholesterol from peripheral tissues and to transport it toward the liver for biliary excretion, a process known as reverse cholesterol transport (RCT), new *in vitro* models, one by transfer and the other by co-culture were developed.

An *in vitro* system by transfer with acetylated LDL loaded lipid-laden-foam cells, J774 cells, labeled with ^3H -cholesterol was first established to measure scintillation labelled cholesterol efflux to the culture medium containing cholesterol acceptors. This conditioned medium is transferred to HepG2 cells to study the influx of labeled cholesterol. This allows us to observe a cholesterol transport of 25 % out of J774 cells and an uptake of 39 000 cpm in HepG2 using a medium containing 2 % pooled human serum. Stimulation of J774 cells by cAMP increased cholesterol efflux from J774 and cholesterol influx in HepG2 cells by 45 %.

Set up tests were conducted to develop an *in vitro* co-culture system, using transwells permeable supports, where J774 cells were harvested in wells and HepG2 cells in inserts, and where both share the same medium. It was determined that a cell confluency of 60 000 cells/cm² in an insert having a polyester membrane with pores of 3.0 μm , without coating allows to notice a serum specific influx around 6 000 cpm associated to HepG2, where 50 % of those cpm are in the cell and the other half, present at the HepG2 cell surface.

Key words: HDL, reverse cholesterol transport, *in vitro* cellular models, co-culture, atherosclerosis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiii
DÉDICACE	xx
REMERCIEMENTS	xxi
INTRODUCTION	1
1. Les prédispositions à développer des MCV	1
1.1. Épidémiologie.....	1
1.2. Génétique.....	3
2. Athérosclérose	5
2.1. Hypothèses supportant le développement de l'athérosclérose	6
2.1.1. Cholestérol et TG circulants	6
2.1.1.1. Les hypercholestérolémies.....	7
2.1.2. L'inflammation et le stress oxydatif.....	10
2.2. Apparition et développement de l'athérosclérose.....	11
2.2.1. Dysfonction endothéliale	11
2.2.2. Formation des stries lipidiques	13
2.2.3. La lésion compliquée	17
2.2.4. La plaque instable	18
2.3. Voies d'entrées et stockage du cholestérol chez les macrophages	20
2.3.1. Conséquences du surplus de cholestérol intracellulaire pour la fonction des macrophages.....	26
2.4. Les mécanismes de protection	29
2.4.1. Les voies d'efflux au niveau des macrophages	29
2.4.2. La régulation de l'efflux dans les macrophages	38

2.4.2.1.	La régulation intracellulaire de l'efflux	38
2.4.2.2.	Stimuli connus pour augmenter l'efflux	39
2.4.2.3.	Stimuli ou conditions pathologiques diminuant l'efflux	42
3.	Le transport du cholestérol cellulaire par les lipoprotéines	45
3.1.	Métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB.....	45
3.1.1.	Les voies exogènes du métabolisme des lipoprotéines (la voie de l'intestin).....	46
3.1.1.1.	L'absorption de cholestérol	46
3.1.1.2.	Assemblage et sécrétion des chylomicrons dans les entérocytes	47
3.1.1.3.	Métabolisme et élimination des CM de la circulation.	50
3.1.2.	La voie endogène du cholestérol (du foie vers les tissus périphériques)	51
3.1.2.1.	Métabolisme des lipoprotéines à très basse densité (VLDL)	51
3.1.2.2.	Catabolisme et élimination des LDL	54
3.2.	La voie des HDL (le TIC).....	56
3.2.1.	La biogénèse et la maturation des HDL	56
3.2.2.	Le remodelage et la conversion des HDL.....	58
3.2.3.	La captation hépatique des HDL	63
3.2.3.1.	Le récepteur d'épuration SR-BI.....	63
3.2.3.2.	Le récepteur F ₁ -ATPase.....	67
3.2.3.3.	Le récepteur P2Y ₁₃	68
3.2.4.	La création et la sécrétion biliaire du CL et des PL.....	69
3.2.5.	Les modèles d'étude pour le transport du cholestérol	72
3.2.5.1.	Les modèles d'études cellulaires pour l'efflux de cholestérol....	72
3.2.5.1.1.	Les modèles cellulaires utilisant des macrophages	73
3.2.5.1.2.	Les modèles cellulaires utilisant les cellules hépatiques	75
3.2.5.2.	Les modèles d'études <i>in vivo</i> pour le TIC	78
3.2.5.2.1.	Le modèle de souris pour le TIC à partir de macrophage.....	78
3.2.5.2.2.	Le modèle de hamster pour le TIC à partir des macrophages .	81
3.2.5.2.3.	Le modèle humain du TIC en utilisant des isotopes stables	83
3.2.6.	Les traitements pharmacologiques visant à intensifier le TIC.....	85

3.2.6.1. La hausse directe ou indirecte de la concentration des accepteurs de cholestérol.....	86
3.2.6.1.1. Infusion d'apoA-I complexés ou de HDL reconstituées (rHDL)	86
3.2.6.1.2. Les peptides mimétiques de l'apoA-I.....	89
3.2.6.2. Modulateurs du métabolisme des particules HDL.....	90
3.2.6.2.1. Les inhibiteurs de la CETP	90
3.2.6.2.1.1. Le torcetrapib (Tor).....	90
3.2.6.2.1.2. Le dalcetrapib (Dal)	91
3.2.6.2.1.3. L'anacetrapib (Ana)	93
3.2.6.2.2. La niacine (acide nicotinique)	94
3.2.6.3. Les agonistes du LXR.....	95
4. Problématique et but de l'étude	97
MÉTHODES DÉTAILLÉES.....	99
1. Préparation de lipoprotéines et de sérums.	99
1.1. Isolement des LDL et HDL à partir du plasma humain.....	99
1.2. Préparation de sérum déplété en apolipoprotéine B	100
1.3. Préparation des LDL acétylées (LDLac)	100
1.4. Dosage de protéines selon la méthode de Lowry	101
2. Culture cellulaire	102
2.1. Culture cellulaire des macrophages J774 et des hépatocytes HepG2... ..	102
3. Essais cellulaires de transport de ³ H-cholestérol pour l'évaluation du TIC .	102
3.1. Essais d'efflux de ³ H-cholestérol par la méthode classique	102
3.2. Essais de transport du ³ H-cholestérol dans un système <i>in vitro</i> du TIC du milieu d'efflux des cellules J774 sur les cellules HepG2	104
3.3. Essais de transport du ³ H-cholestérol dans un système de co-culture <i>in vitro</i> (protocole standard)	105
3.3.1. Essais dans un système de co-culture <i>in vitro</i> pour déterminer la densité optimale d'ensemencement des HepG2	107

3.3.2. Essais de transport du ^3H -cholestérol dans un système de co-culture <i>in vitro</i> pour déterminer la proportion de ^3H -cholestérol associée aux cellules HepG2	108
3.3.3. Essais de ^3H -cholestérol dans un système de co-culture <i>in vitro</i> pour déterminer l'effet de différents revêtements sur l'adsorption non-spécifique du ^3H -cholestérol sur la membrane.....	108
3.3.4. Essais de ^3H -cholestérol dans un système de co-culture <i>in vitro</i> pour déterminer l'effet de différents types d'inserts sur l'adsorption non-spécifique du ^3H -cholestérol sur la membrane.	109
4. Immunobuvardage (Western blot).....	109
5. Analyses statistiques.....	111
RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES.....	112
1. Transport du ^3H -cholestérol par efflux classique.	112
1.1. Dose-réponse avec différentes concentrations d'apoA-I et de HDL isolées.	112
2. Transport du ^3H -cholestérol dans un système <i>in vitro</i> du TIC par transfert de milieu conditionné	115
2.1. Dose réponse avec différentes concentrations de sérum humain mis en commun	115
2.2. Essai avec différents types d'accepteurs de cholestérol et du sérum humain mis en commun.....	118
3. Transport du ^3H -cholestérol dans un système <i>in vitro</i> du TIC en co-culture	121
3.1. Détermination de la densité d'ensemencement optimale des HepG2 dans l'insert.....	121
3.2. Détermination de la proportion ^3H -cholestérol associée aux cellules HepG2 dans l'insert	123
3.3. Détermination de l'effet de différents revêtements pour la prévention de l'adsorption non-spécifique du ^3H -cholestérol sur la membrane de l'insert	127
3.4. Détermination de l'effet d'inserts faits de différents matériaux et de tailles de pores différentes pour la prévention de l'adsorption non-spécifique du ^3H -cholestérol sur la membrane.....	131

CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE	138
DEVELOPMENT OF A CO-CULTURE <i>IN VITRO</i> MODEL FOR REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT EVALUATION	139
ABSTRACT.....	140
INTRODUCTION	141
EXPERIMENTAL PROCEDURES	145
1. Materials	145
2. In vitro co-culture studies	145
3. Protein analysis by western blot	146
4. Preparation of lipoproteins and human sera	147
5. Serum lipids and lipoproteins analysis	148
6. Statistics.....	148
EXPERIMENTAL RESULTS	149
1. Detection of cholesterol transporters and receptors in J774 foam cells and HepG2 cells.	149
2. Dose-response curve with pooled human serum in co-culture system.....	151
3. Effects of different cholesterol acceptors in the co-culture system	153
4. Use of effectors known to increase the RCT pathway in the co-culture system	155
5. Correlation between lipid parameters and RCT parameters in co-culture system	158
DISCUSSION.....	163
SUPPLEMENTARY DATA	169
REFERENCES	170
DISCUSSION	176
BIBLIOGRAPHIE	186

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Relation entre les niveaux de HDL-C, le TIC et le développement de l'athérosclérose chez des souris en réponse à des manipulations génétiques.....	80
Tableau II : Observation microscopique de la culture des cellules HepG2 sur des membranes de différents matériaux et tailles de pores.....	137
Supplementary Table 1. Baseline characteristics of the 13 healthy men.....	169

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les quatre phases du développement de l'athérosclérose.....	16
Figure 2 : Voies d'entrée, voie de stockage et voies de sortie du cholestérol dans le macrophage spumeux.....	24
Figure 3: Les voies d'activation de l'apoptose dans le macrophage spumeux.....	29
Figure 4: Les différentes étapes du transport inverse du cholestérol (TIC).....	63
Figure 5: Pourcentage d'efflux de cholestérol lors d'une expérience de dose-réponse avec différentes concentrations d'apoA-I et de HDL isolées par efflux classique.....	114
Figure 6. Pourcentage d'efflux et comptes bruts (en cpm) d'influx dans les HepG2 lors d'une dose-réponse par transfert avec des sérums humains individuels mis en commun.....	116
Figure 7. Pourcentage d'efflux et comptes bruts dans les HepG2 avec différents accepteurs de cholestérol par transfert.....	120
Figure 8. Détermination de densité optimale d'ensemencement des cellules HepG2 sur la membrane de l'insert du système de co-culture.....	122
Figure 9: Détermination de la proportion de ³ H-cholestérol restante dans les cellules HepG2 avec deux méthodes de solubilisation de l'insert dans le système de co-culture.....	124
Figure 10. Détermination des effets de différents revêtements contre l'adsorption non spécifique du ³ H-cholestérol par la membrane de l'insert du système de co-culture.....	129
Figure 11 : Détermination des effets de différents matériaux et tailles de pores sur l'adsorption du ³ H-cholestérol par la membrane de l'insert du système de co-culture.....	134
Figure 12: The <i>in-vitro</i> co-culture system assembly.....	146
Figure 13: Western blot of cholesterol transporter ABCA1 and receptor SR-BI in J774 foam cells and HepG2 cells in different conditions.....	150
Figure 14: Efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) values in co-culture system during a 24 h dose-response experiment with pooled human serum.....	152

Figure 15: Efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) values in co-culture system to different cholesterol acceptors during a 24 h incubation period.....	154
Figure 16: Validation of the co-culture system with different treatments known to increase ABCA1-mediated cholesterol efflux pathway and RCT.....	157
Figure 17: Efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) values in co-culture system with 13 healthy volunteers' serum.....	159
Figure 18: Linear correlation analysis between J774 efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) in co-culture system with 13 healthy volunteers' sera.....	160
Figure 19: Linear correlation analysis between lipid parameters and J774 efflux (%) in co-culture system with HepG2 cells and with 13 healthy volunteers' sera.....	161
Figure 20: Linear correlation analysis between lipid parameters and crude counts in HepG2 cells (cpm) in the co-culture system using 13 healthy volunteers' sera....	162

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

13-HODE:	Acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque
22-OH-chol.:	22-hydroxycholestérol
27-OH-chol.:	27-hydroxycholestérol
9c-RA:	Acide 9-cis rétinoïque
9-HODE:	Acide 9- hydroxyoctadécadiénoïque
AB:	Acides biliaires
ABCA1:	Transporteur ABC de classe A de type 1
ABCG1:	Transporteur ABC de classe G de type 1
AC:	Acide cholique
ACAT-1:	Acyl-coenzyme A: cholestérol acyltransférase de type 1
ACC:	Acetyl-coenzyme A carboxylase
ACDC:	Acide chénodésoxycholique
ACEH:	Hydrolase acide d'esters de cholestérol
AcLDL:	Acetylated LDL
ACV:	Accident cérébro-vasculaire
ADP:	Adenosine diphosphate
AHA:	American Heart Association
AIM-HIGH:	Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglycerides and Impact on Global Health Outcomes
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
Ana:	Anacetrapib
Apo (a):	Apolipoprotéine (a)
ApoA:	Apolipoprotéine A
ApoB:	Apolipoprotéine B
ApoC-II :	Apolipoprotéine C-II
ApoE:	Apolipoprotéine E
APOE:	Gène de l'apoE
ARNm:	ARN messenger
ATF6:	Activating transcription factor-6

ATP:	Adénoside triphosphate
A β C:	Acide 3 β -hydroxy-5-cholesténoïque
Bmax:	Liaison spécifique maximale sur l'axe des « y »
BSA:	Albumine de sérum bovin
BSEP:	Bile salt export pump
CaMKII:	Kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline de type II
CD36:	Récepteurs d'épuration de classe B (cluster of Differentiation 36)
CE:	Cholestérol estérifié
CES1:	Carboxylestérase 1
CETP:	Cholesteryl ester transfer protein
CHOP:	Protéine homologue de CEBP
CL:	Cholestérol libre
CLA-1 :	CD36- and LIMPII-analogous-1
CLAMP:	C-terminal linking and modulating protein
CM:	Chylomicrons
COPII:	Coatomer II protein
Cpm:	Counts per minute
CPT-1:	Carnitine palmitoyltransférase 1
CRE:	Élément de réponse à l'AMPc
CREB :	cAMP response element binding protein
CRP :	Protéine C réactive
CTP:	Cytidine triphosphate
CYP7A1 :	Cholestérol 7 α -hydroxylase
CYP27 :	Gène codant la 27-hydroxylase
CYP27A1:	Cholestérol-27-hydroxylase
Dal:	Dalcetrapib
DEFINE:	Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib
DGAT2:	Acyl-coenzyme A: diacylglycérol acyltransférase 2
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSMB:	Data and Safety Monitoring Board

EC:	Cellules endothéliales
EDTA:	Ethylene diamine tetraacetic acid
EL:	Endothelial lipase
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
eNOS :	Synthase d'oxyde nitrique de l'endothélium
eNOS:	Endothelial nitric oxide synthase
E-sélectine:	Sélectine endothéliale
FAS:	Fatty acid synthase
FBS:	Fetal bovine serum
FDB-100:	Hypercholestérolémie familiale liée à l'apoB-100 déficiente
FH:	Hypercholestérolémie familiale
GWAS:	Étude d'association pangénomique
Group X sPLA ₂ :	Group X secretory phospholipase A ₂
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HA-PLTP:	High activity-PLTP)
HCBS:	High capacity binding site
HDL:	High density lipoprotein
HDL-C:	HDL-cholestérol
HL:	Hepatic lipase
HMG-CoA:	Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
HPS2-THRIVE:	Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events
HRP:	Peroxydase de raifort
I.V.	Intraveineuse
ICAM-1:	Molécules d'adhésion intercellulaire-1
IDL:	Intermediate density lipoprotein
IL:	Interleukine
ILLUMINATE:	Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events
IM:	Infarctus du myocarde
IRE1 :	Inositol requiring protein 1
IRMS:	Isotope ratio mass spectrometry
IVUS :	Intravascular ultrasound

Kd:	Constante d'affinité ou de dissociation
LAL:	Lipase acide lysosomiale
LA-PLTP:	Low activity-PLTP
LCAT:	Lecithin: cholesterol acyltransferase
LCBS:	Low capacity binding site
LDL:	Low density lipoprotein
LDLac:	LDL acétylées
LDL-C:	LDL-cholestérol
LDLR :	Gène du LDL récepteur
L-FABP:	Liver-fatty acid binding protein
LPA:	Gène de la Lp(a)
Lp (a):	Lipoprotéine (a)
LPB:	Lipopolysaccharide binding protein
LPDS:	Sérum dépleté en lipoprotéines
LPL:	Lipoprotéine lipase
LPS:	Lipopolysaccharides
LRP:	Protéine apparentée au récepteur de LDL
LXR:	Récepteur nucléaire des oxystérols
LysoPL :	Lysophospholipides
MCAS:	Maladies coronariennes athérosclérotiques
MCP-1:	Protéine chimiotactique des monocytes
MCSF-1:	Facteur de stimulation de colonies de macrophages
MCV:	Maladies cardiovasculaires
MDM :	Monocyte-derived macrophages
MDR2:	Multidrug resistance p-glycoprotein 2
MMP:	Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
MPM :	Mouse peritoneal macrophages
MCSF-1:	Macrophage stimulated-colony factor-1
MTP:	Microsomal triglyceride transfer protein
NBD:	Domaine de liaison aux nucléotides
NCEH:	Hydrolase neutre d'esters de cholestérol

NCoR:	Nuclear receptor co-repressor
NO:	Oxyde nitrique
NPC-1 et -2:	Niemann-Pick de type C 1 et 2
NPC1L1:	Niemann-Pick C1-like 1
NS:	Pente du compartiment non-spécifique « y /x»
O ₂ ⁻ :	Anion superoxyde
oxLDL:	LDL oxydées
P2Y ₁₃ :	Purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 13
PAT :	Protéines associées aux gouttelettes lipidiques incluant la périlipine, l'adipophiline et la TIP47
PBS:	Tampon phosphate salin
PC :	Phosphatidylcholine
PCSK9:	Proprotein convertase subtilisin-like, kexin type 9
PC-TP:	PC-transport protein
PEG:	Polyéthylène glycol
PERK:	RNA-dependent protein kinase-like ER kinase
PET-CT:	Positron emission tomography-computed tomography
PKA:	Protéine kinase A
PL:	Phospholipides
PLTP:	Phospholipid transfer protein
PMA:	Phorbol myristate acétate
PMSF:	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PPAR :	Proliférateurs de peroxyosomes
PRR:	Pattern recognition receptor family
P-sélectine:	Sélectine plaquettaire
PVDF:	Polyvinylidene fluoride
rCM:	Résidus de chylomicron
RE:	Réticulum endoplasmique
Redox:	Réduction-Oxydation
REVEAL:	Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid modification

rHDL :	HDL reconstituées
rIP3:	Récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate
RIPA:	RadioImmunoPrecipitation Assay
rLDL:	Récepteur de LDL
ROS:	Espèces réactives de l'oxygène
Rpm:	Rotations per minute
rVLDL:	Récepteur de VLDL
RXR:	Retinoid X receptor
SCAP:	Protéine d'activation de clivage de SREBP
SCD1:	Stéaroyl-coenzyme A désaturase 1
SCP2:	Sterol carrier protein-2
SMC:	Cellules musculaires lisses
SMRT:	Silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor
SNP:	Polymorphisme d'un seul nucléotide
sPLA2:	Phospholipase A2 sécrétée
SR-A:	Récepteurs d'épuration de classe A
SR-BI:	Récepteur d'épuration de classe B de type 1
SREBP-1c:	Protéine-1c se liant à l'élément régulateur du stérol
SR-PSOX/CXCL16:	Récepteur d'épuration qui lie la phosphatidylsérine et les lipoprotéines oxydées/ Ligand du récepteur CXCR6
TBS:	Tampon Tris salin
TC:	Cholestérol total
TG:	Triglycérides
TGF- β :	Facteur de croissance transformant β
TIC:	Transport inverse du cholestérol
TICE:	Transintestinal cholesterol efflux
TIP47:	Tail-interacting protein of 47 kDa
TLR:	Récepteurs Toll-like
TMD:	Domaines transmembranaires
TNF- α :	Facteur de nécrose tumorale α
TO:	TO901317

Tor:	Torcetrapib
UPR:	Réponse cellulaire aux protéines dépliées
v-ATPase:	ATPase de type vacuolaire
VCAM-1:	Molécules d'adhésion cellulaire vasculaire 1
VLDL:	Very low density lipoprotein

DÉDICACE

À mon neveu, Melvin-Mase Dorcélus-Carling,

« La victoire sur soi est la plus grande des victoires. »

Platon

« Aie confiance en toi-même, et tu sauras vivre.»

Goethe

Merci d'être le catalyseur derrière chacune de mes ambitions.
Tu me pousses chaque jour à devenir une meilleure personne, en me forçant à
dépasser mes limites personnelles.

Je suis extrêmement fière d'être ta tante.

REMERCIEMENTS

Aux membres techniques de mon laboratoire, merci pour votre enseignement et votre soutien. Aux étudiants du niveau postdoctoral pour qui l'acharnement est sans limite, un merci tout particulier à Dr. Mathieu R. Brodeur, avec qui j'ai appris énormément sur moi-même. Merci à mon chef d'unité, Dr. David Rhinds, pour qui la tâche de façonner brillamment une future scientifique accomplie pesait sûrement lourdement. Merci pour ta vigilante supervision, tes précieux conseils. Tu m'as inculqué un sens développé du souci du détail et une curiosité scientifique aiguisée. Merci au Dr. Éric Rhéaume pour l'élaboration d'un projet de maîtrise aussi passionnant, original, qui aura je l'espère, un impact colossal dans le domaine de l'athérosclérose. Au directeur de cette talentueuse équipe de recherche, Dr. Jean-Claude Tardif, merci d'être un excellent modèle à suivre. Vos nombreux accomplissements sont preuves que les plus grands freins qui s'opposent à un parcours sont ceux posés par soi-même.

Je désire aussi remercier mes parents Marie-Roberte Jean-Baptiste et Gesner Carling. Tous les sacrifices et les choix difficiles pris afin d'apporter à vos enfants, le millième des opportunités de la vie ont finalement porté fruit. À ma famille Carling et Jean-Baptiste, sans qui, il me serait impossible d'être parvenue aussi loin. Vous êtes tous, sans exception, les piliers fondateurs de mon infrastructure.

À mon cher et tendre amour, Roslin Charles. Merci de m'avoir soutenu dans les moments de doutes et de remises en questions, de m'avoir énoncé les quatre vérités, si pénibles furent-elles. Je veux spécialement te remercier de m'aimer telle que je suis sans limites et conditions, fidèle compagnon. *Épouse-moi!*

Pour terminer, merci à vous, membres du jury et futurs lecteurs, ce travail est empreint de persévérance, de dévouement et j'en suis fière.

INTRODUCTION

L'impact majeur que démontrent les maladies cardiovasculaires (MCV) sur le taux de mortalité et de morbidité est l'une des principales raisons pour lesquelles l'intérêt visant à comprendre les facteurs ainsi que les mécanismes menant à leur apparition est soutenu depuis plusieurs décennies.

1. Les prédispositions à développer des MCV

1.1. Épidémiologie

Selon l'American Heart Association (AHA), en 2009, les MCV sont la cause principale de mortalité dans les pays industrialisés, et comptent pour 35 % de tous les décès ¹ soit une prévalence plus élevée que celle obtenue pour le cancer, une autre cause de mortalité majeure. Ces statistiques alarmantes devraient sensibiliser la population à des habitudes de vie plus saines et équilibrées. En effet, le développement des MCV est influencé par plusieurs facteurs de risque qui sont classifiés en deux catégories : les facteurs de risque non-modifiable et modifiable.

La catégorie des facteurs de risque non-modifiable inclut entre autres l'âge, le sexe et la race. Le risque de mortalité dû aux MCV augmente avec l'âge. En 2005, 32 % des décès reliés aux MCV se sont produits avant l'âge de 75 ans.¹ Dans la même optique, il est démontré que le sexe est une variable à considérer lorsqu'il est question des MCV. Il est démontré que les hommes sont plus susceptibles de développer des MCV que les femmes; soit des statistiques montrant que 40 % d'hommes sont atteints de MCV contre 30 % chez les femmes.² De plus, les événements pronostiques de ces maladies se distinguent aussi selon le sexe. Par exemple, il est plus commun que l'angine de poitrine chez les femmes soit la première manifestation d'une MCV, tandis que chez le sexe opposé, l'infarctus du myocarde (IM) est plus fréquent.³ Le nombre de décès causés par les MCV peut aussi varier selon la race d'un individu. Les personnes à la peau claire sont la

fraction de la population la plus atteinte de MCV, et ce depuis 2009.^{4,5} Cependant, les gens aux traits négroïdes ont une probabilité beaucoup plus élevée que celle observée chez les gens de couleur blanche de développer une MCV puisque les personnes noires cumulent fréquemment à leur actif deux ou plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension, l'obésité, le syndrome métabolique et le manque d'activité physique.⁶ Malgré l'effet cumulatif des facteurs de risque chez les gens noirs, les caucasiens se classent comme étant la race la plus vulnérable aux maladies cardiovasculaires.

En ce qui a trait à la catégorie des facteurs de risque modifiables, celle-ci est influencée par l'individu même qui possède un certain contrôle sur les probabilités d'encourir les MCV. Ces facteurs de risque incluent des paramètres de la santé physique soit une haute pression artérielle, une mauvaise alimentation menant à l'obésité et l'embonpoint, à l'utilisation de tabac, à une inactivité physique et un profil lipidique anormal. Une haute pression artérielle est caractérisée comme étant une augmentation de la pression du sang contre les vaisseaux sanguins, ce qui fait augmenter la charge de travail du cœur de manière anormale. L'hypertension est définie comme une pression artérielle systolique (pression lors de la contraction du muscle cardiaque) au-dessus de 140 mm Hg et une pression artérielle diastolique (pression lors de la relaxation du muscle cardiaque) au-dessus de 90 mm Hg.⁷ Une diminution de la pression sanguine de 10 mm Hg est associée à une baisse de 30-40 % du risque d'encourir un accident cérébro-vasculaire (ACV).⁸ De plus, une saine alimentation riche en fruits et légumes, pauvre en gras animal et en produits laitiers gras et une consommation en alcool modérée vise une diminution du risque de développer une MCV.⁹ L'utilisation de tabac est aussi l'un des facteurs environnementaux ayant la plus grande contribution dans le développement de MCV et est associée à un risque de décès deux fois plus élevé que la normale.¹⁰ Par ailleurs, le manque d'activité physique est considéré comme un facteur de risque puisque la sédentarité influe sur la fonction endothéliale des vaisseaux sanguins, en diminuant la production d'oxyde nitrique (NO), ce qui résulte en une vasoconstriction des vaisseaux et peut mener à une dysfonction endothéliale face

aux distensions des vaisseaux créées par la tension artérielle, un élément instigateur de MCV. Dans une étude établissant la relation entre l'activité physique et le risque de développer un ACV, des personnes modérément actives ou hautement actives diminuaient de 20 % et 27 %, respectivement, leur risque d'encourir un ACV comparé à des personnes inactives.¹¹

En ce qui a trait au profil lipidique, l'AHA a tracé des lignes directrices permettant d'établir des seuils normaux à observer pour le niveau sanguin de cholestérol. En effet, le niveau de cholestérol total plasmatique (TC) doit être inférieur à 5,2 mM (200 mg/dL). Afin de diminuer le risque de développer une MCV, le niveau de cholestérol lié aux LDL (*low density lipoprotein*) plasmatiques doit être inférieur à 3,6 mM (160 mg/dL). Un niveau élevé de LDL-cholestérol (LDL-C) est le facteur de risque principal d'une MCV primaire et semble nécessaire au développement de l'athérosclérose.¹² De plus, le niveau de cholestérol retrouvé dans les HDL (*high density lipoprotein*) doit être supérieur à 1,0 mM (40 mg/dL) chez les hommes et 1,3 mM (50 mg/dL) chez les femmes puisqu'une corrélation inversement proportionnelle avec le risque d'encourir une MCV a été observée.¹³ Et pour terminer, le seuil normal de triglycérides (TG) sanguins doit être inférieur à 1,7 mM (150 mg/dL). Les hauts niveaux de TG plasmatiques sont associés au développement d'ACV ischémiques¹⁴ et à des ACV liés à l'athérosclérose de grosses artères.¹⁵

1.2. Génétique

Dans la majorité des MCV, les facteurs environnementaux aussi bien que génétiques augmentent considérablement la propension aux maladies cardiovasculaires. En effet, les anomalies (mutations) et les variations (polymorphismes) dans certains gènes occasionnent un risque accru d'être atteint d'une MCV. Les facteurs héréditaires comptent pour 30-60 % des variations inter-individuelles impliquées dans les risques de maladies coronariennes athérosclérotiques (MCAS).¹⁶

Dans une étude d'association pangénomique (GWAS) pour les MCAS, certains gènes ont des allèles de risque qui sont associées à des augmentations entre 6 et 17 % du risque de développer une MCAS.¹⁷ Des régions géniques incluant le gène LDLR (gène du récepteur de LDL) et le gène LPA (gène de la Lp (a)) sont significativement corrélées avec le risque d'encourir une MCAS.¹⁷ Des maladies causées par des défauts (mutations) de gènes codants tels que l'apolipoprotéine B-100 (apoB-100),¹⁸ l'apolipoprotéine E (apoE)¹⁹, l'apolipoprotéine (a) (apo(a))²⁰ et certaines maladies comme les hypercholestérolémies²¹ (décrite ultérieurement) sont des exemples que l'aspect génétique ne peut être exclus pour établir l'origine des MCV. Par exemple, l'apoE est une apolipoprotéine ayant un rôle crucial dans le métabolisme des lipides puisqu'elle agit comme ligand pour une variété de récepteurs à la surface cellulaire tels que le rLDL, la protéine apparentée au récepteur de LDL (LRP) et le récepteur de VLDL (rVLDL).¹⁹

L'apoE possède 3 isoformes : apoE2, apoE3 et apoE4. L'apoE3 est l'isoforme normale impliquée dans le métabolisme lipidique tandis que les isoformes²² E2 et E4, proviennent de variants du gène APOE (gène de l'apoE).²³ La fréquence approximative dans la population de E2, E3, E4 est de 10 %, 75 % et 15 %, respectivement.²² Or, ces trois derniers polymorphismes ont démontré des impacts différents sur le niveau sanguin d'apoE, de cholestérol total (TC) et LDL-C.²⁴ En effet, les individus portant l'allèle E4 sont plus à risque de développer une MCV, puisqu'ils possèdent des niveaux moins élevés d'apoE, qui généralement aide à la clairance des lipoprotéines contenant l'apoB et donc des niveaux plus élevés de TC et de LDL-C sont observés. ApoE4 est donc un facteur de risque génétique augmentant la prédisposition aux MCV.²⁵

Finalement, une mutation dans le gène de l'apo (a) engendre aussi des répercussions importantes sur le risque de développer une MCV. En effet, le gène de l'apo (a) est associé à la lipoprotéine (a) (Lp (a)), dont la concentration plasmatique élevée est fortement corrélée au développement d'une MCV.²⁶ Les niveaux plasmatiques de Lp (a) sont largement déterminés par la composante

génique de l'apo (a). Un polymorphisme du domaine Kringle IV de type 2 dans le gène de l'apo (a) résulte en une variation de 2 à 40 répétitions (de chaque allèle) qui est associée inversement au niveau de Lp (a) sanguin.²⁷ Le nombre de répétitions dans ce polymorphisme explique jusqu'à 21-27 % de la variation du niveau plasmatique du Lp (a).²⁸ De plus, un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) a été identifié dans le gène de l'apo (a), soit le variant I4399M et celui-ci est fortement associé au développement de l'athérosclérose sévère.²⁹

2. Athérosclérose

En dépit de tous ces facteurs de risques, ceux qui suscitent le plus grand intérêt sont en lien avec les dyslipidémies. Plusieurs ont tenté d'élucider en profondeur la relation entre le développement de maladies cardiovasculaires et le métabolisme des lipides, facteur qui interagit étroitement avec le risque cardiovasculaire.

L'une des maladies des vaisseaux la plus répandue en lien avec ces dyslipidémies est l'athérosclérose. Cette maladie complexe se caractérise de manière générale comme étant une maladie inflammatoire chronique des artères, qui est fréquemment associée à une hyperlipidémie et initiée par l'infiltration et l'accumulation lipidique dans les parois des vaisseaux sanguins, résultant finalement en une sténose (rétrécissement du vaisseau dû à une occlusion partielle) ou à une thrombose (occlusion complète) artérielle. En effet, cette maladie se développe de manière silencieuse, puisqu'elle demeure asymptomatique durant les phases initiales de son développement. Elle se déploie généralement vers la fin de l'adolescence et suit son cours durant l'âge adulte avant que des signes cliniques ne se manifestent vers le début de la quarantaine.³⁰

2.1. Hypothèses supportant le développement de l'athérosclérose

2.1.1. Cholestérol et TG circulants

Le cholestérol est un lipide qui est majoritairement fabriqué par l'organisme. La synthèse du cholestérol débute dans le cytoplasme du réticulum endoplasmique (RE) lisse des cellules du foie et de l'intestin. Près de 75 % du cholestérol est synthétisé dans le foie tandis que le 25 % restant provient de l'alimentation. Le cholestérol est un lipide essentiel au bon fonctionnement des cellules de notre corps, puisqu'il est impliqué dans la création des membranes cellulaires, il est le précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes du corps, il permet la production de sels biliaires qui assurent une bonne digestion par la fragmentation et l'émulsion des lipides ingérés dans l'alimentation et il est indispensable dans la fabrication de la vitamine D, qui est nécessaire pour l'incorporation du calcium dans les os.

En ce qui a trait aux TG, leur synthèse est aussi associée au RE où une réaction entre 3 acides gras et du L-glycérol initie leur fabrication dans le foie. Les cellules peuvent donc synthétiser leur propre cholestérol ou peuvent le prendre d'une source externe, l'alimentation.

Le cholestérol est transporté vers ses différentes destinations dans le corps sous sa forme transportable, les lipoprotéines. Les lipoprotéines permettent le transport du cholestérol à travers l'organisme grâce à des composantes protéiques soient des apolipoprotéines qui confèrent au cholestérol une solubilité dans le sang. Un niveau sanguin élevé de cholestérol est associé au développement de pathologies vasculaires comme l'athérosclérose.³¹ Dans le cas échéant où le seuil normal de TC établi (mentionné plus haut) est dépassé, celui-ci peut faire doubler, voir même tripler le risque de MCAS. En effet, la génération (décrite ultérieurement) de différents types de lipoprotéines influence grandement le niveau de TC sanguin et hausse le risque de mortalité.³²

Trois changements dans ce profil lipidique sanguin sont responsables de ce potentiel élevé de risques cardiovasculaire, soit 1) l'augmentation des résidus de

lipoprotéines riches en TG, 2) la création de petites LDL denses et 3) la diminution de HDL-C.³²

Après la prise d'un repas, les lipides ingérés lors de l'alimentation initient la création des lipoprotéines riches en TG avec l'aide de lipases plasmatiques telle que la lipase lipoprotéique (LPL), qui est principalement responsable de leur catabolisme. Une résistance des lipoprotéines provenant de la voie endogène peut être observée ainsi qu'un ralentissement de leur clairance hépatique.³³⁻³⁵ Cette accumulation perturbe donc le niveau de TC sanguin puisque le séjour prolongé de ces lipoprotéines dans le sang permet tout d'abord, un enrichissement plus important en TG de celles-ci et ensuite un enrichissement en cholestérol par l'action de la CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*), entraînant la formation de petites LDL denses. Par conséquent, la création de petites particules de LDL denses à partir des lipoprotéines riches en TG est souvent incluse dans la description d'un profil lipoprotéique athérogène et associée à une augmentation du risque de développer une MCAS.³⁶⁻³⁸

Ce profil athérogène des LDL denses est fondé sur leur grande susceptibilité à subir des modifications oxydatives et à posséder une grande affinité pour les protéoglycanes artérielles, ainsi que sur leur efficacité à s'infiltrer aisément dans la paroi artérielle.³⁹⁻⁴¹ Par ailleurs, une augmentation de lipoprotéines riches en TG est fréquemment associée à une diminution des particules antiathérogènes, les HDL, principalement les particules HDL₂ via l'activité d'une lipase plasmatique qui initie son catabolisme vers une forme moins mature soit les particules HDL₃.^{42,43} (Précision apportée à la section 3.2) La relation partagée de ces trois changements du profil lipidique sanguin contribue de manière importante au risque de développer une MCAS.

2.1.1.1. Les hypercholestérolémies

En référence à l'athérosclérose et son lien étroit avec le métabolisme des lipides, certains types d'hyperlipidémies ont une origine génétique bien définie. Ces

hyperlipidémies augmentent de façon marquée le risque de développer l'athérosclérose puisqu'elles se caractérisent par une accumulation anormale de lipoprotéines chargées en cholestérol dans le plasma due à des mutations dans les gènes impliquées dans la régulation des taux de cholestérol et/ou des triglycérides plasmatiques. Les hypercholestérolémies font partie de ces hyperlipidémies.

Les différentes formes d'hypercholestérolémies ayant des mutations dominantes sont l'hypercholestérolémie familiale (FH), l'hypercholestérolémie familiale liée à l'apoB-100 déficiente (FDB-100) et l'hypercholestérolémie liée au gène PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin-like, kexin type 9*).

L'hypercholestérolémie familiale (FH) est la forme d'hypercholestérolémie la plus fréquente de trois connues. Elle est causée par une mutation autosomale dans le gène du rLDL, où un (hétérozygote) ou deux (homozygote) allèles sont affectés d'une mutation à effet co-dominant.²¹ Elle atteint près d'une personne sur cinq cent, pour les patients hétérozygotes qui possèdent un niveau de TC s'échelonnant entre 350 et 550 mg/dL, ce qui est au-dessus du seuil normal (200 mg/dL).⁴⁴ Si ces patients ne sont pas traités, 50 % des hommes atteints vont subir un infarctus du myocarde avant l'âge de 50 ans, tandis que 30 % des femmes atteintes le développeront avant l'âge de 60 ans.⁴⁵ Dans le cas où les deux allèles sont affectés, le niveau de TC triple et atteint un niveau entre 650 et 1000 mg/dL.⁴⁴ Cependant, la probabilité de posséder un profil homozygote pour cette mutation est plus faible, soit une chance sur un million.⁴⁴

Cinq classes d'effets des mutations du rLDL sont possibles pour expliquer cette hypercholestérolémie. La première se caractérise par une absence totale de la protéine du récepteur à la surface membranaire.⁴⁶ Le deuxième type se traduit plutôt par une présence du rLDL à la surface cellulaire, mais par une incapacité à lier la particule LDL.⁴⁶ Le troisième type de mutation diffère du deuxième type par sa capacité de liaison avec la LDL, puisqu'une affinité limitée du rLDL est observée.⁴⁶ Seul ce type de mutation peut être compensé par des agents thérapeutiques tels les

inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, les statines qui, en diminuant la synthèse du cholestérol cellulaire, vont augmenter la synthèse de rLDL par des voies intrinsèques afin d'en augmenter le nombre à la surface cellulaire et de hausser la clairance du cholestérol plasmatique.⁴⁷ L'avant-dernier type de mutation se manifeste par l'incapacité du rLDL et son ligand d'être internalisé dans la cellule, une fois la liaison formée.⁴⁶ Le dernier type, lui, permet la séquestration complète de la particule LDL circulante mais le rLDL ne peut être recyclé vers la surface cellulaire, une fois le transport accompli vers les lysosomes.⁴⁶ Ces modifications géniques occasionnent donc une perte d'activité de ce récepteur, menant à une accumulation considérable des particules LDL et réduisant la séquestration de ces lipoprotéines de la circulation sanguine.⁴⁸ De plus, cette accumulation initie l'augmentation de la conversion des IDL (*intermediate density lipoprotein*) vers celles des particules LDL, haussant d'autant plus le niveau plasmatique de cholestérol.⁴⁹

Plusieurs mutations peuvent causer une autre forme d'hypercholestérolémie, cette fois, associée au gène de l'apoB. Ceci génère des anomalies du niveau de cholestérol sanguin et est défini comme étant la FBD. Une de ces mutations se caractérise par le changement de l'acide aminé glutamine en arginine dans le codon 3 500 du gène de l'apoB.⁵⁰ Cette mutation touche une personne sur six cent et altère la liaison entre le rLDL et la particule LDL contenant l'apoB défective.⁵¹ Ceci résulte en une augmentation du niveau de LDL-C au-dessus du seuil normal de LDL-C établie par l'AHA et accroît le risque de développer l'athérosclérose.¹⁸

De plus, une autre hypercholestérolémie qui module le développement de l'athérosclérose, est celle impliquant des mutations faux-sens dans le gène PCSK9, une protéine régulatrice du rLDL.⁵² Ces altérations dans la protéine PCSK9 comptent pour 12,5 % des maladies hypercholestérolémiantes autosomales.⁵³ En effet, des mutations telles que la substitution d'une sérine en position 127 par une arginine (S127R) ou la substitution de l'acide aspartique en position 374 par une tyrosine (D374Y) confèrent un gain de fonction à la protéine PCSK9.⁵³ S127R et

D374Y sont les mutations les plus fréquentes dans la protéine PCSK9 quant à la diminution du nombre de rLDL présent à la surface hépatique de manière.^{54,55} Ces mutations sont donc grandement associées avec le développement précoce de l'athérosclérose. Une combinaison de ces deux mutations résulte en un effet additif qui augmente de 70 fois la fonction de la protéine PCSK9 *in vitro*.⁵²

Les hypercholestérolémies introduisent donc un risque accru de développer l'athérosclérose.

2.1.2. L'inflammation et le stress oxydatif

D'autres marqueurs sanguins sont aussi utilisés pour estimer le risque de MCV et de MCAS, en lien avec l'inflammation et le stress oxydatif.

Des études ont rapporté que les niveaux sanguins de la protéine C réactive (CRP), une protéine impliquée dans la réponse inflammatoire dû à sa participation dans l'activation du complément, sont fortement corrélés à une augmentation du risque de développer un IM.⁵⁶ La CRP est aussi un marqueur du risque cardiovasculaire chez des patients atteints d'angine de poitrine stable et instable.^{57,58}

De plus, une concentration plasmatique élevée d'homocystéine, un acide aminé produit lors d'une carence en vitamine B, est aussi associée à un plus grand risque de développer les MCAS.⁵⁹

Ainsi, on considère maintenant les marqueurs d'inflammation comme étant des compléments judicieux à considérer pour l'évaluation du risque de développer des maladies coronariennes sévères.

En ce qui a trait au stress oxydatif, son implication dans l'athérogénèse se manifeste par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La surproduction de ROS ou la suractivation des enzymes impliquées dans la production de ROS jouent un rôle critique dans l'initiation de la pathologie.⁶⁰ Ces

ROS peuvent être générées entre autres par la respiration mitochondriale, par la synthèse d'oxyde nitrique de l'endothélium (eNOS) ou par l'action de la NAD(P)H oxydase.⁶¹ L'expression et l'activité de cette dernière est augmentée en condition pathologique par de nombreux stimuli impliqués dans l'athérosclérose, soit l'hypercholestérolémie, un flux sanguin perturbé, l'étirement du vaisseau et/ou les cytokines inflammatoires.⁶¹ Ceci résulte en une production accrue des anions superoxydes, qui corrèle avec la sévérité de l'athérosclérose.⁶²

2.2. Apparition et développement de l'athérosclérose

La liste de facteurs de risque de l'athérosclérose est longue, mais un ou une combinaison des facteurs menant à une dyslipidémie va conduire à la formation de plaques athéromateuses sur les parois artérielles, une caractéristique essentielle de la maladie. Comme mentionné ci-haut, l'athérosclérose se développe sur une échelle temporelle assez longue. En conséquence, différents stades de la maladie ont été observés et permettent d'établir la progression et la sévérité de cette MCAS.

2.2.1. Dysfonction endothéliale

L'endothélium vasculaire est une couche cellulaire assurant d'ordinaire la protection des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales (EC) sont les régulateurs principaux de l'homéostasie vasculaire, interagissant d'un côté avec les différentes composantes du sang et les cellules composant les parois artérielles de l'autre côté.⁶³ Cette barrière sélective assure l'échange de molécules entre les tissus et le sang et régule le tonus vasculaire, en générant des facteurs tels que le NO.⁶³

Cependant, lorsqu'un dommage à l'endothélium se déclare, la perte de fonction des EC est le déclencheur central dans l'initiation de l'athérogénèse.⁶⁴ Celle-ci prend naissance habituellement aux embranchements vasculaires où le flux sanguin laminaire est perturbé (turbulent). Ce dysfonctionnement endothélial amène une cascade de réponses biologiques sur les nombreux paramètres que les EC régulent normalement.

Premièrement, le dommage fait aux EC freine la production de NO, un vasodilatateur des vaisseaux. Cette inhibition mène à une vasoconstriction ayant pour conséquence le ralentissement du débit sanguin à ce niveau et permettant aux cellules appropriées d'adhérer au site de la lésion afin d'entamer les processus de réparation. De plus, la diminution du NO rétroinhibe sa propre action sur l'endothélium.⁶⁴

L'endothélium peut donc exercer une de ses fonctions qui consiste à relâcher des cytokines et à stimuler l'expression des molécules d'adhésion à la surface cellulaire⁶⁵ afin de recruter des monocytes et des lymphocytes T. Les molécules d'adhésion exprimées par les EC activées sont celles impliquées dans le commencement d'une réponse inflammatoire telle que les sélectines plaquettaires (P-sélectine), les sélectines endothéliales (E-sélectine), les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) ainsi que les molécules d'adhésion cellulaire vasculaire - 1 (VCAM-1) qui ont pour rôle de reconnaître les leucocytes dans la circulation sanguine ralentie et d'initier le roulement des leucocytes à la surface endothéliale. La diapédèse est un processus qui permet l'infiltration des leucocytes entre deux EC, soit par les jonctions intercellulaires dissociées, et qui favorise l'entrée de ces leucocytes dans l'espace sous-endothélial du vaisseau endommagé.⁶⁶ (Figure 1 A, p. 16) Cette migration active le relâchement de cytokines tel que le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) et permet le recrutement de plusieurs autres leucocytes vers le site de la lésion. Or, ces cytokines sont des effecteurs qui perturbent la balance réduction-oxydation (redox) en favorisant l'oxydation. Le TNF- α et IL-1 β sont donc aussi des marqueurs du stress oxydatif. Ce stress oxydatif alimente de plus belle le dysfonctionnement de la couche endothéliale, puisqu'elle l'expose à des radicaux libres toxiques tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂⁻).

2.2.2. Formation des stries lipidiques

Un vaisseau sanguin est composé de trois couches.⁶⁷ Premièrement, il y a l'adventice, une couche externe faite de tissus conjonctifs contenant les vasa vasorum, des petits vaisseaux qui alimentent les parois vasculaires. Ensuite, on retrouve une couche moyenne, la média, qui est composée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques, qui modulent le tonus vasculaire. La dernière couche interne présente dans la structure d'un vaisseau sanguin est l'intima, qui est une membrane élastique faite d'une mince couche de tissus conjonctif et d'endothélium, qui forme une barrière de protection entre le sang et la paroi artérielle et qui assure aussi l'entrée de nutriments.⁶⁸ Les lésions athéromateuses débutent généralement dans l'intima⁶⁹ et affectent progressivement la paroi artérielle entière jusqu'à la média et l'adventice lorsqu'elles demeurent non traitées.

L'étape initiatrice du développement de cette MCAS est liée à l'entrée de particules LDL dans l'intima.⁷⁰ La formation de ROS est d'autant plus importante puisqu'elle est impliquée dans le prochain stade de l'athérosclérose en initiant la formation de lipoprotéines modifiées.

En condition normale, les lipoprotéines présentes dans la circulation sanguine plus particulièrement les particules LDL et HDL peuvent traverser la membrane endothéliale par la face luminale et pénétrer l'espace sous-intimal afin d'échanger avec les EC. Ceci fait, elles ressortent vers la lumière du vaisseau et poursuivent leur route dans la circulation sanguine.

En condition pathologique, les facteurs hémodynamiques changent et modifient la perméabilité de l'endothélium.⁷¹ Celle-ci est fortement corrélée avec la localisation ou le développement des plaques athéromateuses.⁷² En effet, cette perméabilité acquise de l'endothélium est associée à des jonctions étanches entre les EC. Ceci crée alors un différentiel de pression à travers la couche endothéliale⁷³ et favorise le transport de LDL par diffusion et/ou par formation de vésicules dans un processus de transcytose. Environ 90 % du transport des LDL se fait par diffusion et

environ 10 % se fait par transcytose.⁷⁴ L'infiltration de LDL se fait donc au travers d'une zone d'EC où le roulement cellulaire est augmenté.⁷⁴ Vu l'excès de cholestérol sanguin, cette diffusion est accentuée à l'interface entre le sang et la paroi artérielle. Le niveau d'entrée de particules LDL dans le segment de la paroi artérielle dépasse ainsi le taux d'évacuation.⁷⁵

Deux théories différentes sont proposées afin de décrire le déroulement des événements. La première, soit «la réponse à la lésion»⁷⁶ mène à la migration de monocytes au site lésionnel suivie de l'entrée des particules LDL dans l'espace sous-intimal. La deuxième théorie soit «la réponse à la rétention»⁷⁷ implique la migration des particules LDL entre les EC suivi de leur emprisonnement dans l'espace sous-intimal. Cette rétention promeut la formation d'agrégats associés à des molécules de protéoglycannes de la paroi des vaisseaux, stimulée par l'action de la sphingomyélinase, elle-même sécrétée par les cellules musculaires lisses.⁷⁸ La présence de ROS dans l'espace sous-intimal mène à des modifications sur les particules LDL dans les deux propositions. En effet, l'oxydation induite par le TNF- α et l'IL-1 β modifie les acides gras polyinsaturés composant la LDL, et altère sa charge de surface. Ces LDL oxydées (oxLDL) induisent par la suite l'activation des cellules endothéliales afin de maintenir le recrutement des cellules inflammatoires au site de la lésion.

De plus, les oxLDL induisent la sécrétion de protéines chimiotactiques tels que la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1) et le facteur de stimulation de colonies de macrophage (MCSF-1).⁷⁹ Le premier recrute des monocytes au site lésionnel et le deuxième permet à ceux-ci de se différencier en macrophages afin d'ingérer les particules LDL modifiées. Ces macrophages emmagasinent par endocytose le cholestérol extracellulaire par la reconnaissance des LDL oxydées par des récepteurs d'épuration présents sur la surface cellulaire des macrophages. Les récepteurs d'épuration de classe A (SR-A) et de classe B (CD36) voient leur expression augmentée par leur ligand.⁸⁰

Les SR-A possèdent 6 domaines structuraux et le cinquième domaine est celui qui est responsable de la liaison avec le ligand.⁸¹ La structure du récepteur CD36 diffère de celle des SR-A, puisqu'il possède deux domaines transmembranaires et plusieurs cystéines dans les parties N- et C-terminales du domaine cytoplasmique.⁸² Les deux classes de récepteurs d'épuration sont présentes sur les cellules hépatiques de Kupffer, sur les macrophages et les cellules spumeuses, mais seul le CD36 peut aussi se retrouver sur les cellules des tissus stéroïdogéniques.⁸²

Ce gorgement intracellulaire de cholestérol dans les macrophages se fait sous la forme de cholestérol estérifié (CE), vu la riche teneur en CE des particules LDL.⁷⁹ Le CE excédentaire forme des gouttelettes lipidiques dans les macrophages, soit dans un compartiment relié au RE. Ces vésicules de cholestérol changent morphologiquement les macrophages en cellules spumeuses. L'accumulation de ces cellules spumeuses dans la paroi artérielle occasionne la formation de stries lipidiques et un épaissement adaptatif de l'intima.⁸³ (Figure 1 B, p16)

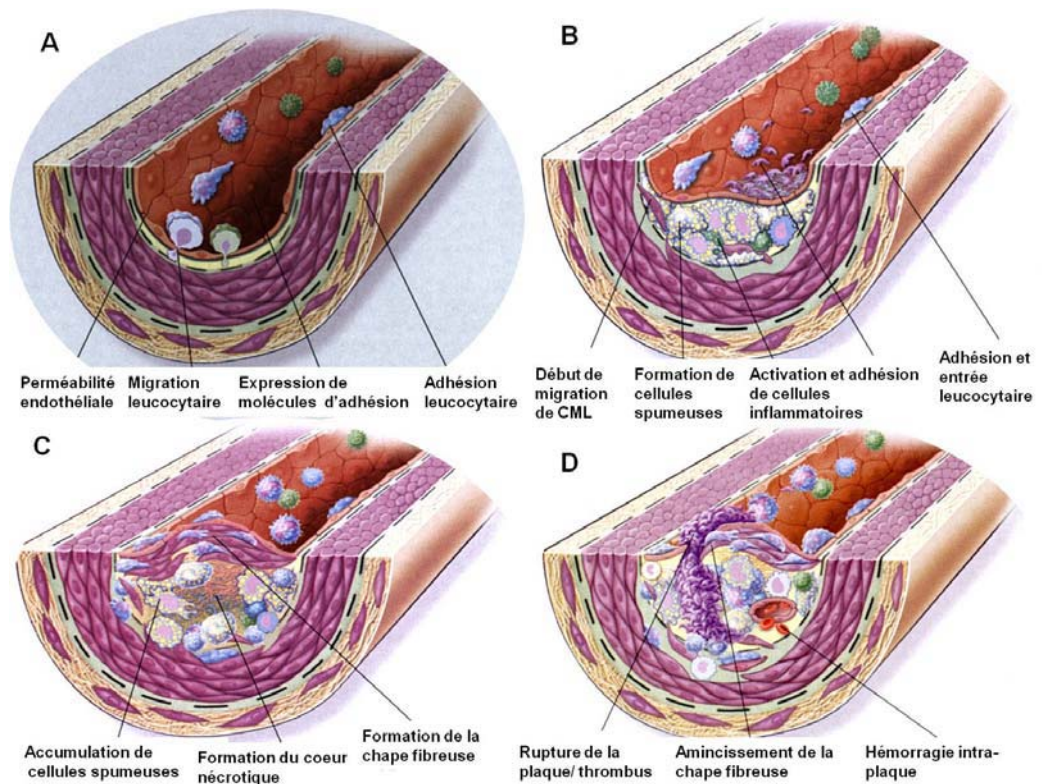


Figure 1: Les quatre phases du développement de l'athérosclérose.

Adapté de Ross, R. 1999⁸⁴

A : Dysfonction endothéliale, B : Formation de stries lipidiques, C : Lésion compliquée et D : Plaque instable

De plus, les oxLDL stimulent aussi les cellules musculaires lisses vasculaires en augmentant l'expression du récepteur de LDL oxydées de type lectine 1 (LOX-1), favorisant ainsi la captation de particules LDL modifiées qui contribuent à la formation de cellules spumeuses.⁸⁵ Ce récepteur fait partie des récepteurs d'épuration de classe E.⁸² Ce récepteur se retrouve aussi sur les EC vasculaires, sur les cellules musculaires lisses (SMC), sur les macrophages et peut lier les oxLDL mais aussi des cellules apoptotiques et des globules rouges âgés.⁸²

Néanmoins, la phase de stries lipidiques demeure toujours asymptotique. Cette phase est réversible^{85,86} mais si des processus pour freiner l'accumulation de

macrophages dans l'espace sous-intimal ne sont pas enclenchés, la progression des stries lipidiques peut engendrer des événements chroniques au cours des années.

2.2.3. La lésion compliquée

Une accumulation continue de LDL oxydées par les macrophages favorise la progression de la lésion athéromateuse. Si une alternative pour amoindrir l'accumulation de cholestérol n'est pas offerte, les macrophages continuent à emmagasiner du cholestérol de la façon déjà décrite jusqu'à l'atteinte de leurs limites intracellulaires. Cette entrée massive de cholestérol résulte en une accumulation du cholestérol sous une forme cristalline et occasionne l'initiation du processus de mort cellulaire.⁸⁷

À ce stade, un processus d'efférocytose, processus de phagocytose de cellules mortes par des macrophages voisins, déclenche des signaux anti-inflammatoires, soit la sécrétion de l'interleukine-10 (IL-10) et du facteur de croissance transformant β (TGF- β) qui inhibent la réponse de mort cellulaire des cellules spumeuses afin de préserver leur intégrité.⁸⁸ La surexpression de LOX-1 via les oxLDL stimule aussi la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires de la couche média vers l'intima.⁸⁹ Celles-ci permettent la formation d'une matrice extracellulaire constituée de collagène et de fibronectine, impliquée dans la fabrication d'une chape fibreuse.

Cette chape permet de stabiliser la progression des stries lipidiques, soit de contenir la prolifération cellulaire et l'accumulation de lipides faites par les macrophages. Elle se forme sur la zone riche en lipides mais aussi sous l'endothélium à l'interface du sang. Ceci caractérise la plaque athéromateuse naissante. Néanmoins, le noyau lipidique de la plaque accumule des macrophages spumeux et connaît un accroissement de son volume. Ceci déforme progressivement l'architecture normale de l'intima jusqu'à une éventuelle rupture complète. Dans un stade plus avancé, le noyau lipidique occupe plus de 30-50 % du volume de la paroi artérielle.⁸³ (Figure 1 C, p.16)

La plaque continuant à prendre de l'expansion amène sous peu la distorsion de la media et même de l'adventice du vaisseau. Le développement de la plaque par l'accumulation de CE dans le noyau lipidique, commence à obstruer la lumière du vaisseau, ce qui a pour conséquence de réduire l'apport sanguin à cette zone et met le vaisseau et le tissu environnant en condition d'ischémie. Ceci amène aussi une augmentation des forces de cisaillement sur la plaque et un affaiblissement de la chape fibreuse qui se veut une barrière physique entre le sang circulant et le noyau lipidique.

La pression créée par le sang, vu le flot sanguin inchangé et l'étranglement du vaisseau, engendre l'écroulement des processus de protection et se manifeste par la diminution d'efférocytose et de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires. En effet, le processus de nécrose cellulaire dans le noyau lipidique prend de l'expansion.⁷⁶

2.2.4. La plaque instable

Le passage d'une lésion compliquée à une plaque instable se fait par le début de dégradation de la chape protectrice par des enzymes de la famille des métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui sont produites par les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires sous l'influence de cytokines comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-18.⁹⁰ Ce stade est donc caractérisé par l'amincissement de la chape fibreuse.

Une déstabilisation de la plaque est alors observée, induite par la création de fissures, de failles dans la chape fibreuse et au déclenchement de l'inhibition de la production de tissu conjonctif par les cellules musculaires lisses vasculaires. Les fissures ou ruptures se situent généralement aux extrémités de la plaque. Les fissures d'abrasion sur la surface de la chape atrophiée et/ou le contact du noyau lipidique nécrotique avec les composantes pro-thrombotiques du sang, favorisent la formation d'un thrombus qui peut bloquer complètement la lumière du vaisseau.⁶⁵ (Figure 1 D, p.16) L'obstruction totale et soudaine du vaisseau mène donc à des

événements cardiovasculaires connus tels que les ACV ou aux infarctus du myocarde (IM) dans le cœur. En plus d'observer l'amincissement de la chape fibreuse comme un facteur rendant la plaque instable, l'expansion du noyau lipidique nécrotique est aussi un autre facteur impliqué dans l'instabilité de la plaque. En effet, le noyau lipidique, qui occupait moins du quart de la plaque, occupe maintenant le tiers jusqu'à la moitié du volume total.⁹¹ Cette expansion fait appel à une plus grande infiltration de cellules inflammatoires en promouvant la néo-vascularisation dans la plaque.⁹² Cette formation de nouveaux vaisseaux prend naissance au niveau de l'adventice et se rend jusqu'à l'intima par les fissures créées lors de la formation initiale du noyau lipidique.⁹² Ces nouveaux vaisseaux contribuent de manière significative à des hémorragies intra-plaques, vu leur forme prématurée et leur nature étanche.⁹² Leur étanchéité permet l'extravasation d'érythrocytes dans la plaque qui peut aussi contribuer à l'accroissement du noyau lipidique grâce à leur membrane riche en CL et en PL. Cette dernière possède un contenu en cholestérol qui excède les membranes des autres types de cellules dans le corps humain. En effet, ce contenu en cholestérol membranaire correspond à 40% du poids d'un globule rouge.⁹³ La présence d'érythrocytes dans la plaque contribue donc aussi à l'accumulation extracellulaire du CL dans la plaque instable. En somme, l'inflammation, la néo-vascularisation, la présence d'hémorragies intra-plaques ainsi que l'expansion du noyau lipidique sont tous des éléments associés à l'instabilité de la plaque.⁹⁴

Après la présentation des différents facteurs de risques ainsi que leur implication dans les différentes étapes de la maladie, un regard plus spécifique sera porté sur les macrophages présents dans la plaque athéromateuse. Une vision mécanistique des différentes voies d'entrée, d'entreposage et les conséquences du surplus de cholestérol intracellulaire dans les cellules spumeuses est abordée.

2.3. Voies d'entrées et stockage du cholestérol chez les macrophages

Tel que mentionné brièvement dans la description des étapes menant au développement de la plaque athéromateuse, la captation de particules LDL modifiées est prise en charge principalement par deux récepteurs d'épuration soit le SR-A et le CD36.

Les promoteurs géniques de ces deux récepteurs d'épuration ne contiennent pas d'éléments de réponse aux stérols comme le rLDL, ce qui les empêche de subir une régulation à la baisse en cas d'excès de cholestérol.⁹⁵ Ces deux récepteurs reconnaissent les oxLDL ainsi que les cellules apoptotiques. Cependant, la reconnaissance et la liaison diffèrent pour les deux récepteurs.

En effet, le récepteur SR-A reconnaît et se lie à la portion apolipoprotéine de la lipoprotéine oxydée⁹⁶ tandis que le récepteur CD36 lie la fraction lipide de la particule oxLDL.⁹⁷ Or, l'implication synergique des deux récepteurs dans la séquestration de particules oxLDL est responsable de 75 % à 90 % de l'internalisation et la dégradation de ces particules dans les cellules spumeuses.⁹⁸

L'implication du récepteur CD36 est plus importante que celle apportée par le SR-A.⁹⁹ En effet, on observe que les macrophages gorgés de lipides présents dans la lésion athéromateuse humaine manifestent plus fortement un niveau d'immunoréactivité avec le récepteur CD36 et un niveau faible à modéré avec le récepteur SR-A¹⁰⁰, ce qui illustre une prédominance de la captation des oxLDL par le CD36. L'endocytose des particules LDL modifiées induit un changement dans l'expression transcriptionnelle et traductionnelle du récepteur CD36. L'effet des oxLDL a été étudié dans des macrophages de souris, les J774, et une exposition de ces particules pro-athérogéniques a augmenté de 4 à 8 fois l'expression de l'ARN messager (ARNm) et a été accompagnée d'une hausse du niveau d'expression de la protéine CD36.¹⁰¹ Or, le processus de formation de cellules spumeuses alimente un cycle continu où les LDL modifiées induisent leur propre captation. Toutefois,

dans des macrophages humains, l'augmentation de l'expression de CD36 n'est pas observée.¹⁰²

Par ailleurs, l'endocytose des particules oxLDL amène aussi à l'internalisation des particules activatrices de la voie des facteurs de transcription hormonaux nucléaires, soit les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes, de type gamma (PPAR γ). Deux activateurs, soient deux dérivés oxydés de l'acide linoléique, les acides 9- et 13-hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE) et (13-HODE) se lient sur les récepteurs PPAR γ afin de stimuler l'expression de CD36.⁹⁸ Ils stimulent aussi la voie impliquant le transporteur ABCA1 via l'expression de facteurs de transcription du type récepteur nucléaire des oxystérols (LXR).

Néanmoins, l'accumulation de CE pour la formation de macrophages spumeux peut être compensée par l'implication d'autres récepteurs d'épuration en absence de SR-A et CD-36. Dans une étude où l'activité de SR-A et CD36 est perdue, le groupe de Freeman a démontré, dans des modèles de souris athérosclérotiques apoE^{-/-}, aucune diminution dans la taille de la lésion athéromateuse et surtout la présence de formation de cellules spumeuses en dépit des mutations pour les récepteurs d'épuration.¹⁰³ Une adaptation compensatoire des récepteurs d'épuration pour la phosphatidylsérine et les oxLDL couplés à un ligand de cytokine 16 (SR-PSOX/CXCL16), un récepteur d'épuration de la classe G qui est modulé par la voie du TNF- α ¹⁰⁴, et des récepteurs LOX-1 expliquent donc la formation de cellules spumeuses en dépit de l'absence de SR-A et CD36.¹⁰⁵

De plus, d'autres voies indépendantes des récepteurs d'épuration ont déjà été abordées pour expliquer la formation de cellules spumeuses. La formation de cellules spumeuses peut être induite par des agrégats de LDL au site lésionnel,¹⁰⁶ par des particules telles que les LDL modifiées par la phospholipase A2 sécrétée (sPLA2) présente lors de la réponse inflammatoire, les résidus de chylomicrons (rCM) et les vésicules dérivées des plaquettes.¹⁰⁷

Par ailleurs, un autre processus indépendant des récepteurs d'épuration, la macropinocytose, contribue aussi à la formation de cellules spumeuses.¹⁰⁸ Ce processus se définit par une internalisation d'une grande zone de la membrane plasmique accompagnée d'une quantité significative de liquide contenant des particules LDL.¹⁰⁹ Ce processus pourrait s'avérer important, surtout en présence d'une concentration croissante de LDL au site de lésion.

En outre, une voie indépendante des particules LDL mais dépendante des stimuli pro-inflammatoires peut mener à la formation de cellules spumeuses. Les membres d'une famille de récepteurs de l'immunité innée, soit les récepteurs Toll-like (TLR), qui servent à initier des réponses inflammatoires face à des signaux de danger (microbes, bactéries), peuvent initier l'accumulation de lipides dans les macrophages.¹¹⁰ Deux mécanismes possibles sont proposés. Le premier implique une diminution de l'efflux dépendant de la voie des LXR, ce qui favoriserait l'entreposage de CE dans des gouttelettes lipidiques. Le deuxième implique les TG du macrophage qui seraient régulés à la hausse par les voies de signalisation cellulaire des TLR et des PPAR γ .¹¹⁰

En condition normale, l'équilibre en cholestérol des membranes plasmiques est maintenu par des complexes de CL et de phospholipides (PL) tels que la sphingomyéline, la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine. En cas d'excès de cholestérol membranaire, une présence de CL, dit actif et mobile, vient déstabiliser un seuil de cholestérol prédéterminé par la membrane.¹¹¹ Pour tenter d'équilibrer cette augmentation, des transporteurs non-vésiculaires cytoplasmiques tels que des protéines stéroïdogéniques régulatrices aiguës reliées au transfert/livraison de lipides (START/STARD) permettent le transfert de CL vers les membranes intracellulaires du RE et les mitochondries.¹¹² La voie menant vers les mitochondries favorise la production d'oxystérols qui vont diminuer les voies de synthèse ou d'endocytose du cholestérol et augmenter les voies LXR.

L'autre voie menant vers le RE permet l'estérification du cholestérol et la séquestration du facteur de transcription de l'élément de réponse régulateur protéique des stérols (SREBP) par une protéine d'activation de clivage de SREBP (SCAP).¹¹³ SCAP couplé au cholestérol empêche ce facteur de transcription de stimuler les gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol et dans l'ingestion de cholestérol (endocytose de LDL). Une méthode d'adaptation cellulaire peut être amorcée par le signal intracellulaire que constitue le CL actif et mobile détecté au RE.

Par conséquent, une augmentation de la biosynthèse des PL cellulaires¹¹⁴ est entamée afin de minimiser le CL actif et mobile, recréant ainsi des complexes CL-PL et rétablissant le seuil normal de la membrane plasmique. De plus, une stimulation de la désaturation des groupements acyle des acides gras par une désaturase stéaroyl-CoA1 (SCD1)¹¹⁵ est aussi une méthode adaptative contre l'excès de cholestérol membranaire. La désaturation des acides gras permet à ceux-ci d'être utilisés comme substrats pour l'estérification du cholestérol au RE.¹¹⁶

En condition pathologique, l'internalisation des particules LDL modifiées enclenche de nouveau le processus de stockage face à ce déséquilibre. Les endosomes précoces contenant les particules de LDL modifiées captées lors de l'endocytose s'acidifient en se fusionnant avec des lysosomes pour permettre à la partie protéique de la lipoprotéine d'être dégradée en acides aminés par des protéases (les cathepsine D)¹¹⁷ tandis que la partie lipidique, riche en cholestérol estérifié subit une hydrolyse par les enzymes lysosomiales en condition acide soit l'hydrolase acide d'esters de cholestérol (ACEH), aussi appelée lipase acide lysosomiale (LAL).¹¹⁸

L'hydrolyse enlève le groupement acyle du CE et donne comme produit du CL et des acides gras.⁹⁵ Le CL peut emprunter différentes voies à sa sortie des endosomes et lysosomes. Le CL peut voyager par l'entremise de START/STARD dans la voie menant à la sortie du cholestérol vers des accepteurs de cholestérol plasmatiques, processus nommé l'efflux, (voie 1) ou peut être envoyé vers le RE

(voie 2) afin d'être estérifié par une transférase ancrée dans la membrane, soit l'acyl-coA: cholestérol acyltransférase de type 1 (ACAT-1) qui transfère un groupement acyle (un acide gras) sur le FC, donnant comme produit une molécule de CE. Cette estérification du cholestérol permet au cholestérol d'adopter une forme cellulaire non-toxique et de maintenir la concentration adéquate de CL membranaire.¹¹⁹ Cette estérification dans le RE permet la formation de gouttelettes lipidiques, caractéristique propre des cellules spumeuses, une réserve de cholestérol estérifié récupérable selon les besoins cellulaires. (Figure 2, p.24)

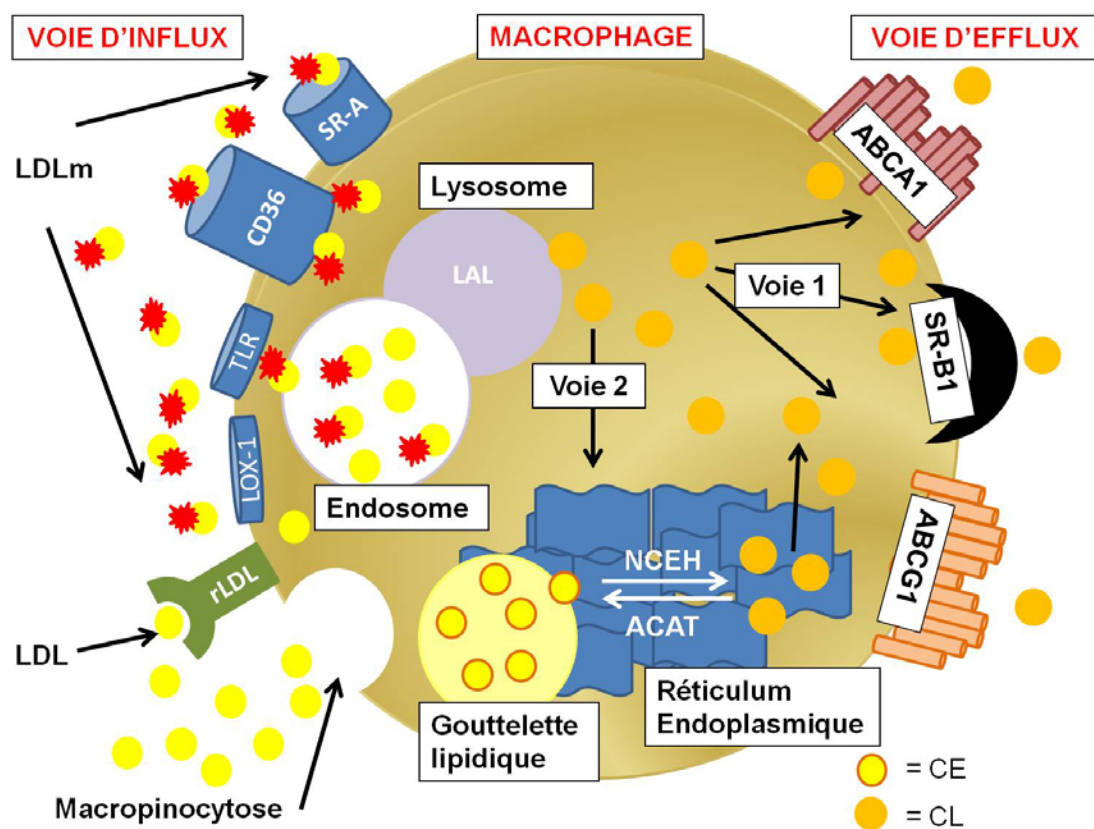


Figure 2 : Voies d'entrée, voie de stockage et voies de sortie du cholestérol dans le macrophage spumeux.

La gouttelette lipidique émerge de la bicouche lipidique du RE comme une lentille de lipides neutres qui bourgeonne vers la face cytoplasmique afin de prendre naissance dans le cytoplasme.¹²⁰ Une gouttelette lipidique est un organe fonctionnel et dynamique, composé d'un noyau lipidique comportant des lipides neutres (CE, TG), recouvert d'une monocouche de PL, de CL et de protéines

spécifiques, plus précisément des protéines de la famille PAT.¹²¹ Les acides gras générés par l'hydrolyse en condition acide y sont aussi entreposés.⁹⁵ Les protéines qui composent la famille PAT chez l'humain sont la périlipine 1, l'adipophiline (périlipine 2) et la «*Tail-interacting protein of 47 kDa*» (TIP47) ou périlipine 3.¹²¹ Les gouttelettes lipidiques sont dites dynamiques puisqu'elles subissent un cycle continu d'hydrolyse du CE et de réestérification du CL, en étant alternativement soumises à l'action d'une hydrolase neutre d'ester de cholestérol, (NCEH) qui est attachée à la membrane du RE et qui désestérifie le CE en CL, puis à l'action de l'ACAT-1 qui réestérifie le CL en CE.⁴⁹ Cette hydrolyse peut aussi être menée par la carboxylestérase 1 (CES1) ou bien la KIAA1363 (maintenant appelée NCEH1), qui sont des hydrolases présentes chez l'humain.

La voie qui permet d'acheminer le CL vers la membrane cellulaire depuis les gouttelettes lipidiques est peu connue. Ce cycle permet malgré tout d'assurer la disponibilité du cholestérol par le RE tant pour la fabrication des structures cellulaires telles les membranes tant pour la mobilisation du CL pour l'efflux, si nécessaire.^{122,123} De plus, lorsqu'il est nécessaire de mobiliser du CL pour balancer l'entrée importante de CE dans la cellule, l'hydrolyse du CE dans les gouttelettes lipidiques se fait aussi par l'entremise de la même hydrolase, la LAL mentionnée précédemment et présente dans les lysosomes.¹²⁴

Ce processus d'hydrolyse est entamé par une voie de transport nommée l'autophagie, qui distribue des constituants cytoplasmiques comme les gouttelettes lipidiques à des compartiments lytiques comme les lysosomes.¹²⁵ Le processus débute par la formation d'une nouvelle vésicule nommée autophagosome qui s'accapare des gouttelettes lipidiques afin de fusionner avec les éléments lytiques, les lysosomes. Les gouttelettes sont par la suite relâchées dans les lysosomes où l'action de la LAL (ou ACEH) agit afin de générer du CL pour l'efflux en cas d'accumulation de CL présents lors des lésions compliquées.¹²⁶ Le mouvement du CL peut suivre la voie de l'efflux permettant la sortie du CL à partir du compartiment endosomal/lysosomal tardif vers des protéines Niemann-Pick de type

C 1 et 2 (NPC 1 et 2), qui sont impliquées dans le trafic intracellulaire du CL de la lumière du lysosome vers la membrane cellulaire, ce qui occasionne un efflux de CL par le transporteur ABCA1. Ce transporteur peut acquérir le CL en faisant la navette de la surface membranaire vers le compartiment endosomal tardif¹²⁷, puis retourner vers la surface cellulaire à partir d'un compartiment de recyclage intracellulaire.¹²⁸ L'autre voie renvoie le CL vers le ER pour être ré-estérifié.¹²⁵

2.3.1. Conséquences du surplus de cholestérol intracellulaire pour la fonction des macrophages.

Malgré les stratégies d'adaptation cellulaires utilisées par les cellules spumeuses, soit l'entreposage sous forme de CE ou soit la sortie du CL, l'entrée persistante de cholestérol associée aux lipoprotéines modifiées surcharge les processus homéostatiques qui tentent de réguler les niveaux intracellulaires de cholestérol. En effet, l'apport croissant de cholestérol à la cellule court-circuite à différents niveaux les processus visant à atténuer les niveaux anormaux de cholestérol.

Le premier niveau affecté et le plus critique est celui de la machinerie lysosomiale. Plus la progression de la plaque athéromateuse se déploie, plus une quantité résiduelle de cholestérol s'accumule dans les lysosomes des cellules spumeuses. Près de 80 % de l'excès de CL est retrouvé dans cet organe.¹²⁹ L'une des explications de cet excès dans les lysosomes est la vitesse de livraison de cholestérol.¹³⁰ Lors d'une entrée trop rapide et précipitée du cholestérol dans la cellule, l'efficacité de la machinerie lysosomiale est diminuée. Une augmentation de l'entreposage dans les lysosomes indique alors une inhibition de l'hydrolyse et la clairance du CL, créant ainsi un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire.¹³¹

Cette inhibition de la fonction des lysosomes mène à l'induction de plusieurs signaux intracellulaires tels l'inhibition de l'ATPase vacuolaire (v-ATPase) dans la membrane lysosomiale et la perméabilité de celle-ci. En effet, une accumulation de CL inactive la pompe v-ATPase qui est responsable de l'entrée des ions H⁺ dans la

lumière des lysosomes afin de maintenir l'environnement acide nécessaire pour l'action lytique des lysosomes. Cette inhibition est causée par une perte des ions H^+ , causée entre autres par la perméabilité de membrane, ce qui augmente le pH à des niveaux supérieurs du champ fonctionnel de LAL.¹³² Ce pH élevé empêche l'action de la LAL et compromet l'hydrolyse des CE, résultant en un engorgement de CE dans le compartiment lysosomal. La perméabilité de la membrane causée par l'accumulation de CL est augmentée par l'oxydation accrue du cholestérol en phase avancée des lésions athéromateuses.¹¹⁹ Cette surcharge de CE dans le compartiment lysosomal amène un degré de toxicité cellulaire important, conduisant à la voie de l'apoptose.

De plus, la dysfonction lysosomiale due à la haute concentration de CL membranaire peut avoir des conséquences indirectes sur le trafic intracellulaire du cholestérol vers les autres localisations nécessitant du CL. En effet, non seulement le réacheminement du CL vers la membrane plasmique mais aussi vers le RE est fortement compromis.¹³³ Par ce biais, l'autre site d'entreposage situé au RE, est lui aussi affecté. Vu la diminution de l'apport de CL vers les gouttelettes lipidiques, le cycle d'estérification de CL est compromis.

En effet, une éventuelle défaillance du processus d'estérification par l'ACAT-1 est observée et mène à une diminution de CE, ce qui conduit à un niveau massif de CL qui en retour déclenche une réponse de stress dans la RE.^{49,119}

De plus, cette augmentation de CL mène aussi à la création de dérivés du cholestérol nocifs par l'entremise des ROS, soit des oxystérols dont le 7-cétocholestérol. L'accumulation du CL et du 7-cétocholestérol s'avère suffisante afin d'induire une réponse de stress du RE et d'amorcer un processus d'apoptose.¹³⁴

Une réponse de stress du RE est caractérisée comme étant une perturbation transitoire ou prolongée des fonctions reliées au RE, soit la synthèse protéique, la régulation du métabolisme du calcium et le potentiel redox intracellulaire.¹³⁵ Ce

type de perturbations agit sur les protéines senseurs qui assurent d'ordinaire le processus de la survie cellulaire. Ces protéines du RE sont IRE1, PERK et ATF6, qui lorsqu'activés par l'accumulation de CL et/ou la présence de 7-cétocholestérol, induisent une voie de protection cellulaire, la réponse cellulaire aux protéines dépliées (UPR).¹³⁶

Les éléments perturbateurs induisant un stress au RE sont parfois insuffisants pour déclencher des réactions apoptotiques massives. Or, l'implication du *pattern recognition receptor family* (PRR), qui fait appel à l'identification de ligands (OxLDL, lipopolysaccharides (LPS)) par les récepteurs d'épuration SR-A et CD36 et les récepteurs TLR4 et TLR6 alimentent de plus belle le stress au niveau du RE.¹³⁷ Le stress prolongé du RE, initié par la toxicité cellulaire du CL, va causer une inhibition de la voie de survie cellulaire et mener à l'initiation de l'apoptose.

Pendant un stress chronique du RE, IRE1 peut s'auto-phosphoryler afin d'activer en aval la voie de JNK et la famille pro-apoptotique des protéines BCL-2. Cette activation permet le relâchement du cytochrome C dans la chaîne respiratoire des mitochondries cellulaires, induisant la cascade de la voie des caspases pour induire l'apoptose.¹³⁸ (Figure 3, p.29)

Mais la voie de signalisation la plus importante dans l'induction de l'apoptose est celle associée au senseur de la voie UPR, PERK. En effet, PERK active de manière prédominante la voie d'apoptose menée par la protéine homologue de CEBP (CHOP). La voie de CHOP induit simultanément l'activation de la famille pro-apoptotique des protéines BCL-2 et initie le relâchement cytoplasmique du calcium stocké dans le RE, par le rIP3.⁸⁰ Ce relâchement du calcium induit une rigidité à la membrane et est capté par la kinase calcium/calmoduline dépendante de type II (CaMKII), qui va par son activation, induire la voie du récepteur de mort cellulaire Fas et mener à l'activation de la NADPH oxydase, enzyme impliquée dans la production de ROS.¹³⁹ Ces voies de signalisation cellulaires vont enclencher la programmation de mort cellulaire de manière dépendante et indépendante des

mitochondries et participer à la formation du noyau lipidique nécrosé dans la plaque instable. (Figure 3, p.29)

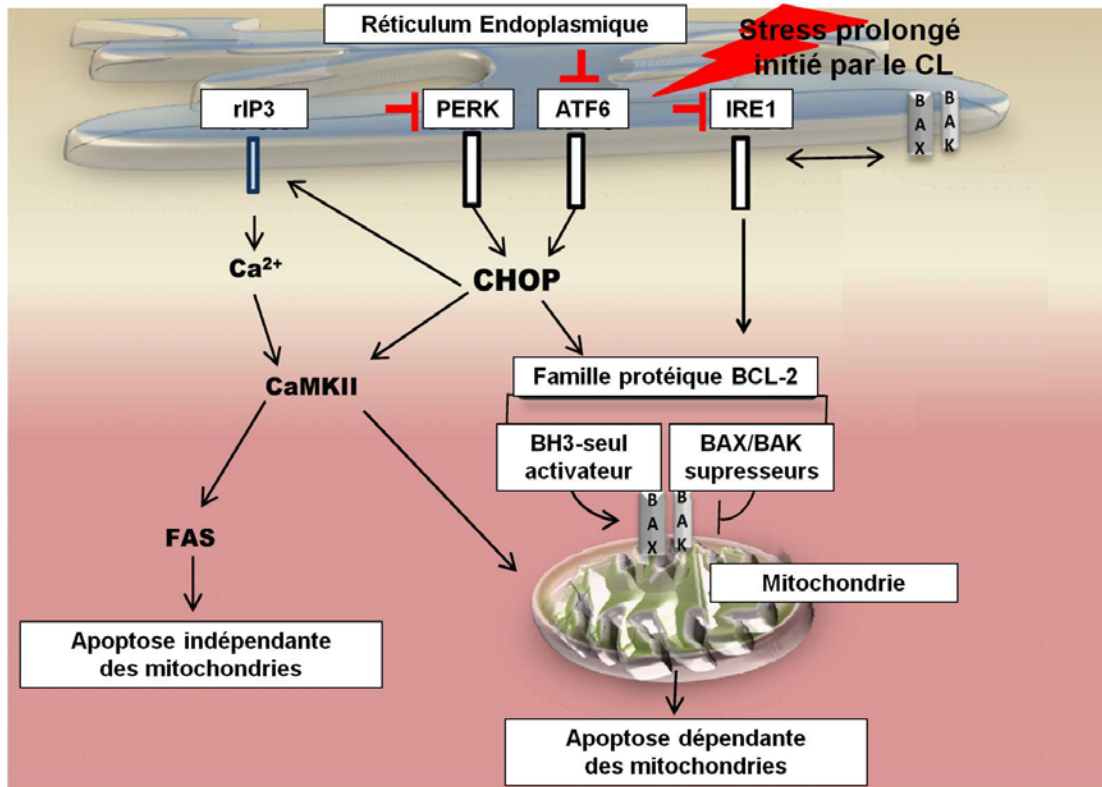


Figure 3: Les voies d'activation de l'apoptose dans le macrophage spumeux.
Adapté de Scull, CM. 2011¹⁴⁰

2.4. Les mécanismes de protection

2.4.1. Les voies d'efflux au niveau des macrophages

Le macrophage présent dans la plaque athéromateuse peut suivre deux voies possibles afin de lutter contre la toxicité créée par l'accumulation de CL en condition pathologique, soit en emmagasinant du cholestérol sous forme estérifiée dans des compartiments ou en éliminant du CL par des accepteurs de cholestérol plasmatique. La plupart des tissus et des cellules du corps à l'exception des organes stéroïdogènes sont incapables de transformer le cholestérol et s'en libèrent par la production d'oxystérols, une forme de cholestérol qui est plus soluble, et la sortie de cholestérol (efflux) vers des accepteurs dans le sang.¹⁴¹ Ces mécanismes de

protection empêchent donc contre la progression de l'athérosclérose. Le taux d'efflux de cholestérol cellulaire est principalement dépendant des trois paramètres suivants : du niveau de cholestérol de la cellule, du niveau d'expression des transporteurs membranaires de cholestérol et de la composition et concentration d'accepteurs de cholestérol se trouvant dans la circulation sanguine.¹⁴¹ De plus, la participation de certains facteurs modulant la mobilisation du cholestérol intracellulaire vers la membrane plasmique tels que mentionné précédemment (l'action de NCEH et ACAT dans le cycle continuels d'estérification/hydrolyse du cholestérol, le transport par les protéines NPC1 et NPC2 et START/STARD) contribue aussi à cette sortie du cholestérol cellulaire.

Le processus d'efflux se fait indépendamment d'une surcharge en cholestérol du macrophage, cependant lorsque celui-ci est en excès les voies de sortie du cholestérol sont augmentées. La sortie de cholestérol au niveau du macrophage peut emprunter différentes avenues soit un transport du cholestérol via une diffusion aqueuse (passive), une diffusion facilitée ou par un transport actif impliquant des transporteurs membranaires.

La diffusion passive implique une désorption (détachement de la molécule de cholestérol de la membrane cellulaire) selon un gradient de concentration vers un environnement aqueux, soit vers le plasma puis vers des protéines plasmatiques telles que l'albumine pour être ensuite transféré à un accepteur de cholestérol contenant des PL.¹⁴² Ce genre d'efflux ne nécessite pas d'énergie métabolique et agit selon le contenu de cholestérol cellulaire. Cet efflux est plutôt influencé par la composition structurelle et lipidique de la membrane et par les propriétés de l'accepteur plasmatique (taille, concentration, composition lipidique).¹⁴³ Cependant, cette voie d'efflux est lente et inefficace pour apporter seule une protection cellulaire. La diffusion facilitée consiste en une approche plus soutenue de l'efflux de cholestérol. Elle fait appel à un récepteur d'épuration de classe B de type 1 (SR-B1), exprimé sur le macrophage, qui permet un échange bidirectionnel de CL entre celui-ci et l'accepteur plasmatique. Cet échange se fait, lui aussi, dans une direction

nette dictée par le gradient de concentration.¹⁴⁴ Le SR-BI interagit avec des ligands tels que les oxLDL, les LDL natives, des lipoprotéines de haute densité (HDL) et l'apoA-I selon différentes affinités, mais échange le CL uniquement avec les accepteurs de cholestérol contenant des PL.¹⁴⁵ Pour ce faire, un alignement précis doit se faire entre la molécule acceptrice et la cellule donneuse, formant un complexe productif et assurant un efflux de CL efficace.¹⁴⁶ De plus, le SR-BI assure aussi un flux de CE à partir des HDL et LDL dans un mouvement unidirectionnel, favorisant une entrée de cholestérol cellulaire, sans l'implication d'une endocytose entière de la particule.¹⁴⁷ Cependant dans les macrophages spumeux, son implication est considérablement diminuée puisque son expression protéique est diminuée.¹⁴⁸

En ce qui a trait à un transport actif du cholestérol, une famille de transporteurs membranaires est impliquée dans la modulation de l'efflux de cholestérol. Les membres de la famille des transporteurs à cassette liant l'adénosine triphosphate (ATP) (transporteurs ABC) sont en effet des protéines membranaires intégrales qui effectuent la translocation de diverses molécules d'un feuillet à l'autre de la membrane cellulaire, contre le gradient de concentration.¹⁴⁹ Ceci requiert donc de l'énergie fournie par une réaction d'hydrolyse de l'ATP cellulaire.¹⁵⁰ La structure des transporteurs ABC consiste généralement en deux domaines hydrophiles de liaison aux nucléotides (NBD) cytoplasmiques (qui permettent la liaison et l'hydrolyse de l'ATP) ainsi que de deux domaines hydrophobes contenant 6 domaines transmembranaires (TMD) ou hélices α .¹⁵¹ Deux transporteurs ABC de classes différentes contribuent à la sortie de cholestérol des cellules spumeuses en condition pathologique soit le transporteur ABC de classe A de type 1 (ABCA1) et le transporteur ABC de classe G de type 1 (ABCG1). ABCA1 possède le profil structural exact des transporteurs ABC tandis qu'ABCG1 possède la moitié du profil structural soit un NBD cytoplasmique et un domaine hydrophobe contenant 6 hélices α .¹⁵¹

ABCA1 est une protéine d'environ 220 kDa qui est exprimée dans plusieurs types cellulaires comme les macrophages, les cellules hépatiques et les entérocytes. Son abondance dans le macrophage est finement contrôlée par les niveaux intracellulaires de cholestérol.¹⁵² Sa présence est notée aussi bien sur la membrane plasmique que sur les membranes des vésicules intracellulaires.¹⁵³ De plus, son expression protéique dans le macrophage spumeux est augmentée suite à l'internalisation des LDL modifiées et est diminuée lorsque débute le processus de déplétion de cholestérol membranaire par les accepteurs plasmatiques.¹⁵²

Son implication dans le métabolisme des lipides a été démontrée lors de la découverte de différentes mutations géniques à l'état homozygote dans certaines familles américaines (maladie de Tangier, du nom de l'île où habitent les personnes atteintes). Un transporteur muté résulte en une diminution des niveaux de HDL-cholestérol (HDL-C)¹⁵⁴ et en une accumulation de CE dans les gouttelettes lipidiques des macrophages dans plusieurs organes.¹⁵³

ABCA1 effectue un transport unidirectionnel de PL et de CL à partir de la membrane plasmique vers des particules pauvres en lipides telles que l'apolipoprotéine A-I (apoA-I), une apolipoprotéine qui constitue majoritairement les HDL, afin de produire une forme naissante des HDL, soit la pré- β -HDL. Ceci est considéré comme l'étape initiale de la biogénèse des HDL.¹⁵⁵ Ce transfert se fait en deux étapes consécutives. Premièrement, ABCA1 agit en retournant les PL membranaires (phosphatidylcholine (PC) et phosphatidylserine (PS)) vers le feuillet externe de la membrane bicouche plasmique, une activité de « flippase ». En présence de d'apoA-I, ces PL subissent l'efflux, c'est-à-dire qu'ils se détachent de la membrane pour s'attacher sur l'accepteur apoA-I. S'ensuit un efflux de cholestérol vers ce complexe nouvellement formé d'apoA-I et de PL.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ L'interaction entre l'apoA-I et les PL de la membrane plasmique repose sur les propriétés physico-chimiques de l'apoA-I, typiques des apolipoprotéines.¹⁵⁹ En effet, l'apoA-I se caractérise par une structure comportant des répétitions d'hélices α amphipatiques qui possèdent une haute affinité pour les lipides.¹⁵⁹ Or,

l'environnement lipidique (domaines riches en PL et CL) à l'interface de la membrane plasmique promeut la liaison de ces hélices α avec la surface cellulaire afin d'initier le transfert de PL. Aucune évidence d'une interaction moléculaire entre l'apoA-I et le transporteur ABCA1 n'est à ce jour rapportée.^{160,161} Cependant, certaines précisions ont récemment été émises quant au déroulement initial de la lipodation de l'apoA-I.

En effet, un site à haute capacité de liaison (HCBS) pour l'apoA-I a été identifié dans la membrane plasmique comme étant un site riche en phosphatidylcholine, dont la présence dépend d'ABCA1 et qui permet une interaction 10 fois plus importante de l'apoA-I comparée à l'interaction directe sur le transporteur ABCA1.¹⁶² Le modèle de lipodation de l'apoA-I serait comme suit : l'activité translocatrice d'ABCA1 vers le feuillet externe de la membrane permet le transfert des PL à l'apoA-I. Ceci initie une hétérogénéité dans la membrane plasmique qui inclut un HCBS évaginé ou protubérant dépourvu d'ABCA1 et un site à basse capacité de liaison (LCBS) dû à ABCA1. L'interaction entre ABCA1 et l'apoA-I facilite la liaison de cette dernière avec la protusion membranaire qui possède une affinité élevée pour celle-ci. L'apoA-I peut donc acquérir plus efficacement des PL, surtout de la phosphatidylcholine, permettant de former un complexe efficace pour le transfert de cholestérol. La désorption membranaire de PC enclenche la voie d'adaptation de la biosynthèse de PL énoncée antérieurement afin de ré-équilibrer la composition lipidique de la membrane (ratio CL/PL) et de régénérer les HCBS.¹⁶² L'apoA-I requiert donc avant tout un transporteur ABCA1 possédant une activité de translocase fonctionnelle afin d'acquérir des lipides et de contribuer à la biogenèse des HDL, qui sera décrite ultérieurement.¹⁵⁵

Le transporteur ABCG1 est une protéine ayant un poids moléculaire de 75 kDa. Ce transporteur protège aussi contre l'accumulation excessive de CL dans les macrophages spumeux et prévient le développement de plaques athéromateuses.¹⁴⁹ En effet, des études *in vitro* à partir de macrophages dérivés de moelle osseuse déficiente en ABCG1 ont démontré une baisse significative de l'efflux vers des

HDL lorsque comparé avec des macrophages exprimant l'ABCG1.¹⁶³ De même, selon une étude *in vivo* chez des souris au rLDL^{-/-}, qui ont subi une transplantation de moelle osseuse provenant de souris où les gènes de l'ABCG1 et l'apoE étaient doublement invalidés, des macrophages déficients en ABCG1 ont démontré une augmentation de lésions athéromateuses comparativement aux souris exprimant ABCG1.¹⁶⁴

L'expression d'ABCG1 est modulée à la hausse en présence de LDL modifiées dans les cellules spumeuses.¹⁶⁵ ABCG1 se retrouve essentiellement sur les mêmes types cellulaires qu'ABCA1. Cependant, sa localisation cellulaire est principalement dans les fractions intracellulaires, mais une translocation vers la surface cellulaire est occasionnée par le gorgement cellulaire de cholestérol, ce qui augmente sa capacité de promouvoir l'efflux de cholestérol.^{149,166} Son rôle permet donc un enrichissement de la membrane plasmique en CL, celui-ci pouvant être incorporé dans une variété d'accepteurs de cholestérol.¹⁶⁷ Une augmentation de 6-12 % du CL est notée dans les réservoirs de CL membranaires suite à une stimulation d'ABCG1.¹⁶⁸ De plus, l'activité d'ABCG1 ne semble pas uniquement se limiter au transport intracellulaire du cholestérol vers la membrane plasmique puisqu'il semble aussi promouvoir, comme le récepteur SR-BI, une diffusion passive du CL suite à une réorganisation des PL membranaire, augmentant ainsi la désorption du cholestérol.¹⁶³ Mais contrairement au SR-BI, ABCG1 n'a aucun impact sur l'influx de cholestérol.^{142,158}

Par rapport à l'efflux, ABCG1 ne transfère pas de PL aux accepteurs plasmatiques mais uniquement du CL.¹⁵³ Aucune liaison ne se forme entre ABCG1 et les accepteurs de cholestérol avec lesquels il interagit.¹⁶⁹ En effet, ABCG1 promeut l'efflux de cholestérol vers des accepteurs de cholestérol tels que différentes variétés de HDL matures (HDL₂, HDL₃)¹⁷⁰, les LDL¹⁵³ mais pas vers des accepteurs pauvres en lipides. Cependant le conditionnement de ses derniers par ABCA1 rend possible une interaction avec ABCG1.^{171,172} En effet, le produit généré de l'efflux par ABCA1 (pré-β-HDL) devient le substrat de l'efflux par ABCG1. Ceci

démontre bien qu'ABCA1 et ABCG1 agissent de manière synergique et séquentielle en ce qui a trait à l'efflux de cholestérol.¹⁷¹ En effet, des preuves *in vivo* de l'interaction de ces deux transporteurs démontrent une diminution soutenue de l'excrétion fécale de stérols et une augmentation marquée de plaques athéromateuses chez des souris ayant reçu des macrophages doublement déficients en ABCA1 et ABCG1.¹⁷³ Si les deux transporteurs peuvent travailler ensemble, ils peuvent aussi agir comme mécanisme de compensation dans un cas, si l'un des transporteurs est inactif.

Une augmentation d'ABCG1 a été notée dans le macrophage isolé d'individus souffrant de la maladie de Tangier, ce qui suggère un processus de compensation afin d'améliorer l'efflux en absence d'ABCA1.¹⁷⁴ Le processus de compensation n'est pas observé dans le cas contraire puisque l'efflux de cholestérol de macrophages de souris déficiente en ABCG1 vers des HDL a été diminué, et ce malgré une surexpression du transporteur ABCA1.¹⁶⁶ De plus, ABCG1 est requis pour que l'effet protecteur des HDL contre l'induction de l'apoptose dans les cellules spumeuses par les oxLDL soit possible. En effet, la captation par des HDL d'oxystérols nuisible pour l'intégrité cellulaire tel le 7-cétocholestérol peut sélectivement se faire grâce à l'ABCG1.¹⁷⁵

Une voie alternative de l'efflux de cholestérol est celle empruntée par l'apoE. En effet, l'apoE est une protéine de 34 kDa¹⁴⁹ qui est synthétisée principalement par le foie mais peut être aussi synthétisée par les macrophages.¹⁷⁶ L'apoE est connue majoritairement pour être un régulateur de l'influx de cholestérol au niveau hépatique (décrit ultérieurement), mais cette apolipoprotéine peut aussi participer à l'efflux de cholestérol dans les macrophages spumeux présents dans les plaques athéromateuses.¹⁷⁷ L'accumulation de cholestérol dans les macrophages stimule la synthèse et la sécrétion dans le plasma de l'apoE liée à des PL, ce qui génère par la suite un efflux de cholestérol.¹⁷⁸ Le transporteur ABCA1 est nécessaire pour une sécrétion efficace de l'apoE.¹⁷⁹

L'efflux de CL par l'apoE endogène peut être favorisé suivant la voie d'ABCA1, surtout en absence ou en présence minimale d'apoA-I et d'HDL dans le plasma. En effet, on a observé qu'en absence d'accepteurs de cholestérol exogènes, l'apoE endogène va être sécrétée et va assurer elle-même l'efflux de cholestérol dans les macrophages humains.¹⁸⁰ La présence d'apoA-I peut aussi stimuler la production d'apoE.¹⁴⁹ Il existe donc une collaboration étroite entre l'apoA-I, l'apoE et ABCA1 afin d'optimiser la mobilisation du cholestérol, surtout en condition pathologique.

En dernier lieu, l'efflux de cholestérol peut être effectué par la formation d'oxystérols dans le macrophage spumeux. Les oxystérols sont des métabolites oxygénés du cholestérol qui sont des intermédiaires à courte demi-vie dans la voie d'excrétion du cholestérol.¹⁸¹ L'accumulation de cholestérol dans les cellules spumeuses fournit les précurseurs pour la synthèse d'oxystérols, une forme moins lipophile du CL. Ces oxystérols peuvent traverser aisément la membrane plasmique lipophile, mieux que le CL lui-même.¹⁸² La conversion du cholestérol en dérivés oxygénés par la présence de ROS est une façon d'éliminer l'accumulation de cholestérol des cellules de la paroi artérielle.¹⁸³

Dans les plaques athéromateuses humaines, le CL est converti en 27-hydroxycholestérol (27-OH-chol.) et en acide 3 β -hydroxy-5-cholesténoïque (A β C) par l'enzyme cholestérol-27-hydrolase (CYP27A1) si elle effectue un ou deux cycles d'hydroxylation.¹⁸² Le 27-OH-chol. est l'hydroxycholestérol le plus abondant dans la circulation sanguine chez l'humain.¹⁸⁴ L'enzyme CYP27A1 est située dans la membrane interne des mitochondries.¹⁸⁵ Le transport des oxystérols vers la membrane se fait possiblement par des transporteurs START/STARD.

Trois critères modulent la production d'oxystérols : la quantité active de l'enzyme CYP27A1, la disponibilité du substrat, le cholestérol, et la présence d'accepteurs dans la circulation. Environ 85 % du 27-OH-chol. s'accumule en proportion équivalente avec le CE dans une plaque athéromateuse humaine.¹⁸⁶ Plus

le niveau de cholestérol augmente dans le macrophage spumeux, plus la synthèse d'oxystérols et sa conversion en CE est augmentée. Le 27-OH-chol. et l'AβC changent aussi les propriétés de la membrane plasmique et favorisent la partition du cholestérol membranaire dans un pool rapidement disponible pour l'efflux. En effet, une augmentation de 27-OH-chol. et d'AβC permet la rupture de complexe CL-PL dans la membrane plasmique, libérant du CL actif et mobile, ce qui envoie un signal vers les compartiments intracellulaires afin d'entamer les processus homéostatiques.¹⁸¹

En ce qui a trait à l'influence des accepteurs plasmatiques, avec son caractère lipophile, l'AβC peut être sécrété assez facilement vers l'albumine sanguine¹⁸⁷, en absence d'accepteurs extracellulaires, tandis que le 27-OH-chol. requiert une faible concentration d'accepteurs lipidés afin de subir un efflux efficace.¹⁸⁸ Cependant, lorsqu'il y a une concentration assez prononcée d'accepteurs de cholestérol, l'efflux de 27-OH-chol. et d'AβC est lent et significativement diminué puisqu'un efflux plus important de CL est présent, ce qui réduit la disponibilité de CL pour la synthèse d'oxystérols.¹⁸² La production d'oxystérols est donc une voie alternative et/ou complémentaire à l'efflux de CL afin d'éliminer l'excès de cholestérol dans les cellules spumeuses.

Une autre manière de protéger les cellules spumeuses contre l'accumulation de cholestérol impliquant l'hydroxylation du CL par CYP27A1 se fait par l'activation des LXR, ce qui stimule les voies ABCA1 et ABCG1 pour induire l'efflux de cholestérol. Le 27-OH-chol. et l'AβC sont donc des ligands endogènes qui activent la voie des LXR.¹⁸⁹

Néanmoins, malgré le rôle important des oxystérols dans la modulation de la voie des LXR, pas tous les oxystérols ont des effets bénéfiques sur l'efflux de cholestérol. En effet, les époxycholestérols tels que le 22S,-25-époxycholestérol sont des ligands endogènes pour les LXR¹⁹⁰ qui réduisent significativement la disponibilité du CL pour l'efflux de CL vers des accepteurs plasmatiques à partir

des macrophages spumeux murins et humains par une régulation à la baisse de l'hydrolyse du CE des gouttelettes lipidiques.¹⁹¹

2.4.2. La régulation de l'efflux dans les macrophages

2.4.2.1. La régulation intracellulaire de l'efflux

Plusieurs effecteurs sont reconnus pour moduler la sortie de cholestérol des macrophages spumeux. C'est le cas de l'enzyme ACAT, présentée précédemment comme étant responsable de l'estérification du CL dérivé de l'hydrolyse des lipoprotéines modifiées. Lors d'une accumulation excessive de lipides dans les macrophages, l'activité de l'ACAT se voit altérée, menant à un mauvais fonctionnement de l'estérification.¹¹⁴ En effet, l'ACAT ne peut plus entamer le stockage de CL en le transformant en CE, ce qui affecte les activités normales du RE. Ainsi, l'inhibition ou l'inactivation de l'ACAT résulte en une augmentation du pool de CL cellulaire disponible, favorisant la production d'oxystérols et influençant la voie des LXR.¹⁹² Ceci encourage donc la sortie de cholestérol des cellules, préservant ainsi leur intégrité.

Dans les macrophages spumeux humains, une inhibition d'ACAT réprime l'accumulation de TC en diminuant la captation de LDL modifiées par une régulation modulée par le complexe SREBP-SCAP décrit plus haut qui diminue le nombre de rLDL disponibles à la surface cellulaire. Ceci accentue le transport de CL vers la membrane plasmique afin de favoriser l'efflux.¹⁹³ Cependant, un effet contraire se produit dans les cellules spumeuses murines, où une inhibition d'ACAT induit une dégradation de la protéine ABCA1, probablement due à un effet lié à la rigidité membranaire.¹¹⁴ En effet, une accumulation de CL n'influence pas le transporteur ABCA1 au niveau transcriptionnel et traductionnel qui est généralement augmenté en cas d'excès de cholestérol, mais agit plutôt au niveau post-traductionnel, en réduisant la demi-vie du transporteur.¹¹⁴

Vu la relation étroite qui existe entre l'enzyme ACAT et la NCEH1 puisqu'elles sont co-localisées sur des gouttelettes lipidiques naissantes du RE¹⁹⁴, cette dernière régule aussi la sortie de cholestérol vers des accepteurs extracellulaires. En effet, l'hydrolyse du CE intracellulaire est l'étape initiale du TIC puisque NCEH génère du CL, qui est la source préférentielle de l'efflux de cholestérol vers l'espace extracellulaire.⁹⁵ Une modulation de l'activité de NCEH1 joue donc un rôle critique sur l'hydrolyse des CE dans le macrophage spumeux murin. En effet, des cellules MPM (*mouse peritoneal macrophages*) déficientes en NCEH1 ont été exposées à des LDL modifiées par acétylation et ont démontré une augmentation de 50 % de CE intracellulaire et une diminution de 35 % d'efflux de cholestérol.⁹⁵

L'activité d'hydrolase du cholestérol chez l'humain se fait par CES1, une enzyme homologue de la NCEH. Une surexpression de CES1 dans des macrophages THP-1 dans un modèle de souris rLDL^{-/-} résulte en une diminution des plaques athéromateuses et des lésions nécrotiques découlant d'une augmentation de l'efflux de CL vers l'apoA-I et les HDL, démontrant que le CL libéré lors de l'hydrolyse du CE intracellulaire par CES1 est disponible pour toutes les voies d'efflux possibles.¹⁹⁵ Dans le cas contraire, des macrophages THP-1 gorgés ayant été traités par un inhibiteur spécifique de CES1 ont démontré une augmentation de la rétention du CE nuisible à l'efflux de cholestérol.¹⁹⁶

Il en est de même pour la LAL qui génère du CL dans les endosomes tardifs puis les lysosomes, ce qui contribue aussi au pool de CL capable de subir l'efflux. L'hydrolyse du CE est donc une étape extrêmement importante dans l'élimination du surplus de cholestérol cellulaire et l'hydrolyse intracellulaire du CE constitue un moyen de décharger le macrophage spumeux de son excédent de cholestérol.¹⁹⁷

2.4.2.2. Stimuli connus pour augmenter l'efflux

Bon nombre de molécules sont connus pour moduler positivement l'efflux de CL. Dans les macrophages murins, des analogues de l'adénosine monophosphate

cyclique (AMPc) sont souvent utilisés pour stimuler l'efflux de cholestérol suivant la voie de l'ABCA1 vers l'apoA-I. Une stimulation par l'AMPc résulte généralement en une augmentation de l'ARNm d'ABCA1 d'environ 50 à 70 fois comparée à la condition sans stimulation.¹⁹⁸

De plus, un traitement à l'AMPc a démontré une augmentation de 14 fois d'ABCA1 lors de l'efflux de macrophages murins J774 gorgés et marqués radioactivement qui ont été incubés 4 h avec de l'apoA-1.¹⁹⁹ Cette forte induction transcriptionnelle du gène ABCA1 et de son impact sur l'efflux de cholestérol est observable uniquement chez les macrophages de souris et non sur les macrophages humains. En effet, on observe une augmentation minime de l'expression d'ABCA1 par l'AMPc et l'efflux de cholestérol en découlant, soit une induction d'un peu moins de 2 fois plus élevée dans le cas des macrophages THP-1.¹⁹⁹ Chez la souris, l'induction de l'expression d'ABCA1 se fait par l'activation de la protéine kinase A (PKA) stimulée par l'AMPc. La PKA phosphoryle et active la protéine CREB (*cAMP-response element binding protein*). Cette protéine se lie à un élément de réponse consensus à l'AMPc (CRE) dans le premier intron du gène d'ABCA1 murin et active la transcription de ce transporteur.²⁰⁰ Une absence d'un CRE fonctionnel dans le premier intron du gène ABCA1 humain explique ce manque de stimulation à l'AMPc.²⁰⁰

En plus de l'AMPc, les agonistes du LXR sont souvent proposés comme étant de bons composés thérapeutiques pour stimuler l'efflux de cholestérol. En effet, les LXR sont des senseurs de stérols, qui répondent à une augmentation d'oxystérols comme le 22-hydroxycholestérol (22-OH-chol.) et le 27-OH-chol. de même qu'à la présence de ligands pharmacologiques tels que le GW3965 et le TO901317.¹¹⁶ Ceux-ci agissent en augmentant la transcription de gènes impliqués dans l'efflux tels qu'ABCA1 et ABCG1.^{165,201} Cette classe de récepteurs nucléaires possède deux isoformes, soit le LXR α et le LXR β qui sont exprimés respectivement dans les tissus fortement impliqués au niveau métabolique comme le foie, les adipocytes et les macrophages pour le LXR α et de manière ubiquitaire pour le LXR β .²⁰² Les LXR

forment un hétérodimère obligatoire avec un autre classe de récepteurs soit les RXR (*retinoic X receptor*), qui peuvent être activés par l'acide 9-cis-rétinoïque.(9c-RA)²⁰³ Un modèle de l'activation de gènes par les LXR veut que l'hétérodimère LXR/RXR soit lié, en condition basale (absence de ligand), à la séquence du gène d'intérêt en présence de corépresseurs tels que NCoR (nuclear receptor co-repressor) et de SMRT (*silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor*). Une fois la liaison avec des ligands formée, un changement de conformation de l'hétérodimère induit un déplacement et un relâchement des corépresseurs afin de recruter des co-activateurs, ce qui résulte en une augmentation de la transcription du gène d'intérêt.¹¹⁶ Les agonistes du LXR augmentent donc l'efflux de cholestérol de macrophages spumeux vers l'apoA-I et les HDL présents dans l'espace extracellulaire. De plus, les agonistes du LXR stimulent la mobilisation du CL des pools intracellulaires vers la membrane plasmique afin d'augmenter la disponibilité du CL pour l'efflux.¹⁶⁶ Les LXR stimulent aussi l'expression d'apoE dans les macrophages de souris.²⁰⁴

Par ailleurs, d'autres composés modulant l'activité des LXR sont impliqués dans la sortie de CL des cellules spumeuses. Les récepteurs activés par la prolifération des peroxyosomes (PPAR) sont des facteurs de transcription qui eux aussi régulent des gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides et dans le métabolisme des lipoprotéines.²⁰⁵ Ces récepteurs disposent de trois gènes soit les PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ qui agissent en formant un hétérodimère avec les RXR sur les éléments de réponse dans les gènes-cibles.²⁰⁶ Les PPAR sont tous activés par la présence de molécules dérivés d'acides gras, de métabolites d'hormones stéroïdes et de vitamines.²⁰⁷ De plus, certains ligands pharmacologiques tels que les fibrates et les glitazones sont reconnus pour activer respectivement les PPAR α et PPAR γ . Ces dernières, lorsqu'activées dans les macrophages humains et les cellules spumeuses, peuvent diminuer le taux du CE.²⁰⁸ Le PPAR α induit à la hausse l'expression de la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT-1), qui est une enzyme impliquée dans le contrôle de la β -oxydation mitochondriale. Ceci réduit la disponibilité et l'apport d'acides gras pour l'ACAT et donc diminue

l'estérification.²⁰⁹ De plus, l'activation de PPAR α et PPAR γ accroît l'expression de SR-BI (ou CLA-1, son homologue humain) par un mécanisme post-traductionnel²¹⁰ et enclenche la surexpression d'ABCA1 par l'entremise d'une activation de l'expression du LXR.²¹¹ Le transporteur ABCG1 peut être aussi modulé à la hausse par PPAR γ .²¹² PPAR β/δ induit aussi l'expression de l'ABCA1 mais de manière indépendante de la stimulation du LXR.²¹³ Paradoxalement, l'activation de PPAR β/δ induit à la baisse les gènes codant pour la 27-hydroxylase, la CYP27²¹⁴ et l'apoE qui sont impliqués dans l'efflux de cholestérol aussi.²¹³ Le mécanisme d'action par lequel PPAR β/δ opère dans l'efflux de cholestérol est peu détaillé. Une stimulation via l'activation des agonistes PPAR stimulent donc l'efflux de cholestérol à partir des macrophages spumeux.

2.4.2.3. Stimuli ou conditions pathologiques diminuant l'efflux

La stimulation de la voie des LXR amène aussi des effets négatifs dans les macrophages spumeux. En effet, les LXR peuvent stimuler la désaturation et la production d'acides gras.²¹⁵ En effet, les LXR stimulent la lipogénèse en induisant l'expression des gènes codant pour le SREBP-1, l'ACC (*acetyl Coa carboxylase*) et la FAS (*fatty acid synthase*).^{216,217}

Or, en plus de moduler à la hausse l'efflux de cholestérol via les transporteurs ABC, l'activation des LXR produit paradoxalement des inhibiteurs d'ABCA1 en activant aussi la SCD1 qui, comme mentionné antérieurement, converti les acides gras saturés (stéarate) en acides gras insaturés (oléate) par l'entremise de la cytidine triphosphate (CTP) -PC cytidylyltransférase.²¹⁸ SCD1 augmente donc l'incorporation d'acides gras monoinsaturés dans les PL cellulaires. Ainsi, cette enzyme altère la composition et l'organisation des acides gras et des PL, diminuant la disponibilité du CL membranaire et l'efflux vers l'apoA-I par l'ABCA1.²¹⁹ Toutefois, SCD1 favorise l'efflux par la diffusion passive et/ou facilité par SR-BI vers des HDL₂, puisque les PC insaturées, générées par cette dernière subissent plus facilement la désorption que celles qui sont saturées.¹⁴² Les altérations occasionnées

à la membrane plasmique déstabilisent l'activité d'ABCA1. En effet, le changement dans la fluidité membranaire causée par la composition différente des acides gras des PL réduit l'activité d'ABCA1, et mène à sa dégradation.²²⁰ Par ailleurs, dans les macrophages spumeux des lésions athéromateuses, l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) permet aussi la relâche d'acides gras insaturés à partir des TG des lipoprotéines telles que VLDL et CM.²²¹ Cette accumulation d'acides gras réduit certainement l'activité cellulaire d'ABCA1. L'acide gras plasmatique le plus abondant est l'oléate chez la souris et ce dernier diminue de 50-70 % l'efflux de CL et de PL dans des macrophages de souris J774, ayant été préalablement stimulés avec du TO901317 ou de l'AMPc.²¹⁵ Les mêmes effets sont observables dans les macrophages THP-1. La diminution d'efflux par ABCA1 dans les deux cas est liée à une dégradation de la protéine puisqu'on n'a noté aucun changement dans les taux de transcription et traduction d'ABCA1.²¹⁵ Par ailleurs, la présence d'acides gras insaturés peut mettre en place une compétition avec les agonistes du LXR et des PPAR α et γ , s'opposant à la surexpression d'ABCA1.^{222,223}

Une autre enzyme qui peut affecter à la baisse l'efflux de cholestérol dans les macrophages spumeux est la group X-sPLA₂ (*Group X secretory phospholipase A₂*). Cette enzyme dépend du calcium et permet l'hydrolyse des PL pour libérer des lysophospholipides et des acides gras. La GX-sPLA₂ peut aussi supprimer l'expression d'ABCA1 et d'ABCG1 dans des cellules J774, où l'on note une diminution de l'efflux de 64 % et 20 % vers l'apoA-I et les HDL, respectivement.²²⁴

Certaines molécules pharmacologiques sont aussi capables de moduler à la baisse la sortie de cholestérol du macrophage spumeux. Le probucol est un composé diphénolique agissant comme un agent thérapeutique hypolipidémiant et antioxydant puisqu'il est connu pour diminuer substantiellement les niveaux d'HDL et LDL plasmatique et la modification oxydative des LDL, respectivement, lorsqu'administré chez l'humain et l'animal.^{225,226} De plus, le probucol possède des propriétés inhibitrices sur l'activité du transporteur ABCA1. En effet, le traitement de cellules avec ce dernier produit une inhibition marquée de l'efflux de CL médié

par l'apoA-I à partir du macrophage et est accompagné d'une inhibition, partielle ou complète de la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1.²²⁷ Lorsqu'on a voulu creuser son mécanisme d'action, on a observé que le probucol n'a pas d'influence sur les taux transcriptionnels et la distribution intracellulaire du transporteur ABCA1, et qu'il semble supprimer la dégradation d'ABCA1 par la voie des calpaines, des protéases non-lysosomiales calcium-dépendantes qui sont exprimées de manière ubiquitaire dans les cellules, ce qui signifie que l'expression protéique d'ABCA1 n'est pas compromise au niveau de la surface cellulaire.²²⁸ Le probucol exerce donc son action par un changement spécifique de conformation de la protéine ABCA1, inactivant sa fonction d'efflux.²²⁸ En pratique, dans des cellules stimulées par des agonistes du LXR et du RXR tel que la combinaison 22-OH-chol. et 9c-RA, le traitement avec le probucol inhibe 80 % de l'efflux par ABCA1 vers l'apoA-I.²²⁹ Cependant, son action semble être spécifique à l'apoA-I puisque lorsqu'on prétraite des cellules J774 avec cet inhibiteur, une baisse d'environ 14 % de l'efflux de cholestérol vers un accepteur plus complet, soit du sérum humain (2,5 %) est observée.²²⁹ De plus, il n'est pas exclu que le probucol agisse similairement sur le transporteur ABCG1 mais le mécanisme d'action est peu connu. Le probucol est donc un inhibiteur de l'efflux de cholestérol par la voie d'ABCA1.

Une autre molécule pharmacologique utilisée pour moduler à la baisse l'efflux de cholestérol est le BLT (*Block Lipid Transport*), qui comme son nom le dit, empêche le transfert de lipides via la voie de diffusion facilitée de SR-BI vers les HDL plasmatiques.²³⁰ Cinq classes de BLT ont été identifiées bloquant tous le récepteur SR-BI mais le plus puissant et communément utilisé est le BLT-1. Cet inhibiteur ne semble pas changer l'expression du récepteur SR-BI sur la surface cellulaire, mais paradoxalement, il augmente la liaison cellulaire, l'affinité des particules HDL au récepteur cellulaire.²³⁰ Son mécanisme d'action pour l'inhibition de la voie du SR-BI est peu compris.²³¹ Malgré cette hausse de l'affinité, le BTL-1 induit bien une inhibition à la fois de la captation sélective de CE à partir des HDL et de l'efflux de CL vers les HDL par la voie de SR-BI.²³⁰ Néanmoins, son effet sur l'efflux de CL dans des macrophages spumeux semble limité, puisqu'une

diminution de l'expression du récepteur SR-BI est observée dans les cellules gorgées en cholestérol, illustrant que la contribution du SR-BI dans l'efflux de cholestérol est réduite.²³² Or, cet inhibiteur est tout de même un outil fort utile pour mesurer la contribution du SR-BI à l'efflux de cholestérol cellulaire, par exemple dans les cellules non-gorgées avec du cholestérol ou les cellules hépatiques.

3. Le transport du cholestérol cellulaire par les lipoprotéines

Vu les rôles importants que jouent les dyslipidémies et les accepteurs plasmatiques dans la régulation du cholestérol dans l'athérosclérose, il faut maintenant aborder l'étape du transport du cholestérol par les lipoprotéines plasmatiques permettant la production et le remodelage et finalement l'élimination hépatique des lipoprotéines qui permet la production d'acides biliaires au niveau du foie, afin d'éviter l'excès de cholestérol plasmatique. Trois voies différentes sont impliquées dans la synthèse et le catabolisme des lipoprotéines : la voie endogène, la voie exogène et la voie des HDL. L'assemblage des lipoprotéines par la voie endogène et exogène se produit de manière intracellulaire, au contraire de la voie des HDL qui se produit essentiellement de manière extracellulaire.²³³

3.1. Métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB

Afin de pouvoir transporter les lipides qui font généralement partie de notre alimentation à travers un environnement principalement constitué d'eau, la formation de véhicules transportant ces lipides est essentielle puisque ceux-ci sont entreposés et utilisés comme source d'énergie pour l'organisme. Ainsi, ces véhicules que l'on nomme lipoprotéines sont nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme des lipides puisqu'elles permettent la livraison de lipides vers les tissus qui les synthétisent ainsi que les tissus qui les utilisent, les dégradent ou les emmagasinent. Une lipoprotéine plasmatique se définit comme étant un complexe soluble constitué de lipides et protéines spécialisées. Ces protéines spécialisées sont des apolipoprotéines qui permettent la solubilisation des lipides dans le plasma en assurant la stabilité des lipides dans la particule lipoprotéique. Elles préviennent

aussi la formation d'agrégats qui peuvent nuire à la circulation et occasionner la formation de caillots sanguins. Or, la synthèse des lipoprotéines s'effectue en deux sites spécifiques dans le corps, soit l'intestin et le foie. Ces deux sites génèrent par un mécanisme similaire des lipoprotéines riches en TG, qui sont composées d'une apolipoprotéine principale soit l'apoB de longueur variable, d'un noyau fait de lipides neutres (TG, CE) et qui sont enveloppées d'une monocouche de lipides polaires (CL, PL). Le métabolisme des lipoprotéines se fait à partir de ces deux sites définis, respectivement, comme étant les voies exogènes et la voie endogène du cholestérol. Les deux voies empruntent sensiblement le même processus d'assemblage et de sécrétion, mais impliquent aussi des processus spécifiques liés à chacun des types cellulaires.

3.1.1. Les voies exogènes du métabolisme des lipoprotéines (la voie de l'intestin)

3.1.1.1. L'absorption de cholestérol

Les lipides provenant de l'alimentation ne sont pas facilement absorbables par les cellules intestinales, les entérocytes. Pour ce faire, l'absorption des lipides ingérés suit un processus en deux étapes soit une partition afin de pouvoir pénétrer la membrane apicale des entérocytes et ensuite un transfert à partir de la membrane plasmique vers un compartiment intracellulaire, le RE pour amorcer la ré-estérification du CL et l'assemblage de lipoprotéines riches en TG.²³⁴

La première étape consiste en un processus d'émulsification des graisses alimentaires par la bile et d'hydrolyse des TG, PL et CE par l'action des lipases pancréatiques et engendre des produits tels que du monoacylglycérol, des acides gras, du CL et des lysophospholipides qui sont complexés à des sels biliaires pour former des micelles lipidiques mixtes qui pourront interagir avec les entérocytes.²³⁵ Les micelles subissent des collisions avec la bordure en brosse de l'intestin grêle, spécialement dans le segment mobile du jéjunum. L'entrée des lipides de ces micelles peut être entreprise par une simple diffusion passive selon un gradient de

concentration ou bien par le biais d'une liaison à des protéines transporteurs/récepteurs situées sur la membrane apicale du jéjunum. Les récepteurs impliqués sont SR-BI et CD36 qui ont pour fonction de faciliter la captation de cholestérol dans les entérocytes.²³⁴ En effet, chez des modèles murins, on a observé ces récepteurs sur la paroi de la membrane apicale, soit au niveau du duodénum et du jéjunum proximal pour SR-BI et au niveau du jéjunum distal et iléum pour CD36.²³⁴

D'autres transporteurs participent à la régulation de cette séquestration par SR-BI et CD36. La présence de transporteurs ABC est aussi observée sur la membrane apicale des entérocytes, soit les transporteurs ABCG5/ABCG8 qui limitent la quantité de cholestérol absorbée en excréant l'excès de cholestérol entré vers la lumière de l'intestin, de même que les stérols d'origine végétale, comme le β -sitostérol.²³⁶ Une fois entrée, la deuxième étape de l'absorption est enclenchée. En effet, le cholestérol est transféré vers le RE par une protéine intracellulaire de transport soit la NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) qui déplace le cholestérol vers le RE.²³⁷

De plus, afin d'augmenter la captation de cholestérol dans la lumière de l'intestin, un transporteur ABCA1 est situé sur la membrane basolatérale des entérocytes et est crucial pour la sécrétion intestinale d'HDL vers la circulation, ce qui représente près de 30 % de la quantité de HDL dans le corps.²³⁸ La sortie de cholestérol par ABCA1 permet le maintien du gradient de concentration qui alimente l'entrée de micelles vers la bordure en brosse de l'intestin.

3.1.1.2. Assemblage et sécrétion des chylomicrons dans les entérocytes

Dans les membranes du RE, une ré-estérification a lieu où les acides gras interagissent avec le monoacylglycérol, le cholestérol et un lysoPL pour recréer des TG, du CE et des PL. Les TG vont être entreposés en deux endroits pour être

disponibles en tout temps pour l'assemblage des lipoprotéines. Une partie des TG synthétisés va être rassemblée en un pool dans la lumière du RE, l'autre partie va être entreposée dans un pool localisé dans le cytosol et est accessible au RE.²³⁵

La production de CM, une lipoprotéine riche en TG provenant de la diète, prend place au niveau du RE. La fonction primaire des CM est de transporter l'importante quantité de lipides provenant de la diète vers les tissus périphériques. En effet, la synthèse de la protéine spécialisée, apoB, qui compose les CM est effectuée dans la membrane du RE rugueux.²³⁹

Cette apolipoprotéine est notoirement différente des autres apolipoprotéines plasmatiques puisqu'elle n'est pas transférable lors d'échanges entre les lipoprotéines.²⁴⁰ Le même gène d'APOB est exprimé dans les membranes du RE des cellules intestinales et hépatiques. Deux isoformes protéiques d'apoB sont toutefois produites de la transcription de l'ARNm, parce qu'un processus d'édition de l'ARNm cause une désamination d'une cytidine en uridine, qui introduit un codon stop, ce qui met un terme à la traduction après que 48 % de la protéine apoB-48 ait été traduite au niveau de l'intestin.²⁴¹ L'apoB-100 est donc produite au niveau du foie chez l'humain. Chez le rat et la souris, les deux formes sont synthétisées et sécrétées par le foie.²⁴² Cet épissage permet le contrôle de l'acheminement des lipides aux tissus appropriés, puisque l'apoB-48 ne peut se lier au rLDL tandis que l'apoB-100 le peut.²⁴³

La protéine apoB-48 peut suivre deux destins. Le premier destin mène à la production de lipoprotéines par l'action d'une enzyme soluble dans la lumière du RE, la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), un hétérodimère qui favorise la translocation de l'apoB-48 à partir de la membrane du RE vers la lumière où a lieu l'assemblage.²⁴⁴ La MTP transfère aussi une petite quantité de TG, du CL et des PL à l'apoB-48, puisque pour initier l'assemblage de lipoprotéines, la protéine apoB doit être associée à des lipides.^{245,246} Sinon, le deuxième destin mène à la dégradation de la protéine si celle-ci n'est pas complexée à des lipides.

C'est dans le RE lisse que l'addition de lipides neutres soit une plus grande quantité de TG et de CE se fait en augmentant la taille de ce précurseur de CM. En plus de permettre la lipidation et la translocation de la lipoprotéine précurseur de CM, la MTP a pour fonction de permettre le mouvement du pool cytosolique de TG dans la lumière du RE afin d'alimenter la maturation de la CM qui y est produite.²⁴⁷ Le RE est aussi le site de synthèse de plusieurs autres apolipoprotéines tels que l'apoA-I et plusieurs apoA-IV. Simultanément, l'apoA-IV va fusionner avec le précurseur de CM afin d'assembler une lipoprotéine ayant un noyau lipidique neutre et une monocouche de cholestérol polaire incluant l'apoB-48 et de l'apoA-IV. La particule déforme aussi la membrane du RE lisse en utilisant l'hydrolyse d'ATP et en faisant appel à des L-FABP (*Liver-fatty acid binding protein*) qui permettent le bourgeonnement et la libération d'une vésicule de transport.²⁴⁸

Pour terminer le cycle de maturation et entamer la sécrétion des CM, la vésicule de transport contenant les CM naissants fusionne avec la membrane de l'appareil de Golgi et déverse son cargo dans la lumière de celle-ci.²³⁹ L'apoA-I va être exportée à l'appareil de Golgi par un système de transport de vésicules différent des précurseurs de CM, en parallèle. Ce système de transport implique des COPII (*coatamer II protein*) qui permettrait sa captation, son bourgeonnement et son exportation à partir de la membrane du RE.²⁴⁹ À cette étape, la lipoprotéine naissante acquiert encore des TG. Dans la lumière du Golgi, la protéine d'apoA-I s'attache au précurseur de CM, transformant celui-ci en une forme mature de CM.

Un autre bourgeonnement, cette fois dans l'appareil de Golgi, crée une vésicule de transport encore plus grande, qui fusionnera avec la membrane basolatérale afin de relâcher par exocytose son contenu dans l'espace extracellulaire, puis les capillaires lymphatiques (chylifères) au niveau du mésentère.^{239,250}

3.1.1.3. Métabolisme et élimination des CM de la circulation.

Lorsque les CM rejoignent la circulation sanguine par le canal thoracique au niveau de la veine sous-clavière, ils échangent assez rapidement des apolipoprotéines avec d'autres lipoprotéines circulantes. En effet, plusieurs apolipoprotéines échangeables lui sont majoritairement conférées par les HDL. Les CM se déchargent principalement de l'apoA-I et l'apoA-IV acquises dans les cellules intestinales qu'ils transfèrent aux HDL et acquièrent de l'apoE et de l'apolipoprotéine C-II (apoC-II).²³³ L'apoE qui est produite par les macrophages et le foie s'avère cruciale dans le mécanisme de clairance des CM.²⁵¹ De plus, l'apoC-II est aussi essentielle pour les lipoprotéines riches en TG puisqu'elle agit comme co-facteur activant la LPL²⁵² qui hydrolyse les liens ester des TG présents dans les CM, en acides gras et monoacylglycérols qui sont utilisés par les tissus cibles des CM. La LPL est localisée sur les cellules endothéliales des capillaires.²⁵³

Chez l'humain, une déficience en LPL est associée à une hypertriglycéridémie sévère résultant en un faible niveau de HDL.²⁵⁴ La LPL initie donc le catabolisme des CM dans la circulation sanguine et au niveau des cellules endothéliales des tissus-cibles des CM. En effet, les acides gras engendrés sont assimilés par les muscles squelettiques et les tissus adipeux qui les utilisent comme carburant du métabolisme oxydatif (source d'énergie) ou comme forme d'entreposage.²⁵³

Cette hydrolyse des lipoprotéines riches en TG par la LPL se fait continuellement, jusqu'à ce que 85 % du contenu initial en TG soit hydrolysé.²⁵⁵ Or, lorsque la lipolyse par LPL touche à sa fin, la lipoprotéine perd sa molécule d'apoC-II, qui est reprise par des particules HDL.²⁵⁶ Le produit de ces hydrolyses en continu et de cet échange crée des lipoprotéines que l'on nomme résidus de CM (rCM). Le site d'élimination des rCM est le foie. En effet, plusieurs mécanismes hépatiques sont possibles pour favoriser l'élimination sanguine des rCM.

Il a été démontré que les rCM traversent des fentes entre les cellules endothéliales qui tapissent les sinusoides hépatiques pour se retrouver dans un

espace nommé l'espace de Disse, selon un processus de tamisage où seul les petits CM ou des rCM peuvent passer.²⁵⁶ Dans cet espace, les rCM peuvent entreprendre 3 voies possibles pour être catabolisées par les cellules hépatiques. Premièrement, une portion des rCM peut être captée par le rLDL. Malgré l'absence de liaison avec l'apoB-48, qui ne possède pas de région de liaison vu sa traduction écourtée,²⁵⁷ les rCM peuvent être séquestrés par le rLDL via leur interaction avec l'apoE. Deuxièmement, les rCM peuvent acquérir beaucoup d'apoE, puisque l'espace de Disse est une zone enrichie en apoE²⁵⁸ ce qui mène par la suite à la captation par la protéine apparentée au rLDL, la LRP1 (*LDL-receptor related protein 1*), un récepteur appartenant à la famille des rLDL. Troisièmement, les rCM peuvent être séquestrés par des protéoglycanes d'héparane-sulfate, présentes tant sur les cellules endothéliales qu'hépatiques et qui se lient à l'apoE de la lipoprotéine. De plus, il est aussi possible qu'un autre acteur, soit la lipase hépatique (HL), elle aussi présente sur les deux types cellulaires délimitant l'espace de Disse, interagisse avec la portion apoB-48 du rCM. Les rCM séquestrés sont aussitôt transférés par rLDL et/ou à la LRP.²⁵⁹

3.1.2. La voie endogène du cholestérol (du foie vers les tissus périphériques)

3.1.2.1. Métabolisme des lipoprotéines à très basse densité (VLDL)

La voie endogène impliquant les VLDL (*very low density lipoprotein*) se fait séquentiellement à la voie exogène. En dépit de la phase exogène du cholestérol, le foie demeure le contributeur principal des TG plasmatiques en situation de jeûne.²⁶⁰ De plus, l'assemblage et la sécrétion des VLDL se fait sensiblement de la même manière que pour les CM à quelques différences près.²⁶¹ En effet, au lieu d'être composés d'une molécule d'apoB-48, les VLDL sont plutôt munis d'une particule d'apoB-100, produite sur les membranes du RE du foie. L'assemblage ainsi que la sécrétion se fait à partir du foie et non de l'intestin. De plus, la VLDL est assemblée

dans le RE mais mature dans l'appareil de Golgi avant d'être incluse dans une vésicule de transport qui fusionnera avec la membrane cellulaire de l'hépatocyte.

Dans les cellules HepG2, un modèle de l'hépatocyte humain en culture, seulement 20 % de l'apoB-100 produite dans la membrane du RE rugueux entreprend la translocation dans la lumière du RE afin d'entamer la formation de VLDL, l'autre partie est retenue et entreprend une dégradation intracellulaire.²⁶²

De plus, pour initier la production des VLDL, contrairement aux CM qui utilisent les TG absorbés de la diète par les entérocytes, quatre sources potentielles de lipides sont utilisées, soit 1) la synthèse *de novo* d'acides gras, 2) les acides gras libres circulant dans le plasma, 3) les pools intracellulaires de TG hépatiques créés par le RE et 4) les TG de lipoprotéines provenant de la séquestration hépatique.²⁴²

Parmi les quatre sources, la synthèse *de novo* et la captation des acides gras libres circulants contribuent le plus à la formation des VLDL chez l'humain, bien que ceci soit débattu. Une augmentation d'acides gras libres dans le sang dû à une mobilisation à partir des tissus adipeux lors d'une période de jeûne, stimule la synthèse de TG hépatiques et la sécrétion de VLDL.²⁶³ Ceci permet donc un transport de lipoprotéines contenant l'apoB-100 vers les tissus adipeux et les muscles afin de les réalimenter en substrats du métabolisme énergétique.

Par ailleurs, un autre facteur qui diffère entre les CM et les VLDL est leur niveau de densité où les CM possèdent une densité intrinsèque plus faible que les VLDL. En ce qui a trait à leur métabolisme plasmatique, les VLDL sont rapidement prises en charge par la LPL qui agit sur les lipoprotéines riches en TG. L'hydrolyse menée par la LPL produit des résidus de VLDL, nommés lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL). Environ 30 % de ces résidus vont être séquestrés par les cellules hépatiques, soit par le rLDL (apoB-100 et/ou apoE-dépendant) ou par le LRP avec l'aide de la LPL qui se lie au IDL et promeut leur captation.²⁶⁴

Cependant, 70 % des IDL vont demeurer dans la circulation afin de subir l'action d'une autre lipase, soit la HL (*hepatic lipase*).

La HL possède deux activités de lipolyse puisqu'elle est une TG hydrolase et une phospholipase A1, donnant comme produit des acides gras libres, du glycérol ainsi que des lysoPL.²⁶⁵ La HL peut agir sur toutes les lipoprotéines du métabolisme des lipides, mais de manière prédominante sur les IDL pour initier la production de particules LDL.²⁶⁶ Les IDL qui ne subissent pas d'hydrolyse vont eux aussi être séquestrées par les récepteurs rLDL au niveau de tissus périphériques ou par le foie. Une modulation autre que celle due aux lipases peut agir sur les VLDL et les IDL. En effet, les VLDL peuvent aussi être dépourvus de leurs PL excédentaires par l'action de la protéine de transfert PLTP (*phospholipid transfer protein*) sur les HDL.²⁶⁷

La PLTP ne possède aucune activité de transfert pour les lipides neutres.²⁶⁸ De plus, afin d'enrichir les lipoprotéines en CE, les VLDL et les IDL interagissent avec les HDL par l'entremise d'une autre protéine de transfert plasmatique, la CETP. L'échange de CE et de TG qui s'ensuit se fait de manière équimolaire entre les lipoprotéines riches en TG et les HDL.²⁶⁹ Les particules de LDL découlant de l'hydrolyse ou de la modulation par des protéines de transfert des VLDL/IDL possèdent donc 80-90 % moins de TG et PL et sont plus riches en CE.

Le parcours des LDL peut se dérouler de deux façons : soit la LDL est capturée par son récepteur au niveau hépatique et dans tous les tissus périphériques puis subit l'endocytose, soit elle subit des modifications dans la paroi vasculaire et est séquestrée par des récepteurs d'épuration et/ou des récepteurs impliqués dans l'immunité innée dans les macrophages, éventuellement au niveau hépatique (décrits précédemment).

3.1.2.2. Catabolisme et élimination des LDL

Pour initier la séquestration des particules LDL par les hépatocytes, ces lipoprotéines doivent, pareillement aux CM, aux VLDL et aux IDL, traverser l'espace de Disse, délimité par les cellules endothéliales vasculaires. La membrane des hépatocytes est parsemée de puits tapissés de clathrine, des structures servant de point de départ pour l'endocytose et où les rLDL sont ancrés. Les particules de LDL et leur récepteur sont captés et internalisés comme des complexes.²⁷⁰ La liaison entre l'apoB-100 et/ou l'apoE sur la LDL initie un mouvement d'un ensemble de complexes protéiques intracellulaires, dont la clathrine vers la membrane afin de permettre l'invagination de la membrane et la formation de vésicules intracellulaires.²⁷¹ Les complexes ligand/rLDL se concentrent et se regroupent dans les puits recouverts de protéines clathrines. Une endocytose des complexes et d'une infime partie de liquide extracellulaire s'ensuit et la vésicule créée s'internalise dans l'espace intracellulaire.²⁷² Il y a alors relâchement des complexes protéiques de clathrines, qui sont recyclés par la cellule. L'endosome initie alors l'acidification de son contenu par l'activation de la pompe à protons, la v-ATPase, mentionnée antérieurement et permet le repliement du rLDL afin que celui-ci libère son ligand, la LDL. Une partie des rLDL bourgeonne hors de l'endosome afin d'être recyclés et envoyés vers la membrane cellulaire afin de continuer leur rôle de clairance de lipoprotéines contenant l'apoB, alors qu'une autre partie peut être aussi dégradée dans les endosomes.²⁷¹ Une fusion entre l'endosome tardif et un lysosome permet la conversion de CE en CL via la LAL comme présenté antérieurement, où le CL est transporté hors de la vésicule par les protéines NPC²⁷³ vers le RE de la cellule hépatique, créant un pool intracellulaire de CL disponible pour différents destins selon les mécanismes de régulation du RE.²⁷⁴

Or, il est alors important que des mécanismes de régulation soient présents afin de contrôler les variations du cholestérol cellulaire et assurer l'élimination des LDL au niveau hépatique. Une des voies de régulation du LDL-C plasmatique est principalement la biosynthèse hépatique de cholestérol ainsi que le rLDL des cellules hépatiques.²⁷⁵ En effet, le CL nouvellement arrivé par la captation du rLDL

diminue le nombre de rLDL présent au niveau de la surface membranaire afin de ralentir la séquestration des LDL.²⁷⁶ En initiant l'activation de gènes par le SREBP, un facteur de transcription qui se lie à des éléments de réponse de gènes tels que la HMG-CoA réductase²⁷⁷ et l'ACAT²⁷⁸, le niveau de cholestérol hépatique est fermement contrôlé.²⁷⁹

Récemment, on a découvert qu'un mécanisme de régulation des taux cellulaires de rLDL se fait grâce à la protéine PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*). Cette protéine est exprimée particulièrement dans le foie, l'intestin et les reins.²⁸⁰ La PCSK9 est synthétisée dans le RE en tant que proprotéine, qui effectue un clivage auto-catalytique afin d'obtenir sa forme mature de 63 kDa. La protéine est ensuite acheminée vers l'appareil de Golgi pour être sécrétée dans la circulation sanguine sous une forme complexe avec sa pro-région.²⁸¹ Ainsi, la source majeure de PCSK9 circulante est le foie.²⁸⁰

Pour valider son implication dans la régulation du LDL-C, on a démontré qu'une surexpression de PCSK9 dans la souris diminue de manière importante le niveau des rLDL hépatiques et augmente directement le niveau de LDL-C plasmatique.²⁸²

D'abord, la PCSK9 se lie directement au rLDL de manière extracellulaire. Afin que PCSK9 cause la dégradation du rLDL, le complexe doit subir l'endocytose puisque uniquement les rLDL matures sont accessibles suite à la sécrétion de PCSK9.²⁸³ De plus, l'affinité de liaison entre PCSK9 et rLDL est grandement augmentée en présence d'un pH acide, condition que l'on retrouve principalement dans l'endosome contenant les rLDL matures.²⁸⁴ Pour ce faire, PCSK9 peut se lier au rLDL de deux manières. La PCSK9 circulante peut directement se lier au rLDL ou bien PCSK9 peut se lier dans la circulation à des particules LDL, qui est ensuite séquestrée par le rLDL. Lors de l'endocytose avec le rLDL, la PCSK9 bloque le changement de conformation du rLDL qui lui permet d'être recyclé, et le redirige

ainsi vers les endosomes tardifs et, ultimement, les lysosomes où le complexe est dégradé.²⁸³

3.2. La voie des HDL (le TIC)

3.2.1. La biogénèse et la maturation des HDL

Les particules HDL possèdent plusieurs fonctions antiathérogènes mais la plus importante est le TIC. Ce processus promeut le transport de CL excédentaire vers le foie, afin qu'il puisse être éliminé de l'organisme lors de la sécrétion de bile dans l'intestin, rétablissant ainsi le niveau de cholestérol cellulaire dans les tissus périphériques (les macrophages) et le niveau de cholestérol plasmatique.²⁸⁵ Le TIC ne se limite pas uniquement à son rôle au niveau du macrophage, qui ne représente en réalité qu'une infime partie de la mobilisation cellulaire du CL de tous les tissus périphériques, mais qui est toutefois d'une importance non-négligeable en ce qui concerne l'athérosclérose.²⁸⁶ Ce processus biologique introduit la dernière voie possible pour le transport du cholestérol par des lipoprotéines et implique la génération ainsi que la maturation des HDL, qui comme mentionné plus haut, se distinguent des autres lipoprotéines quant à leur biosynthèse.

La biogénèse des HDL se fait par une combinaison de plusieurs sources d'apoA-I, une protéine qui constitue près de 70 % de la composition protéique des particules HDL ²⁸⁷ : 1) à partir d'un réservoir d'apoA-I nouvellement synthétisée par les hépatocytes et les entérocytes, 2) à partir d'apoA-I recyclée provenant du catabolisme des lipoprotéines riches en TG et 3) d'HDL matures ayant subi un remodelage plasmatique. La régulation de la production de l'apoA-I hépatique s'effectue principalement de manière transcriptionnelle. Des facteurs tels que l'alimentation ou la sécrétion d'hormones comme les estrogènes augmentent son ARNm.²⁸⁸ Il y a aussi présence d'apoA-II et apoA-IV sur les HDL, en de moins grandes quantités.

Un groupe hétérogène de particules différant par leur forme, leur taille et densité, leur charge ainsi que leur composition en lipides et en protéines est généré par l'efflux de cholestérol dirigé vers l'apoA-I.²⁸⁹ La première forme d'HDL produite par l'efflux de CL est celle qu'on identifie comme la pré- β -HDL. Cette dernière possède une forme discoïdale et est composée majoritairement d'apoA-I, de PL et d'une très faible portion de CL, sans apport en apoA-II.²⁹⁰ Le terme de pré- β fait référence à sa mobilité électrophorétique sur gel d'agarose lorsqu'un échantillon de plasma complet est séparé sur gel.²⁹¹ La migration des particules pré- β est plus lente (moins mobile) dans un gel soumis à un champ électrique par rapport aux particules ayant une mobilité en position α , puisqu'elles possèdent une charge négative plus faible.²⁹² De plus, cette fraction représente uniquement 5 % de l'apoA-I totale dans la circulation.²⁹³ Des particules HDL peuvent être aussi synthétisées avec de l'apoE sécrétée par le foie et les macrophages produisent.²⁹⁴ Effectivement, l'apoE peut, comme l'apoA-I, interagir avec l'ABCA1 pour générer des particules naissantes d'HDL.²⁹⁵ Le devenir de ces particules est très mal défini

Une fois transféré de la surface cellulaire, le CL de la pré- β -HDL sera estérifié par l'action d'une enzyme plasmatique, la LCAT (lécithine : cholestérol acyltransférase), ce qui favorise la répartition du CE dans le noyau hydrophobe de la lipoprotéine qui caractérise la maturation progressive de la particule d'HDL. Les particules d'HDL munies d'apoE, elles, sont beaucoup plus larges que celles ayant de l'apoA-I.²⁹⁶ Le processus de lipidation de l'apoA-I réduit sa clairance par les reins.²⁹⁷ De plus, l'estérification par la LCAT prévient le retour de CL vers les cellules périphériques (dont les macrophages) par diffusion passive, assurant ainsi une élimination nette du CL excédentaire dans les cellules en surcharge.²⁹⁸

La LCAT est principalement produite dans le foie, mais aussi synthétisée dans le système nerveux.²⁹⁹ La LCAT, majoritairement liée aux HDL, est activée par l'apoA-I dans les pré- β -HDL³⁰⁰ et l'apoE sur les HDL la contenant.³⁰¹ Elle catalyse

le transfert d'un groupement acyle en position sn-2 de la lécithine vers le groupement 3-hydroxy du CL afin de produire du CE et de la lysolécithine.^{302,303}

La maturation des particules pré- β -HDL entamée par la LCAT entraîne la formation d'une autre fraction qui constitue la majorité des HDL retrouvée dans la circulation. Ces particules ont plutôt une forme sphérique et une mobilité électrophorétique à la position α .²⁹¹ Deux sous-classes de HDL sphériques diffèrent par leur taille, densité et composition. Ces deux sous-classes sont les HDL₃ et les HDL₂. 65 % de l'apoA-I chez l'humain est contenue dans les HDL₃ contre 25 % sous forme de la HDL₂.³⁰⁴ L'activité de la LCAT permet aussi à la particule HDL₃ de mûrir en HDL₂, une particule plus riche en CE. Les particules d'HDL sont aussi des accepteurs de CL via les autres lipoprotéines, notamment les LDL, un transfert qui est dépendant de la LCAT.²⁹⁷ (Figure 4:1 à 4, p.63)

Chez l'humain, une déficience complète en LCAT est associée à une diminution marquée des niveaux d'HDL-C et à une hausse des niveaux de pré- β -HDL plasmatiques.³⁰⁵ En effet, une corrélation négative significative a été établie chez des patients souffrant de MCAS entre l'activité de la LCAT et les niveaux de pré- β -HDL.³⁰⁵ Cependant, un changement dans l'activité de la LCAT ne semble pas affecter le TIC, puisque chez l'humain, le CL des HDL peut malgré tout être transféré directement au foie et sécrété dans la bile même en absence de LCAT fonctionnelle.²⁸⁸ La LCAT joue donc un rôle important dans la maturation des HDL, mais son activité sur le TIC reste encore à définir avec certitude.

3.2.2. Le remodelage et la conversion des HDL

Les particules HDL dans la circulation sont sujettes à des processus de remodelage, soit par les enzymes lipolytiques, soit par les protéines de transfert de lipides.

D'abord, les particules HDL sont soumises à l'action de plusieurs lipases plasmatiques. L'action de la HL, une glycoprotéine sécrétée majoritairement par le

foie, mais aussi par les macrophages,³⁰⁶ permet l'hydrolyse des TG et des PL sur les particules HDL₂ et les remodèle en des particules plus denses et plus petites soit des HDL₃ et des pré-β-HDL et peut-être une apoA-I pauvrement lipidée. Ceci permet aux HDL de renouveler leur cycle en tant qu'accepteurs de CL à partir des sites en excès de CL ou de favoriser le catabolisme de l'apoA-I par les reins.^{288,307}

De plus, la HL augmente la captation sélective du CE des HDL dans les cellules hépatiques et non-hépatiques, sans pour autant augmenter la sécrétion biliaire des stérols.³⁰⁶ Ainsi, une déficience en HL chez l'humain est associée à une augmentation modeste du HDL-C et des particules HDL₂ avec un enrichissement en TG. Cette hyperalphalipoprotéïnémie est attribuée à un catabolisme ralenti de l'apoA-I chez l'humain.³⁰⁸ De surcroît, cette déficience augmente aussi le risque de développer l'athérosclérose, puisqu'il y a présence, en parallèle, de niveaux élevés de lipoprotéines athérogènes.³⁰⁹

Par ailleurs, une autre lipase est aussi impliquée dans le remodelage des HDL. La lipase endothéliale (EL) fait partie de la même famille que la LPL et la HL, mais démontre essentiellement une activité de phospholipase contrairement à la HL qui est aussi une lipase des triglycérides. Cette lipase est synthétisée dans les cellules endothéliales de la surface vasculaire et hydrolyse plus efficacement les HDL que les autres classes de lipoprotéines, puisque les PL des HDL semblent être son substrat préféré.^{310,311} Son mode d'action implique l'hydrolyse des PL sur les HDL, ce qui déstabilise la particule et résulte en une perte de molécules d'apoA-I pauvrement lipidées, qui sont rapidement éliminées par les reins.³¹² En même temps, le CE restant sur la particule HDL est rendu plus susceptible à être capté sélectivement par la voie du SR-BI hépatique, sans altération de la sécrétion du cholestérol biliaire.³¹² Les lipases plasmatiques jouent donc des rôles importants dans le métabolisme des HDL

En plus des processus lipolytiques, les échanges entre les classes de lipoprotéines contenant l'apoB et les particules de HDL constituent un autre aspect

du remodelage des HDL. Ces échanges peuvent expliquer l'aspect dynamique du métabolisme des HDL. Des protéines de transfert sont au cœur des échanges lipidiques entre les lipoprotéines circulantes. Premièrement, la CETP est une glycoprotéine, membre de la famille des LBP (*lipopolysaccharide-binding proteins*) qui est synthétisée par le foie, le tissu adipeux et les macrophages et qui circule dans le plasma en étant lié aux HDL.³¹³ Elle promeut le transfert de CE synthétisé par la LCAT à partir des HDL₂ contre des TG des lipoprotéines contenant l'apoB, résultant ainsi en un appauvrissement en CE et un enrichissement en TG pour la particule d'HDL et ce qui occasionne ultimement une réduction de sa taille.²⁸⁸ (Figure 4 :6-7, p.63) Cette protéine de transfert est essentielle dans le processus de conversion de HDL matures vers des particules plus petites, soit un mouvement de l'apoA-I des α -HDL vers les pré- β HDL.^{314,315} Ce faisant, la CETP tend à uniformiser la distribution de lipides dans la circulation sanguine.²⁸⁸

Dans le plasma humain, la majorité de la CETP est retrouvée associée avec les HDL.³¹⁶ La CETP est responsable de toute l'activité de transfert de lipides neutres, CE et TG, entre les lipoprotéines dans le plasma humain, mais contribue aussi faiblement au transfert des PL.³¹⁷ En effet, la CETP possède des sites de liaison aux lipoprotéines pour les lipides neutres ainsi que les PL.³¹⁸ Les effets de la CETP sont intensifiés en cas d'hypertriglycéridémie et lors de la phase postprandiale. En effet, plusieurs facteurs présents dans ces situations stimulent l'activité de la CETP. La lipolyse des VLDL par la LPL permet de moduler le transfert par la CETP,³¹⁹ en grande partie, par l'accumulation d'acides gras à la surface des VLDL.³²⁰ Ceci renforce la liaison de la CETP sur les particules. Une stimulation de la CETP peut aussi se faire lors de l'hydrolyse gouvernée par la HL.³²¹ Donc, tout enrichissement de lipides sur une particule HDL permet à cette dernière d'être un excellent substrat pour la CETP.^{322,323}

Par ailleurs, la CETP régule le taux de livraison du CE à partir du plasma vers le foie.³²⁴ En effet, l'activité de la CETP influence le mouvement du CE entre les lipoprotéines et les cellules.³²⁵ Par exemple, dans des cellules HepG2, le transfert de

CE des HDL vers des LDL par la CETP favorise la captation du CE par ces cellules hépatiques.³²⁶ Le transfert de CE par la CETP augmente donc de manière indirecte le transport de cholestérol vers le foie par les lipoprotéines riches en apoB, à partir des voies du rLDL ou des récepteurs impliqués dans la captation de résidus de lipoprotéines riches en TG.³²⁶

Or, une déficience en CETP plasmatique a été rapportée chez plusieurs familles japonaises montrant une hyperalphalipoprotéïnémie.³²⁷ Cette déficience génétique de la CETP est associée à une augmentation marquée du HDL-C³²⁸, qui n'a aucun bénéfice sur l'efflux via ABCA1 mais qui augmente l'efflux médié par SR-BI.³²⁹ De plus, une absence de CETP augmente les niveaux de pré-β-HDL, dû à une réduction du remodelage des larges particules de HDL³³⁰ et à l'interaction de ces dernières avec la PLTP qui permet de former des particules HDL plus petites et de différentes mobilités électrophorétiques.³³¹

Une autre protéine de transfert agit sur les HDL. La PLTP exerce un rôle important dans le remodelage des particules HDL, soit une activité de transfert de PL³¹⁹, qui influence la composition et la taille des HDL.³³² La plupart des tissus expriment cette protéine, mais les contributeurs majeurs sont le foie, les macrophages, ainsi que le tissu adipeux.³³³

Chez l'humain, deux formes de PLTP sont retrouvées dans le plasma soit la HA-PLTP (*high activity-PLTP*) ou la LA-PLTP (*low activity-PLTP*).³³⁴ La HA-PLTP est associée aux lipoprotéines ayant l'apoA-I et la LA-PLTP, avec celles munies d'apoE.³³⁵ Néanmoins, la HA-PLTP est la seule forme capable d'effectuer le remodelage des HDL³³⁶, qui est contrôlé par trois facteurs : 1) la composition en apolipoprotéines de la HDL³³⁷, 2) le contenu enrichi en TG du noyau lipidique³³⁸ et 3) le transfert efficace de PL.³³⁹

Liée aux HDL³⁴⁰, elle permet premièrement le transfert général de PL à partir des lipoprotéines riches en TG vers les HDL par l'élaboration d'un complexe

ternaire entre la lipoprotéine donneuse et accepteuse, facilitant ainsi le transport de PL.^{341,342} (Figure 4 :6-7, p.63) De plus, sa capacité de remodelage des particules HDL permet la formation de HDL plus larges, résultant d'une fusion, ainsi que la production de pré- β -HDL à partir des HDL matures, améliorant la capacité des HDL à acquérir plus de cholestérol cellulaire.³⁴³ En effet, le processus transfère les PL, ce qui initie un relargage d'apoA-I pauvrement lipidée³⁴² et initie la fusion de HDL rendues instables.³⁴⁴

La PLTP peut aussi remodeler les lipoprotéines riches en TG durant la phase postprandiale, conduisant à l'intégration des résidus de la lipolyse dans les particules d'HDL.³⁴² De plus, la PLTP agit également sur les HDL constituées d'apoE, produisant des petites et grosses particules sans dissociation de l'apoE, favorisant ainsi la production d'un autre accepteur potentiel pour le CL et PL cellulaire.³⁴⁵ Cette protéine de transfert ne possède, cependant, aucune activité de transfert pour les lipides neutres.²⁶⁷ Sa déficience chez l'humain n'a pas été identifiée à ce jour mais on sait qu'une augmentation de l'activité plasmatique dans l'obésité ou le diabète de type II constitue un facteur de risque pour les MCV.³⁴⁶ Toutefois, la relation entre son activité plasmatique et son influence sur l'athérosclérose doit être clarifiée.

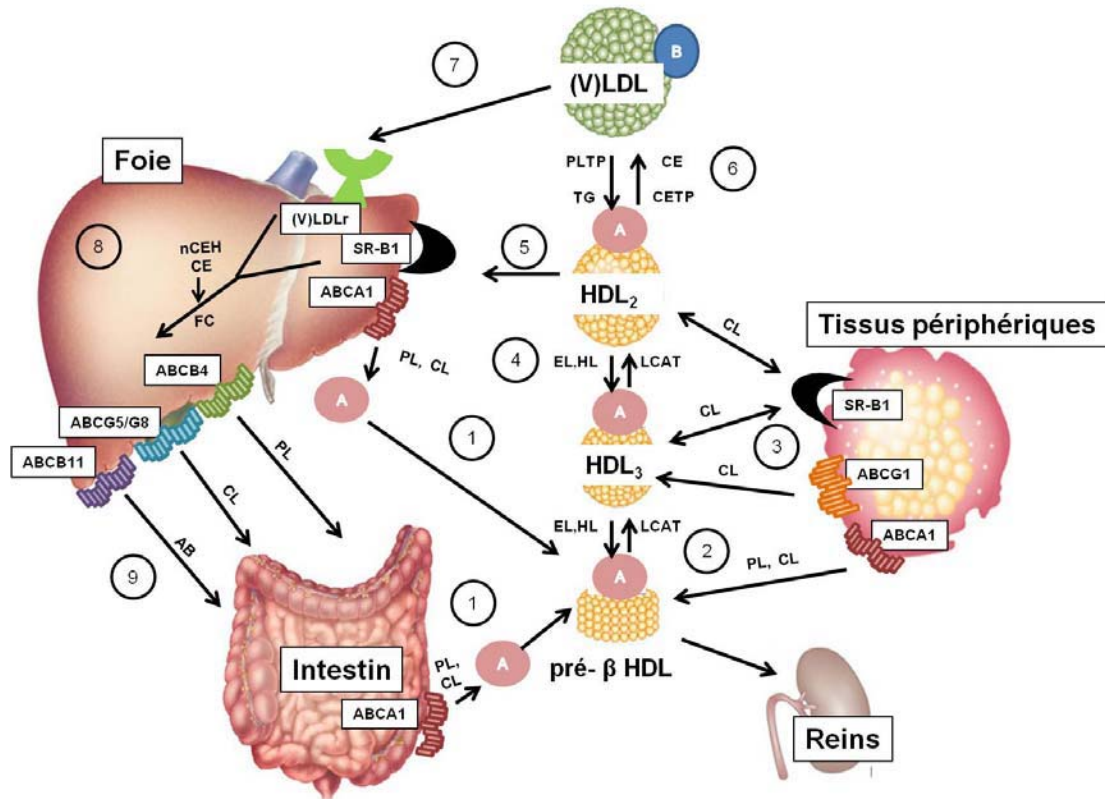


Figure 4: Les différentes étapes du transport inverse du cholestérol (TIC).
Adapté de Santos-Gallego, 2011²⁸⁶

A : apoA-I, B : apoB

1 : sécrétion hépatique et intestinale d'apoA-I, 2 et 3: Formation de pré-β-HDL et HDL naissantes, 4 : Maturation/catabolisme des HDL ,5 : Captation hépatique directe par SR-BI, 6 : Remodelage/Échanges entre les HDL et les V(LDL) ,7 : Captation hépatique indirecte par rV(LDL), 8 : Création d'AB à partir de CL et 9 : Sécrétion hépatique du CL, PL et des AB vers la bile

3.2.3. La captation hépatique des HDL

3.2.3.1. Le récepteur d'épuration SR-BI

L'étape suivante dans le processus visant à éliminer le cholestérol est la captation du cholestérol plasmatique par le foie, le site majeur de l'élimination du cholestérol. Pour se faire, l'implication de quelques récepteurs hépatiques est requise pour initier la liaison avec les lipoprotéines plasmatiques.

Une des ces voies a été préalablement décrite et est dépendante de l'endocytose de la LDL et de son récepteur pour entamer le processus de relargage du cholestérol. (Figure 4 :7, p.63)

Une autre voie qui implique la captation cellulaire des lipides véhiculés dans les lipoprotéines contenant l'apoA-I sans requérir leur internalisation est celle qui fait intervenir un récepteur d'épuration, soit SR-BI ou son homologue humain, CLA-1 (*CD36- and LIMPII-analogous-1*).³⁴⁷ (Figure 4 :5, p.63) La structure de cette glycoprotéine d'environ 82 kDa inclut deux domaines transmembranaires et cytosoliques ainsi qu'une boucle extracellulaire dont le squelette est lourdement chargé avec 9 sites de N-glycosylation.^{347,348} Son expression est marquée dans les tissus connus pour dépendre du CL et du CE des HDL, soit pour la synthèse d'acides biliaires (AB), soit pour la stéroïdogénèse (synthèse d'hormones stéroïdes).³⁴⁹ De plus, le récepteur SR-BI est localisé principalement à la surface des hépatocytes dans des domaines basolatéraux (sinusoïdaux) et canaliculaires biliaires.³⁵⁰ En effet, pour atteindre ce dernier site, le récepteur SR-BI subit une transcytose vers les canalicules biliaires lorsqu'il est stimulé par le cholestérol.³⁵¹ Ce récepteur permet de lier plusieurs ligands tels que les HDL, les LDL natives et modifiées ainsi que des PL anioniques sans que la lipoprotéine soit sujette à une internalisation et une dégradation.³⁴⁹

Le SR-BI permet un transport sélectif de CE proportionnel à la quantité présente dans la particule HDL vers les hépatocytes.³⁵² La captation sélective de CE est fortement dépendante du domaine extracellulaire du SR-BI.³⁵³ La liaison de la HDL ne suffit pas pour assurer un transfert de CE vers les hépatocytes. La présence, la position et l'orientation adéquate est nécessaire afin d'optimiser la captation hépatique du CE à partir des HDL par le SR-BI.³⁵⁴ Mais, le pré-requis pour entraîner la formation d'un complexe SR-BI-HDL productif est l'interaction protéine-protéine entre l'apoA-I et son site de liaison sur la boucle extracellulaire du SR-BI.³⁵⁵ De plus, une liaison spécifique sur le récepteur SR-BI requiert une charge

négative distribuée sur les résidus de la surface des hélices α composant les apolipoprotéines de la HDL.³⁴⁷

Le récepteur SR-BI préfère lier l'apoA-I des HDL matures. En effet, l'apoA-I libre ainsi que les pré- β -HDL sont des compétiteurs peu efficaces des HDL sphériques et sont considérés comme de mauvais ligands auprès du SR-BI pour la captation hépatique du CE mais s'avèrent d'excellents accepteurs de CL pour l'efflux par le SR-BI.³⁵⁶

Trois mécanismes ont été proposés afin d'expliquer comment le transfert de CE se fait entre la protéine membranaire et la lipoprotéine concernée. Le premier modèle propose que le SR-BI permet une semi-fusion entre la monocouche de PL présente sur la particule HDL et le feuillet externe de la membrane plasmique allouant une possibilité de transfert.³⁵³ Le deuxième modèle, lui, fait plutôt allusion à la création d'un canal hydrophobe entre la lipoprotéine ainsi que les cellules de la membrane plasmique, à travers lequel le CE est transféré, selon un gradient de concentration.³⁵² Le troisième modèle fait plutôt appel à une captation sélective par les hépatocytes par un processus de rétro-endocytose, qui permet une internalisation de la lipoprotéine sans la présence de complexes protéiques comme la clathrine, et qui resécète la particule déplétée dans le plasma sanguin.^{347,357}

Cependant, la plupart de la séquestration du CE par le SR-BI n'implique pas l'endocytose, mais plutôt un transfert entre les deux joueurs clés.³⁵⁸ Une fois transféré, le CE provenant du noyau lipidique des HDL est hydrolysé de manière extra-lysosomiale par la NCEH, une enzyme microsomale ou cytosolique synthétisée dans les hépatocytes, et les particules d'HDL délipidées sont envoyées dans la circulation où elles redeviennent des accepteurs de cholestérol.^{286,359,360} Le SR-BI achemine le CE transféré vers un réservoir métaboliquement actif.³⁶¹ Néanmoins, le processus de transport du CE vers ce site est peu connu.

Par ailleurs, SR-BI peut aussi stimuler l'entrée de CL vers les cellules, résultant en une diminution de CL plasmatique et une augmentation de la sécrétion d'AB vers la bile et/ou une livraison vers le même réservoir membranaire métaboliquement actif afin que le CL soit estérifié par l'ACAT dans le RE.^{163,362,363}

En plus de la captation de CE dans les particules HDL, le SR-BI peut aussi incorporer le CE des LDL, avec une efficacité moindre que celle observée avec les particules d'HDL.³⁶⁴ Cependant, selon des études menées sur un modèle de souris transgéniques pour l'apoB humaine surexprimant le SR-BI de souris grâce à un adénovirus, aucune diminution n'a été observée au niveau des LDL plasmatiques, ce qui démontre que le SR-BI joue un rôle assez minime dans la captation de CE présent dans les LDL *in vivo*.³⁶⁵

La captation sélective du CE par le SR-BI peut être modulée de deux manières, soit en modifiant les propriétés de liaison des ligands ou soit en modifiant l'expression du SR-BI. Premièrement, une façon de changer les propriétés de liaison est de modifier les particules d'HDL avec l'action des phospholipases telles que la sPLA2 et/ou l'EL, qui vont diminuer le contenu en PL des HDL, créant ainsi une déstabilisation de la particule.³⁶⁶ Ceci mène à une captation plus efficace par le SR-BI, résultant en une baisse du HDL-C et une augmentation du cholestérol hépatique.³⁶⁷ En effet, la sPLA2 ainsi que la EL augmentent la séquestration du CE hépatique de 77 % et 129 % respectivement.^{368,369} Cependant, ces changements ne semblent pas se refléter sur la sécrétion biliaire de cholestérol.

Or, plusieurs facteurs sont connus pour réguler l'expression du SR-BI et par le fait même, son action dans la captation du cholestérol. Une protéine adaptatrice de 70 kDa, CLAMP (*C-terminal linking and modulating protein*), aussi connue comme la PDZK1, interagit avec un domaine PDZ sur le segment C-terminal du récepteur SR-BI et permet de réguler à la hausse la stabilité de la protéine SR-BI à la membrane plasmique de l'hépatocyte.³⁷⁰ De plus, une autre protéine, la SPAP (*small PDZK1-associated protein*) peut diminuer l'expression de CLAMP, résultant

en un abaissement du niveau d'expression hépatique de SR-BI.³⁷¹ De plus, des composés pharmacologiques peuvent avoir aussi des effets sur l'activité de SR-BI. Les fibrates, agonistes de la voie transcriptionnelle des PPAR α , sont connus pour avoir des effets sur les niveaux d'expression de ce récepteur d'épuration. Les fibrates régulent à la baisse les niveaux de SR-BI dans les hépatocytes mais les augmentent dans les macrophages.³⁷² En somme, une diminution de l'action de la PDZK1 ainsi qu'une augmentation de l'action de la SPAP et des fibrates au niveau hépatique mènent à une hausse marquée des niveaux plasmatiques de HDL.

Les hypothèses du rôle que tient SR-BI dans le TIC et l'athérosclérose proviennent principalement des études faites sur les souris. En effet, des souris transgéniques qui surexpriment SR-BI ont démontré une diminution marquée du HDL-C dans le plasma.³⁷³ De plus, dans la situation contraire où des souris sont déficientes en SR-BI, une augmentation du TC est observée résultant d'une élévation des niveaux de HDL-C plasmatiques et d'une diminution de plus de 90 % de la captation de CE par le foie.³⁷⁴ Les HDL de ces souris étaient plus grosses en taille et étaient beaucoup riches en apoE que chez les souris du type sauvage.³⁷⁵

Or, les études sur l'expression du SR-BI chez l'humain sont peu développées³⁷⁶ puisque la voie principalement empruntée chez l'humain est celle impliquant la voie de la captation des lipoprotéines contenant l'apoB par le rLDL (préalablement décrite). Celle-ci favorise l'échange entre les HDL et les lipoprotéines contenant l'apoB par la CETP pour assurer la captation hépatique.³⁷⁷

3.2.3.2. Le récepteur F₁-ATPase

Comme précisé plus haut, une minime partie de la séquestration de CE par le foie passe par un processus de rétro-endocytose. Un autre récepteur ancré sur la membrane des cellules hépatiques et endothéliales humaines a été impliqué dans cette action. Ce récepteur a été identifié comme étant un récepteur pour l'apoA-I et les HDL dépendant d'une activité ATPase.^{378,379} Les ATPases sont des enzymes comportant plusieurs sous-unités avec deux parties principales : soit l'unité F₀, qui

est un complexe effectuant la translocation de protons lors de la respiration mitochondriale afin de créer la force motrice nécessaire pour les processus à dépendance énergétique, soit l'unité F_1 , un complexe extramembranaire.³⁷⁹ La F_1 -ATPase consiste en un complexe de cinq sous-unités, soit trois sous-unités α et β et une sous-unité γ , δ et ϵ formant un noyau catalytique utilisant l'ATP.^{378,379} Une des sous-unités de la F_1 -ATPase, la sous-unité β possède 3 sites catalytiques qui sont des sites de liaison³⁸⁰ avec l'apoA-I. Suite à la liaison de l'apoA-I, un changement de conformation de la chaîne β stimule l'endocytose de la lipoprotéine complète (fraction protéique et lipidique) dans les cellules hépatiques. Le processus d'endocytose est stimulé par l'ADP (adénosine diphosphate) qui est généré par l'activité ATPase de la chaîne β après que celle-ci se soit liée à l'apoA-I à la surface cellulaire du foie.³⁸¹ Ce récepteur entraîne donc un processus de catabolisme des particules HDL.

De plus, ce récepteur est modulable par la niacine, une vitamine hydrosoluble. En effet, une étude a démontré que l'utilisation de la niacine augmente les niveaux d'apoA-I plasmatiques.³⁸² Cependant cette augmentation est plutôt due à une diminution des taux cataboliques d'apoA-I qu'à un changement dans le taux de synthèse hépatique.³⁸³ La niacine agit en diminuant de 27 % l'expression cellulaire du récepteur F_1 -ATPase, ce qui occasionne une diminution de 35 % de l'endocytose de particules d'HDL dans les cellules hépatiques humaines, soit dans les cellules HepG2.³⁷⁸

3.2.3.3. Le récepteur P2Y₁₃

Par ailleurs, un récepteur a récemment été identifié comme un effecteur de l'incorporation de cholestérol hépatique dans le TIC. En effet, le récepteur P₂Y₁₃ (*purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 13*) semble interagir avec la F_1 -ATPase en formant un complexe à la surface cellulaire.^{381,384} L'ADP généré par le F_1 -ATPase active la protéine G liée au récepteur P₂Y₁₃ afin qu'il apporte sa contribution dans l'endocytose de la particule complète d'HDL.³⁸⁴

Une augmentation de l'activité de P₂Y₁₃ par un agoniste partiel, le cangrelor, qui agit sur l'ADP, stimule l'endocytose des particules contenant l'apoA-I dans les cellules hépatiques humaines.³⁸⁵ En plus, l'activation de ce dernier par des agents pharmacologiques augmente la sécrétion de lipides dans la bile par son action sur l'incorporation de CE dans le foie.³⁸⁴ Cependant, dans des souris déficientes en P₂Y₁₃, aucun changement du taux de HDL-C plasmatique n'a été détecté, ce qui illustre que la voie du P₂Y₁₃, ne contribue que minimalement au niveau de HDL dans le plasma. En somme, la captation de cholestérol via les différentes voies mentionnées ci-haut permet donc de capter le cholestérol afin d'initier élimination.

3.2.4. La création et la sécrétion biliaire du CL et des PL

La sécrétion du CL et des PL consiste en la dernière étape du processus du TIC.³⁸⁶ (Figure 4 :8-9, p.63) En effet, le CL et les PL peuvent provenir de deux sources possibles dans le foie : soit les lipides qui ont été séquestrés par l'interaction avec des lipoprotéines sanguines (par le rLDL, la LRP, le SR-BI, la F₁-ATPase) ou bien le CL et les PL synthétisés *de novo* à l'intérieur de l'hépatocyte par l'action de la HMG-CoA réductase et de la phosphocholine transférase (pour PC).³⁸⁷

Les produits de ces deux voies sont mis en commun dans un réservoir intracellulaire où deux chemins peuvent être suivis. La première voie est celle décrite précédemment, soit celle passant par la sécrétion sanguine de VLDL afin d'alimenter en CL et PL les tissus périphériques. L'autre voie fait appel à la sécrétion dans la bile de CL ainsi que ses dérivés, les AB et des PL.

La conversion du cholestérol en AB se produit exclusivement dans le foie par une cascade de 12 réactions catalytiques.^{388,389} L'action de l'enzyme limitante dans la synthèse d'AB, la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) oxyde le cholestérol à sa position 7- α et le transforme ultimement en acide cholique (AC) et en acide chénodéoxycholique (ACDC) par deux différentes voies.³⁹⁰ Au pH physiologique, les AB se retrouvent dans la bile sous la forme de sels, complexés à une molécule de sodium.³⁹¹ Cette voie mène donc à une élimination du cholestérol dans le corps par

les matières fécales.³⁹² La source de cholestérol la plus retrouvée dans la bile est celle du cholestérol dérivé des lipoprotéines lors de la captation hépatique.³⁹³

De plus, de toutes les lipoprotéines dont le cholestérol a été capté, les HDL sont les plus grands contributeurs de cholestérol dans la bile chez la souris.³⁹⁴ Le CL et les PL provenant des sources exogènes et endogènes sont transportés vers le site de sécrétion biliaire potentiellement par différents candidats tels que les protéines de la famille NPC, StAR ainsi que celle de SCP-2 (*sterol carrier protein-2*), qui sont toutes des protéines de transport impliquées dans le trafic cellulaire du cholestérol.³⁹⁵⁻³⁹⁷ La sécrétion hépatique d'AB est la force motrice qui propulse la sécrétion de CL et de PL dans la bile.

Pour ce faire, des transporteurs effectuent la sécrétion des lipides dans la bile. Premièrement, la présence du transporteur ABCB4, aussi nommé MDR2 (*multidrug resistance p-glycoprotein 2*) permet la sécrétion des PL dans la bile.³⁹⁸ 97 % des PL biliaires sont dérivés des lipoprotéines plasmatiques et 95 % de ces PL biliaires sont sous la forme de PC chez l'humain.³⁹⁹ L'action des AB initie le processus de sécrétion biliaire de la PC par sa mobilisation à partir des réservoirs régulés par le RE.⁴⁰⁰ En effet, une protéine de transport, la PC-TP (*PC-transport protein*) permet le déplacement de la PC du RE vers la membrane apicale des hépatocytes par une simple diffusion facilitée.⁴⁰¹ Le transporteur ABCB4 agit alors comme une flippase déplaçant la PC du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane apicale.⁴⁰¹ Ainsi, une déficience en ABCB4 mène à des maladies progressives d'accumulation de lipides dans le foie chez la souris et chez l'humain.⁴⁰²

Ce positionnement des PC sur le feuillet externe de la membrane apicale expose celle-ci aux sels biliaires qui sont présents dans la bile par l'effet de l'ABCB11, aussi nommé la BSEP (*bile salt export pump*). Les sels biliaires se chargent donc d'extraire les PL par leur action détergente.^{401,403} La sécrétion de PL dans la bile est donc très dépendante de la présence de sels biliaires, ce qui illustre

que plus les sels biliaires sont hydrophobes dans la bile, plus la sécrétion de PL est évidente.⁴⁰⁴

En ce qui a trait au cholestérol, celui-ci est amené vers la membrane apicale par des protéines de transport afin d'être exporté dans la bile par les transporteurs hétérodimériques ABCG5 et ABCG8, exclusivement exprimés dans le foie et l'intestin et qui font passer le CL de part et d'autre de la membrane apicale afin d'exposer le CL aux sels biliaires.⁴⁰⁵ Une déficience en ABCG5/G8 entraîne de graves conséquences pour la sécrétion de CL et PL dans la bile, vu le rôle-clé important qu'il détient.⁴⁰⁶ En effet, une mutation dans l'un ou l'autre des transporteurs de cet hétérodimère emmène une réduction de 75 % de la sécrétion biliaire chez la souris ABCG5/G8^{-/-}.⁴⁰⁷ L'ABCG5/G8 semble agir comme une « liftase » qui élève le CL suffisamment en dehors du feuillet externe de la membrane apicale pour qu'il puisse être extrait par les sels biliaires.⁴⁰⁶

Ces trois composantes, soit les sels biliaires, le CL ainsi que les PL forment des complexes hydrosolubles, des micelles mixtes⁴⁰⁴, qui ont pour fonction de véhiculer ces lipides à travers la bile, qui se déversera dans la lumière de l'intestin. Plus de 90 % des acides biliaires excrétés par le foie sont réabsorbés par l'intestin et renvoyés par la veine porte hépatique vers la surface basolatérale des cellules hépatiques, créant ainsi un cycle entéro-hépatique.⁴⁰⁸ Seulement une petite fraction (en plus de l'excès de CL) va échapper à la réabsorption et sera excrétée dans les matières fécales.⁴⁰⁹

Cette route hépatobiliaire a longtemps été considérée comme étant la seule voie pour éliminer le cholestérol. Or, une voie alternative de transport du cholestérol passant par l'intestin a été démontrée, pouvant aussi être responsable de la captation et de la sécrétion du cholestérol.⁴¹⁰ Ce transport de cholestérol court-circuite la voie hépatobiliaire et passe par le segment proximal complet de l'intestin grêle, un processus nommé efflux trans-intestinal du cholestérol (TICE).⁴¹⁰ Ce processus ne représente en moyenne que le tiers de la sécrétion biliaire de cholestérol effectué par

la voie hépatobiliaire chez l'humain.⁴¹¹ Cependant, chez la souris, le TICE possède une plus grande importance dans l'excrétion de cholestérol, puisqu'il contribue à près de 70 % de la sécrétion de stérols neutres chez la souris.⁴¹² Ceci constitue une sécrétion de 2,5 fois plus élevée que celle attribuable à la sécrétion de cholestérol biliaire.⁴¹²

3.2.5. Les modèles d'étude pour le transport du cholestérol

Ayant déterminé l'importance du métabolisme des particules HDL dans l'élimination et le catabolisme du cholestérol en excès, des modèles expérimentaux permettant d'étudier son influence sur le mécanisme de protection qu'est le TIC sont essentiels puisqu'ils permettent premièrement une étude de profilage individuel d'un patient afin d'évaluer son risque de développer une MCV. Deuxièmement, ces méthodes permettraient aussi la validation des thérapies pharmaceutiques visant le TIC ou le métabolisme des HDL.

3.2.5.1. Les modèles d'études cellulaires pour l'efflux de cholestérol

Un des premiers modèles expérimentaux à avoir été développé est celui visant l'étude de la première étape du TIC, soit l'efflux de cholestérol, sur différents types cellulaires.

Préalablement utilisé pour l'étude du transport net, de l'estérification ainsi que le transfert du cholestérol vers du plasma humain hyperlipidémique, le modèle unicellulaire visait l'analyse des trois étapes initiales du TIC. Pour ce faire, ils ont utilisé des fibroblastes marqués au cholestérol tritié (³H-cholestérol) et une dilution de 1,5 % (vol/vol) de plasma humain complet déplété en fibrinogène, ce qui a permis d'établir que des sérums de différents individus différaient dans leurs capacités de moduler l'efflux de cholestérol net.⁴¹³ Ces différences ont été corrélées avec bons nombres de conditions cliniques qui sont connues pour influencer les lipoprotéines du sérum.^{413,414}

Cette méthode a été reprise et modifiée par d'autres dans le but de développer un système expérimental visant une étude d'un grand nombre de sérums humains complets afin d'établir leur habileté à promouvoir la sortie de cholestérol à partir de cellules représentatives du TIC lors du développement de plaques athéromateuses, soit des macrophages ainsi que des cellules hépatiques.⁴¹⁵ De manière similaire à leurs prédécesseurs, des cellules sont chargées en cholestérol marqué d'un traceur radioactif afin de suivre celui-ci sortant de la cellule vers un milieu contenant différents types d'accepteurs tels que l'apoA-I pour l'étude de la voie d'ABCA1, des particules HDL pour l'étude de la voie par SR-BI et du sérum complet ou déplété en particules contenant l'apoB pour l'étude d'un efflux de cholestérol.²⁸⁶ L'efflux de cholestérol est exprimé comme étant la quantité de marqueur radioactif dans le milieu sur la somme de radioactivité dans les cellules et dans le milieu.

3.2.5.1.1. Les modèles cellulaires utilisant des macrophages

L'utilisation de macrophages dans les modèles cellulaires de l'efflux est physiologiquement pertinente, vu les effets protecteurs que ceux-ci exercent dans la plaque athéromateuse en initiant le TIC.⁴¹⁶ De plus, leur utilisation vise à simuler les événements cellulaires initiés lors d'une surcharge excessive de cholestérol dans une plaque athéromateuse avancée. En effet, lorsque les macrophages en culture sont incubés en présence de LDLac, ils se transforment en macrophages spumeux de sorte qu'ils expriment de la même manière qu'*in vivo*, les nombreux transporteurs opérant dans l'efflux de cholestérol.¹⁴⁸

Premièrement, pour établir le profil désiré de la surcharge cellulaire de cholestérol observée dans les macrophages résidents dans la plaque athéromateuse, les types de macrophages/monocytes utilisés lors de ces essais sont des cellules murines, les cellules J774 ou des cellules humaines telles que les cellules THP-1. Il est connu que les macrophages expriment de manière endogène l'apoE et que ceci augmente l'efflux de cholestérol et des PL des macrophages.⁴¹⁷ Cependant, l'utilisation de cellules J774, dérivées d'une tumeur s'étant développée chez une souris femelle BALB/c,⁴¹⁸ limite l'étude de l'apoE dans l'efflux de cholestérol,

puisque ce type cellulaire n'exprime pas de manière endogène le gène d'apoE.⁴¹⁹ Ceci rend malgré tout l'utilisation des cellules J774 intéressante dans l'étude de l'efflux de cholestérol puisqu'elle rend plus nette la contribution des autres voies impliquées dans la sortie du cholestérol. De plus ces macrophages de souris sont aptes à synthétiser de larges quantités de lysosomes, ce qui les rend très attrayantes pour le trafic intracellulaire du cholestérol.⁴²⁰ En effet, les cellules J774 accumulent de larges réservoirs de CE lorsqu'exposées à des LDL acétylées (LDLac).⁴²¹ Ces dernières expriment de faibles niveaux de SR-BI, ce qui les rendent propices pour l'étude des voies d'efflux modulées par la diffusion passive et par les transporteurs ABC.³⁶² En effet, des études avec les macrophages J774 ont permis de démontrer qu'il existe deux phases durant la cinétique d'efflux de CL, soit une rapide et un autre lente lorsque de la β -cyclodextrine, un heptasaccharide cyclique qui promeut le relâchement extensif de CL membranaire, est ajouté dans le milieu de culture comme accepteur extracellulaire.⁴²²

De plus, ce modèle cellulaire sert à déterminer la contribution importante de la voie d'ABCA1 dans l'efflux de cholestérol. A titre d'exemple, l'utilisation des J774 comme système d'étude a permis d'établir une bonne corrélation entre les niveaux de pré- β -HDL⁴²³ et la voie spécifique d'efflux modulée par l'ABCA1. Pour se faire, la différence entre l'efflux des cellules J774 stimulées à l'AMPc et l'efflux des cellules non stimulées vers l'apoA-I a été calculée, ce qui correspond à une régulation à la hausse d'ABCA1 par le traitement.^{199,424}

En ce qui a trait aux cellules humaines, les THP-1 sont dérivées du sang d'un enfant qui était atteint d'une leucémie aigüe monocyttaire.⁴²⁵ Celles-ci sont établies comme étant une lignée cellulaire fort utile dans l'étude du métabolisme des lipides des macrophages humains. Ces monocytes sont différenciés en macrophages par l'entremise du promoteur tumoral, le phorbol myristate acétate (PMA)⁴²⁶, mimant ainsi les macrophages dérivés de monocytes natifs humains impliqués dans le processus du développement de l'athérosclérose.⁴²⁷ Ce faisant, elles constituent, entre autres, un excellent modèle pour l'étude des effets de l'induction des

récepteurs d'épuration et de l'apoE modulée à la hausse lors de la différenciation de macrophages.^{428,429} Tout comme les J774, les THP-1 sont aussi utilisées pour déterminer la contribution d'ABCA1 lorsque stimulée avec des agonistes LXR/RXR, par l'efflux spécifique à l'apoA-I.⁴³⁰

J774 et THP-1 sont donc les modèles cellulaires par excellence pour l'étude de l'implication d'ABCA1 dans l'efflux de cholestérol et génèrent plusieurs informations sur les effets de différents effecteurs visant la stimulation ou l'inhibition de ce transporteur membranaire. De plus, on peut aussi étudier l'efflux du cholestérol dépendant du SR-BI, en utilisant des inhibiteurs de son activité.²⁸⁶

3.2.5.1.2. Les modèles cellulaires utilisant les cellules hépatiques

Les modèles cellulaires hépatiques sont toutefois de meilleurs systèmes afin d'étudier la voie d'efflux dépendante du SR-BI. En effet l'utilisation de cellules hépatiques de rat, les Fu5AH ainsi que des cellules hépatiques humaines, les HepG2 sont de meilleurs modèles puisque le transporteur SR-BI y est bien exprimé.

Les cellules Fu5AH, une lignée cellulaire dérivée d'un hépatome de rat Reuber H-35,⁴³¹ ont largement été utilisées pour l'étude du métabolisme du cholestérol et du CE à cause de leur capacité de capter le CE.⁴³² Les Fu5AH expriment à leur surface des rLDL mutés, qui permet aux cellules d'internaliser de manière moins efficace les lipoprotéines contenant l'apoB.⁴³³

De plus, lors d'une comparaison avec différents types cellulaires tels que d'autres hépatocytes, des macrophages, des cellules endothéliales ainsi que des fibroblastes, les cellules Fu5AH s'avèrent être le type cellulaire qui manifeste le taux le plus rapide de perte de cholestérol cellulaire en présence d'accepteurs de cholestérol appropriés dans le milieu, puisqu'elles surexpriment de manière naturelle le récepteur SR-BI.⁴³⁴ Des études désirant établir soit la contribution du

SR-BI avec les différentes populations de HDL, soit l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité du récepteur ont donc été possibles dans ce système cellulaire.^{423,435}

Par ailleurs, l'utilisation de ce type cellulaire de rat permet la quantification simultanée de l'entrée et de la sortie de cholestérol de la cellule, soit une mesure du flux net de cholestérol, un paramètre important dans la compréhension du rôle joué par SR-BI.⁴³⁵

Pour ce qui est des HepG2, une lignée cellulaire dérivée d'un carcinome hépatique⁴³⁶, ces cellules rendent possible l'étude du métabolisme du cholestérol grâce à leur capacité à générer plusieurs protéines plasmatiques impliquées dans le TIC. De plus, elles constituent un modèle cellulaire d'étude pour la capacité d'efflux de cholestérol vers les HDL par la voie de SR-BI.⁴³⁷ Ce modèle de cellules hépatiques humaines permet l'étude de la captation, de l'estérification et du métabolisme du cholestérol via les différentes apolipoprotéines et lipoprotéines synthétisées et sécrétées.⁴³⁸

Les HepG2 peuvent synthétiser et sécréter une variété d'apolipoprotéines telles que l'apoA-I et l'apoA-II, l'apoB, l'apoE en grande majorité et aussi des lipoprotéines contenant l'apoB, surtout des particules LDL plutôt que des VLDL, se distinguant de ce qui est observé chez les hépatocytes d'autres espèces telles que le rat.^{439,440}

Par ailleurs, les HepG2 sont un excellent modèle pour l'étude intracellulaire de la dynamique des canalicules biliaires et la capacité à synthétiser et sécréter des AB dans les hépatocytes humains. En effet, elles synthétisent et sécrètent abondamment de l'ACDA et en faible quantité l'AC, qui est détecté dans le milieu des HepG2 en culture, ce qui est contraire à ce qui est normalement observé.^{441,442}

Or, malgré les différences qui distinguent chaque type cellulaire utilisé comme modèle d'efflux de cholestérol, leur utilité demeure puisque ces essais

cellulaires permettent d'explorer deux types de questionnement. Le premier vise à déterminer comment les effets d'un traitement particulier (mutations, déficience ou surexpression de gènes ou des traitements pharmacologiques) affectent la capacité d'efflux le cholestérol cellulaire. Le deuxième vise à déterminer comment les effets d'une maladie ou d'un traitement affectent l'efflux de cholestérol sur les différents accepteurs de cholestérol extracellulaires. Ces modèles cellulaires sont utilisés dans différents champs de recherche (maladies métaboliques telles que le diabète ou des maladies neurodégénératives) et ne se limitent pas qu'à la recherche cardiovasculaire.

Néanmoins, l'implication des HDL est importante dans le TIC à la lumière des nombreuses études épidémiologiques visant à établir des corrélations entre les différentes sous-populations de HDL⁴⁴³ et l'incidence de MCV. Ces corrélations sont démontrées par l'efflux de cholestérol spécifique aux macrophages, qui semble fournir un meilleur indicateur des risques de MCV que les niveaux plasmatiques de HDL-C.^{444,445} L'utilisation des systèmes d'efflux cellulaire est donc critique pour la mesure *ex vivo* de la fonctionnalité des HDL.⁴⁴⁶

Les avantages apportés par ces systèmes unicellulaires reposent sur les nombreuses informations que l'on peut extraire sur l'étape initiale du TIC, soit l'efflux de cholestérol. Cependant, leur plus grande limite demeure leur incapacité à évaluer de manière complète le TIC, surtout l'étape évaluant la contribution des macrophages à l'excrétion fécale du cholestérol.

3.2.5.2. Les modèles d'études *in vivo* pour le TIC

3.2.5.2.1. Le modèle de souris pour le TIC à partir de macrophage

Dans le but de remédier aux lacunes des méthodes unicellulaires d'efflux de cholestérol, des modèles *in vivo* ont été développés comblant ainsi le manque urgent de quantifier la fraction du TIC du cholestérol provenant spécifiquement des macrophages jusqu'à sa sortie vers les fèces.

Cette méthode requiert l'injection intra-péritonéale de macrophages, généralement des cellules J774, qui sont chargées avec des LDL acétylées et marquées simultanément avec du ^3H -cholestérol. Ces cellules adoptent un profil de macrophages spumeux et permettent de suivre le cholestérol radioactif dans des souris ayant subi ou non des interventions pharmacologiques, des manipulations génétiques ou une combinaison d'interventions. Ces cellules spumeuses, prisonnières de la cavité péritonéale, peuvent alors échanger avec les différents accepteurs de cholestérol présents dans le liquide péritonéal et ainsi initier le processus d'efflux. À différents temps durant une période d'au moins 48h, des échantillons de sang et la collecte totale des matières fécales sont pris afin de mesurer l'apparition du traceur radioactif dans les différents compartiments impliqués dans le TIC. De plus, à la fin de l'expérience, suite au sacrifice de l'animal, les poumons, le foie ainsi que la rate sont aussi récoltés.

On fait ensuite l'analyse des échantillons en mesurant le traceur radioactif par scintillation. Les matières fécales sont analysées en extrayant le cholestérol, dont une fraction est radioactive, et sont exprimés en comptes par minutes (cpm) retrouvés dans les fèces par gramme de fèces.⁴⁴⁷

En ce qui a trait aux tissus, des extractions lipidiques sont effectuées par la méthode de Bligh et Dyer⁴⁴⁸ et sont exprimées par les cpm dans l'organe complet. Une récente modification a été apportée à ce modèle de souris où on note une injection sous-cutanée de macrophages marqués avec deux marqueurs radioactifs,

soit le ^{14}C -cholestérol ainsi que le ^3H - β -sitostanol qui sont tous deux excrétés dans la bile. Cependant, ce dernier est pauvrement réabsorbé par l'intestin permettant une correction des variations de la réabsorption intestinale du cholestérol biliaire entre les animaux.⁴⁴⁹

Comme mentionné précédemment, plusieurs interventions génétiques ont pu être étudiées dans ce modèle de souris et ont apporté un grand nombre d'informations sur l'implication de plusieurs effecteurs du métabolisme des HDL et du TIC. (Tableau I) Le modèle a été utilisé pour trois mandats, soit l'analyse de la contribution de chaque étape du TIC, l'impact de facteurs liés aux cellules ainsi que l'influence de l'inflammation, des manipulations alimentaires et des interventions pharmacologiques sur le TIC.

Tableau I: Relation entre les niveaux de HDL-C, le TIC et le développement de l'athérosclérose chez des souris en réponse à des manipulations génétiques. Adapté de Rader DJ, 2009.¹⁴¹

Manipulations génétiques	Tissus	HDL-C	TIC			Dével. athérosclérose
			Plasma	Foie	Fèces	
Délétion d'ABCA1 ^{148,450}	Macrophage	Aucun effet	Baisse de 27 %	---	Baisse de 37 %	Hausse de 60 %
Délétion d'ABCG1 ^{148,451}	Macrophage	Aucun effet	Baisse de 20 %	---	Baisse de 25 %	Baisse de 40 %
Délétion d'ABCA1 et d'ABCG1 ^{148,452}	Macrophage	Aucun effet	Baisse de 66 %	---	Baisse de 40 %	Hausse
Délétion de SR-BI ^{453,454}	Macrophage	Aucun effet	Aucun effet	Aucun effet		Variable
Surexpression de SR-BI ^{455,456}	Foie	Baisse	Baisse	Hausse	Hausse	Baisse
Délétion de SR-BI ^{453,455}	Corps	Hausse	Hausse de 78 %	Baisse	Baisse	Hausse
Surexpression de LCAT ^{457,458}	Foie	Hausse	Hausse	Baisse de 20 %	Baisse de 35 %	Hausse
Délétion de LCAT ⁴⁵⁸⁻⁴⁶⁰	Corps	Baisse	Baisse de 23 %	Aucun effet	Baisse de 45 %	Neutre
Co-expression de LCAT et CETP ⁴⁶¹	Foie	Variable	Aucun effet	Aucun effet		Variable
Expression de CETP ⁴⁶²	Foie	Baisse	Aucun effet	Aucun effet	Hausse de 46 %	Baisse
Surexpression d'ApoA-I ⁴⁶³	Foie	Hausse	Hausse	Hausse de 35 %	Hausse de 63 %	Baisse
Délétion d'apoA-I ⁴⁶⁴	Corps	Baisse	Baisse	---	Baisse	Hausse

Ce modèle *in vivo* de souris permet bel et bien une mesure complète du TIC à travers l'animal, puisqu'il mesure la sortie du cholestérol à partir des macrophages, et suit son devenir jusqu'à son excrétion vers les fèces. De plus, la souris recevant l'injection peut subir différentes modifications génétiques augmentant ou diminuant des étapes individuelles du TIC, ce qui fournit de nombreuses informations sur la contribution des différentes variantes génétiques au TIC.⁴⁶⁵ En plus de manipulations génétiques, les souris récipiendaires de l'injection peuvent être traitées par différents modulateurs pharmacologiques ou nutritionnels qui ont des impacts sur le TIC. Cependant, certaines lacunes demeurent toujours en place. Les études faites sur les souris ne peuvent pas être extrapolées sur les êtres humains puisque leur métabolisme du cholestérol diffère de celui observé chez l'humain.

De plus, chez le modèle de souris, une déficience du gène de la CETP est présente. Cependant, cette protéine de transfert joue un rôle non-négligeable dans le métabolisme des HDL puisqu'elle module la captation de cholestérol hépatique par une voie indirecte du métabolisme des HDL, soit celle redirigeant le cholestérol vers des particules riches en apoB où la clairance hépatique implique le rLDL. Cette voie de clairance est celle qui prédomine chez l'humain.

3.2.5.2.2. Le modèle de hamster pour le TIC à partir des macrophages

Un autre modèle a été développé afin de refléter davantage la réalité du métabolisme des lipoprotéines observé chez l'humain. L'utilisation d'un modèle animal pouvant exprimer la CETP était nécessaire afin de mieux comprendre le dynamisme du métabolisme des lipoprotéines chez l'humain. Le hamster, une espèce exprimant la CETP, représente donc un modèle préclinique plus convenable pour l'interprétation ainsi que l'application des données sur de nouvelles thérapies des dyslipidémies chez l'humain.^{466,467}

Trois diètes sont présentement utilisées pour induire une dyslipidémie chez le hamster.⁴⁶⁶ La première diète présente un enrichissement de 60 % de fructose dans la diète normale pour rongeurs.⁴⁶⁸ Cette diète consommée par les hamsters sur une

période de 2 semaines induit une lipogenèse hépatique ainsi qu'une résistance marquée à l'insuline.⁴⁶⁹ Le profil dyslipidémique est caractérisé par une hausse des niveaux de VLDL-C et de LDL-C⁴⁷⁰, ainsi que par une hausse de l'expression et de l'activité de la HL.⁴⁷¹ Cette diète fournit un modèle de l'hypertriglycéridémie.⁴⁶⁶

La deuxième diète présente un enrichissement de 0,3 % en cholestérol dans la diète normale. Ce modèle de hamsters dyslipidémiques illustre une stéatose hépatique et est utilisé pour étudier le TIC spécifique aux macrophages *in vivo*. Cette diète, sur une période de 4 semaines, a permis d'observer une hausse significative de 31 %, 76 %, 119 % et 233 % respectivement des niveaux plasmatiques de TG, de HDL-C, de TC et de cholestérol non-HDL-C.⁴⁶⁷ De plus, la présence d'une stéatose hépatique induite par la diète a amené le foie à une hausse de 66 % de son poids, incluant une élévation de 168 %, 437 % et 535 % des niveaux hépatiques de TG, d'acides gras et de cholestérol, respectivement.⁴⁶⁷ De plus, cette diète riche en cholestérol chez le hamster permet d'augmenter l'expression⁴⁶⁷ ainsi que l'activité de la CETP.⁴⁷²

La dernière diète se compose d'une combinaison des deux diètes précédentes.⁴⁶⁶ En effet, l'incorporation d'une diète riche en fructose et en cholestérol amène un profil de dyslipidémie et de résistance à l'insuline plus sévère que celui observé dans les deux autres diètes. Une hausse accrue du ratio HDL-C/TC, ainsi que des niveaux de VLDL, de LDL-C et du glucose sanguin rend l'utilisation de cette diète idéale pour étudier le syndrome métabolique et l'évaluation de médicaments agissant sur le diabète et la dyslipidémie chez le hamster.

Le modèle de hamsters permet donc l'évaluation de composés ciblant la dyslipidémie et des résultats ont déjà été obtenus pour les statines⁴⁷³, les agonistes du PPAR α/γ ⁴⁷⁴, les inhibiteurs de la CETP⁴⁷⁵ ainsi que pour les agonistes du LXR.⁴⁷⁶

Notamment, l'évaluation du TIC spécifique aux macrophages a pu être étudiée en relation à un traitement par un agoniste LXR synthétique, le GW3965. Après 4 semaines de diète hypercholestérolémique, les hamsters ont été soumis à un traitement de 10 jours du véhicule (contrôle) ou de l'agoniste du LXR. Au septième jour, le TIC *in vivo* spécifique aux macrophages a été évalué comme décrit précédemment.⁴⁶⁷ Cette étude a permis de démontrer une hausse de 30 %, de 27 % et de 156 % du ³H-cholestérol dans le plasma, dans le foie et dans les fèces respectivement, sans observer de changement du niveau des AB dans les fèces des animaux traités au GW3965.⁴⁶⁷ Cependant, le traitement au GW3965 a échoué pour l'amélioration de la dyslipidémie.⁴⁶⁷

Ce modèle permet donc l'étude de modulateurs du TIC comme les agonistes du LXR du TIC visant une meilleure compréhension des traitements ciblant les maladies causées par des dyslipidémies chez l'humain. Cependant, quelques lacunes persistent. Malgré une utilisation de modèles animaux se rapprochant de l'humain, il est tendancieux de vouloir extrapoler les résultats obtenus à l'humain. De plus, le coût dispendieux en temps (mise en place de la pathologie) de ces modèles animaux rallonge le temps de réponse pour évaluer de nouveaux traitements pour diminuer le risque de développer une MCAS. De plus, l'utilisation d'un marqueur radioactif complique son application chez des patients humains. Une méthode pour évaluer le TIC directement chez l'humain est souhaitable.

3.2.5.2.3. Le modèle humain du TIC en utilisant des isotopes stables

Une méthode a récemment fait son apparition pour l'étude du TIC, cette fois chez l'être humain. En effet, parce que les études *in vivo* avec des animaux ne peuvent pas évoquer avec certitude ce qui se déroule chez l'humain et que l'utilisation de marqueurs radioactifs est limitée chez l'humain pour des raisons éthiques⁴⁷⁷, d'autres alternatives ont été tentées pour quantifier le TIC chez l'humain. En effet l'utilisation d'isotopes stables est utilisée afin d'obtenir des informations sur la dynamique des processus physiopathologiques chez l'humain.

Les traceurs préparés à partir d'isotopes stables permettent de suivre des composantes du métabolisme des lipides *in vivo* chez l'humain, ce qui permet d'avoir une sensibilité et une fiabilité accrue pour les isotopes stables, qui sont mesurés par IRMS (*isotope ratio mass spectrometry*).⁴⁷⁸

Cette méthode est basée sur deux hypothèses. La première est que le cholestérol est distribué vers deux réservoirs différents, soit les tissus périphériques incluant les macrophages et le plasma vers les lipoprotéines et le foie.²⁸⁶ La deuxième veut qu'un élément marqué soit rapidement redistribué vers le plasma et le foie, et ne soit pas ou peu transporté vers les tissus périphériques.²⁸⁶

Cette méthode débute par l'injection d'un marqueur exogène, le cholestérol contenant un isotope stable dans la circulation sanguine. Ce traceur doit refléter le même comportement cinétique, les mêmes propriétés physiques et chimiques que l'élément que l'on désire observer (le cholestérol endogène) afin de ne pas perturber le système⁴⁷⁹. De plus, le traceur doit atteindre un état d'équilibre, soit être uniformément distribué entre les niveaux plasmatiques et hépatiques afin que cet essai fonctionne.²⁸⁶ Une fois l'équilibre atteint, on suit le transport du cholestérol endogène hors des tissus périphériques incluant celui des macrophages par la dilution de concentrations du cholestérol marqué, une caractéristique de l'efflux du cholestérol dans le TIC. Or, une relation inverse relie les niveaux du cholestérol exogène marqué et l'efflux de cholestérol *in vivo* à partir des tissus extra-hépatiques vers le plasma.

Cette méthode possède des avantages et des inconvénients. En effet, l'utilisation d'isotopes stables permet l'étude de l'implication de différentes composantes du TIC de manière plus spécifique et prudente chez l'humain que l'utilisation des isotopes radioactifs chez l'animal.⁴⁷⁷ De plus, cette méthode peut permettre l'étude de différents effecteurs du TIC de manière simultanée.⁴⁷⁸ Toutefois, cette approche ne permet de mesurer que l'efflux de cholestérol des tissus

périphériques et non uniquement spécifique à l'efflux de cholestérol des macrophages.

Par ailleurs, l'efficacité de cette méthode repose entièrement sur l'obtention de l'état d'équilibre de l'isotope qui doit absolument être atteint,²⁸⁶ faute de quoi, le cholestérol non-marqué diluera les concentrations du cholestérol exogène marqué et faussera les résultats obtenus. Ce modèle nécessite encore quelques ajustements dans la méthode et demande à être validé avec les différents critères d'évaluations cliniques déjà établis dans l'optique de déterminer son efficacité comme modèle de TIC dans l'estimation du risque de développer une MCV. Bien qu'informatifs, les différents modèles présentés démontrent des lacunes à plusieurs niveaux.

3.2.6. Les traitements pharmacologiques visant à intensifier le TIC.

Vu le rôle important que joue le TIC dans l'élimination de l'accumulation de cholestérol dans les macrophages spumeux résidents des plaques athéromateuses, des stratégies thérapeutiques doivent être développées afin d'atténuer ou de stopper le développement de l'athérosclérose chez des patients coronariens. Malgré les approches intensives déjà utilisées pour diminuer les effets pro-athérogènes causés par les dyslipidémies, comme les statines, celles-ci ne permettent pas d'annuler le risque de MCV. En effet, un pourcentage de 60-70 % de risque résiduel demeure encore présent.⁴⁸⁰

Or, trois approches thérapeutiques peuvent être proposées comme stratégies visant à intensifier le TIC : la première vise à augmenter de manière directe ou indirecte la concentration des accepteurs de cholestérol, la deuxième consiste à moduler le métabolisme des HDL et la troisième vise une hausse d'ensemble du TIC.

3.2.6.1. La hausse directe ou indirecte de la concentration des accepteurs de cholestérol

3.2.6.1.1. Infusion d'apoA-I complexés ou de HDL reconstituées (rHDL)

Certaines stratégies thérapeutiques utilisées visent un apport d'apolipoprotéines exogènes, soit des accepteurs de cholestérol pour stimuler la sortie du cholestérol des tissus périphériques, favorisant ainsi la formation de pré- β -HDL, l'accepteur de cholestérol par excellence qui initie le TIC. En effet, l'administration intraveineuse (I.V) d'un variant de l'apoA-I complexée à de la phosphatidylcholine a suscité une régression de la taille des plaques athéromateuses⁴⁸¹ et une hausse du TIC des macrophages aux fèces dans le modèle de souris.⁴⁶³ De plus, des infusions I.V. de rHDL ont mené à la réduction d'évènements associés à l'athérosclérose par l'inhibition de processus inflammatoires vasculaires⁴⁸² comme une diminution de l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1),⁴⁸³ ainsi qu'une réduction de l'oxydation des PL⁴⁸⁴ dans plusieurs études faites chez des modèles animaux et chez l'humain.

Plusieurs formulations préparées *in vitro* avec différents types d'apoA-I ainsi que différents complexes de PL servent à la préparation de rHDL. L'une des ces formulations est obtenue par l'incorporation de PL comme le 1-palmitoyl-2-oleolyln-glycero-3-phosphocholine et de l'apoA-I portant une mutation ponctuelle (substitution par une cystéine de l'arginine à la position 173) mimant une variante naturelle et rare de l'apoA-I, soit l'apoA-I Milano.⁴⁸¹ Dans une étude faite chez des patients, on a découvert que cette variante confère des propriétés protectrices contre l'athérosclérose, diminuant leur risque de développer cette pathologie et ce, malgré une réduction sévère du taux de HDL-C et d'apoA-I.⁴⁸⁵ Un de ces types de complexes, ETC-216, a été l'objet de plusieurs études sur des modèles animaux et chez l'humain. L'infusion d'ETC-216 dans des modèles athérosclérotiques de lapin et de souris a illustré une diminution du contenu lipidique et des macrophages résidents des plaques athéromateuses.^{486,487} De plus, son utilisation a montré une

amélioration de l'efflux de cholestérol *in vitro* et du TIC spécifique aux macrophages *in vivo*.^{488,489}

Dans une étude sur des patients atteints de syndrome coronarien aigu, un traitement de 5 semaines avec l'ETC-216 a aussi diminué le volume de plaque athéromateuse de 4 % comparé à son contrôle sans traitement, tel que mesuré par IVUS (*intravascular ultrasound*).⁴⁹⁰ Néanmoins, ce type de rHDL à effet thérapeutique suscite beaucoup de débats quant à ses performances comparées à l'injection de rHDL faites d'apoA-I de type sauvage. Certains appuient le fait que les effets bénéfiques d'ETC-216 surpassent ceux procurés par une rHDL préparée avec une apoA-I de type sauvage, tandis que d'autres stipulent que les deux rHDL sont équivalentes.^{491,492} Des essais supplémentaires sont nécessaires pour confirmer davantage l'une ou l'autre de ces affirmations.

Une autre formulation connue de rHDL, le CSL-111 est conçue à partir d'apoA-I native et de PC de soja.⁴⁹³ Dans une étude de 145 patients atteints aussi de syndrome coronarien aigu qui ont été évalués par l'IVUS et où son administration a été effectuée durant 4 semaines, le CSL-111 a démontré une baisse de 3,7 % du volume des plaques athéromateuses, ne montrant toutefois pas de différence significative par rapport aux patients traités avec un placebo.⁴⁹³ Or, lorsqu'une angiographie coronarienne quantitative a été effectuée, une différence significative de la progression de l'athérosclérose coronarienne a été notée entre les patients traités au CSL-111 par rapport au placebo.⁴⁹³

De plus, dans une autre étude sur des patients atteints de maladies artérielles périphériques reliées aux membres inférieurs, une seule infusion du CSL-111 a permis une réduction significative du contenu en lipides ainsi que de l'expression de molécules d'adhésion dans une plaque excisée par athérectomie, une méthode minimalement invasive pour enlever la plaque des artères. De plus, une infusion du CSL-111 amène une nette hausse de 20 % du HDL-C et promeut l'efflux de cholestérol à partir de macrophages *in vitro* après 5 à 7 jours.⁴⁹⁴

Une formulation plus récente de ce complexe, appelée le CSL-112, a fait son apparition et est en cours d'études précliniques où l'on rapporte qu'il détient une meilleure capacité d'efflux de cholestérol, et une réduction de la toxicité hépatique par rapport à son prédécesseur.⁴⁹⁵

Une autre approche nouvellement utilisée fait appel à des HDL délipidées autologues. Le principe derrière cette approche repose sur la collecte du plasma par aphérèse, une technique de prélèvement, afin d'isoler les HDL et de retirer des lipides les composants par des solvants organiques, pour ensuite ré-infuser les HDL partiellement délipidées. Cette technique a été utilisée chez des singes hyperlipidémiques où on a noté qu'une infusion I.V. des HDL délipidées a diminué significativement de 6,9 % le volume de plaque aortique, mesuré par IVUS.⁴⁹⁶ De plus, chez des patients atteints de syndrome coronarien aigu, une infusion durant 7 semaines a augmenté les niveaux de pré- β -HDL près de 30 fois et a réduit de 5,2 % le volume des plaques, sans que cela soit statistiquement significatif.⁴⁹⁷ Cette approche sera sans doute poursuivie dans le futur.

De plus, un nouveau composé a aussi fait son entrée comme une tentative d'augmenter la concentration d'accepteurs de cholestérol plasmatique. Le RVX-208 est une molécule synthétique, faisant partie de la famille des quinazolines, qui induit la production hépatique d'apoA-I.⁴⁹⁸ Cette molécule a été évaluée dans des essais sur des animaux et chez l'humain. En effet, chez un modèle de singe athérosclérotique, l'administration orale de ce composé sur une période de 2 mois a entraîné une hausse des niveaux plasmatiques de l'apoA-I ainsi que du HDL-C de 60 et 97 % respectivement.⁴⁹⁵ De plus, on a démontré qu'un efflux de cholestérol par les cellules spumeuses des singes traités au RVX-208 était plus prononcé que l'efflux chez les singes n'ayant subi aucun traitement.⁴⁹⁵

Par ailleurs, une petite étude sur sujets humains a aussi démontré une élévation de l'apoA-I et des pré- β -HDL de 10 et 40 % respectivement, ce qui se

répercute sur l'efflux de cholestérol.⁴⁹⁹ Une autre étude sur ce composé sera entamée prochainement sur des patients souffrant de syndrome coronarien aigu, évalués par IVUS, pour obtenir de plus amples informations.

3.2.6.1.2. Les peptides mimétiques de l'apoA-I

Le développement de peptides synthétiques comportant des hélices α amphipathiques, analogues de l'apoA-I et de l'apoE, fournit une stratégie additionnelle visant à hausser le nombre d'accepteurs de cholestérol dans la circulation sanguine pour augmenter la capacité d'efflux *in vivo*. Ces peptides qui représentent des fragments de 18-22 acides aminés sont conçus pour partager les propriétés de liaison aux lipides de l'apoA-I entière.⁵⁰⁰

Basé sur la structure générale des hélices α dans l'apoA-I, le peptide le plus connu et étudié est le D4F. La forme D des acides aminés permet une formulation orale, en lui conférant une résistance contre l'action des peptidases gastro-intestinales.^{500,501} De plus, la notation 4F fait référence au nombre de phénylalanines (F) que porte la surface non-polaire du peptide, ce qui lui confère une hélicité et une capacité plus grande d'être associé aux lipides.⁵⁰² Dans les modèles *in vitro* ainsi que dans les modèles animaux, D4F promeut l'efflux de cholestérol par ABCA1 à partir des macrophages et aussi la captation de cholestérol par SR-BI dans les hépatocytes, dû entre autres à sa grande affinité pour les lipides et sa capacité à solubiliser les micelles de PL.⁵⁰³⁻⁵⁰⁵ Cette molécule surpasse même celle de l'apoA-I native en terme de capacité antioxydante.⁵⁰⁶

Dans un modèle de souris hyperlipidémiques, le D4F possède aussi des propriétés anti-thrombotiques et antiplaquettaires.⁵⁰⁷ De plus, dans des modèles athérosclérotiques, le traitement avec ce peptide induit une réduction du volume de la plaque athéromateuse, comparé à la condition sans traitement.⁵⁰⁸

D'autres peptides ont récemment été développés qui diffèrent dans leur voie d'administration. En effet, des peptides comme l'ATI-5261 sont livrés par injection

et maximisent l'efflux de cholestérol, résultant en une hausse du TIC spécifique aux macrophages chez un modèle de souris.⁵⁰⁹ De plus, une diminution de 45 % de la plaque athéromateuse dans l'aorte de ces souris a été observée, faisant de ce peptide une alternative thérapeutique potentielle.⁵⁰⁹

3.2.6.2. Modulateurs du métabolisme des particules HDL

Les approches suivantes visent à augmenter la concentration des HDL et agissent, contrairement aux approches précédemment décrites, en modulant le métabolisme des HDL et non leur biogénèse.

3.2.6.2.1. Les inhibiteurs de la CETP

Comme mentionné plus haut, une déficience en CETP occasionne une hausse des niveaux plasmatiques de HDL-C chez l'humain. Cependant, les variantes qui diminuent l'activité de la CETP n'ont pas encore démontré une réduction claire du risque de MCAS, ce qui suggère que l'inhibition de la CETP comme moyens thérapeutique nécessite encore d'être étudiée afin d'être considérée dans le traitement des MCAS. Cependant, l'inhibition de la CETP n'est bénéfique du point de vue du TIC que si le transport de cholestérol par la voie des LDL, finalement éliminées par le foie, est optimal.⁴⁹⁵ Sinon, l'inhibition de la CETP pourrait montrer un effet pro-athérogénique si la clairance des LDL ou le flux total de cholestérol au niveau hépatique est réduit.

Plusieurs molécules ont été synthétisées au cours des années dans ce but. Leur utilisation a été associée dans un cas à des effets secondaires augmentant le risque CV, tandis que d'autres sont encore en cours d'essais.

3.2.6.2.1.1. Le torcetrapib (Tor)

Le torcetrapib a été le premier inhibiteur de CETP à être testé chez l'humain lors d'essais cliniques.⁵¹⁰ Le Tor se lie à la CETP en formant un complexe triple

avec la particule de HDL.⁵¹¹ Cependant, lors de la phase III des essais cliniques, l'étude ILLUMINATE (*Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events*) chez des patients traités simultanément avec l'atorvastatine, des effets cardiovasculaires ainsi que des cas de décès ont été rapportés chez le groupe traité au Tor, menant à la cessation de l'étude.⁵¹² Les effets néfastes ont été partiellement attribués à l'élévation d'environ 5,4 mmHg de la pression artérielle systolique chez les patients recevant le Tor.⁵¹³ Des essais sur des cellules surrénales humaines ont permis d'expliquer que les effets non ciblés du Tor découlent d'une stimulation de la synthèse d'aldostérone dépendante d'une voie indépendante de l'inhibition de la CETP.⁵¹⁴ Cependant, une hausse de 72 % du HDL-C ainsi qu'une réduction de 25 % du LDL-C avaient été observées.⁵¹² Globalement, les études sur le Tor n'ont pas diminué l'intérêt pour l'inhibition de la CETP en tant que stratégie thérapeutique, puisque le profil lipidique obtenu était satisfaisant en terme de risque CV..

3.2.6.2.1.2. Le dalcetrapib (Dal)

D'autres composés ont été étudiés et semblent permettre l'étude des inhibiteurs de la CETP sans conséquences néfastes telles que causées par le Tor. Le Dal est un composé différent du Tor de par sa structure et son mécanisme d'action. En effet, le Dal lie la CETP de manière irréversible et est moins efficace que le Tor, puisqu'il possède un moins grand effet sur l'augmentation des niveaux plasmatiques du HDL-C chez l'humain. En effet, une augmentation de 130%⁵¹⁵ des niveaux de HDL-C est observée avec l'action du Tor tandis qu'une augmentation maximale de 36%⁵¹⁶ est notée avec le Dal. Le Dal induit un changement de conformation de la CETP, ce qui entrave sa capacité de se lier à la particule de HDL dans le plasma.⁵¹¹

Une étude a été menée sur des hamsters avec le Dal et a permis d'observer une hausse du TIC.⁵¹⁷ De plus, dans des essais cliniques chez des donneurs sains, un traitement de 4 semaines avec le Dal s'est accompagné d'une hausse de 23 % du HDL-C par rapport aux non-traités.⁵¹⁸ Puis, chez des patients dyslipidémiques, un traitement de 4 semaines avec le Dal a augmenté de 28 % le HDL-C et baissé de

7 % le LDL-C.⁵¹⁹ Dans ces deux études, aucun changement dans la pression sanguine systolique ou dans les niveaux d'aldostérone n'a été noté.

De plus, dans une étude multicentrique nommée dal-PLAQUE-1, on a récemment évalué par des techniques d'imagerie non-invasive des indices structurels et inflammatoires de l'athérosclérose. Une cohorte de 130 patients avec, ou courant le risque de développer, une MCAS ont reçu aléatoirement le Dal ou le placebo sur une période de 24 mois cette étude de phase IIb.⁵²⁰ Les indices de la morphologie des vaisseaux (aire totale du vaisseau) ont été mesurés par IRM (imagerie par résonance magnétique) après 24 mois, tandis que les indices de l'inflammation artérielle ont été mesurés par PET-CT (*positron emission tomography-computed tomography*) après 6 mois.⁵²⁰ L'aire totale du vaisseau évalué par IRM a démontré une diminution dans le groupe traité au Dal comparé au placebo.⁵²⁰ L'analyse des artères coronariennes par PET-CT a démontré une réduction de 7 % du TBR (*diseased-segment target-to-background ratio*) dans le groupe Dal par rapport au placebo.⁵²⁰

Malgré ces résultats sur l'effet de Dal conduisant à l'amélioration de niveaux de HDL-C, l'utilisation des inhibiteurs de la CETP est présentement remise en question en se basant sur l'étude de phase III dal-OUTCOMES qui évaluait les effets du traitement avec le Dal chez des patients atteints de syndrome coronarien aigu. En effet, l'effet du Dal a récemment été jugée futile par rapport au traitement de base par un comité indépendant DSMB (*Data and Safety Monitoring Board*) après qu'une évaluation intérimaire de 75 % des données ait suggéré que l'ajout du traitement Dal à d'autres traitements standards existants apportait une efficacité clinique non significative et malgré l'absence d'effets néfastes.⁵²¹ Ceci a mené Hoffman-La Roche à interrompre les études du programme Dal-HEART, incluant l'étude dal-PLAQUE-2 qui tentait à long terme les effets du Dal sur les changements observés dans les plaques athérosclérotiques de patients atteints de maladies coronariennes.

3.2.6.2.1.3. L'anacetrapib (Ana)

Un autre inhibiteur de la CETP est l'anacetrapib (Ana), un inhibiteur dont la structure se rapproche du Tor, sans partager toutefois les mêmes propriétés que Tor pour la production d'aldostérone.⁵¹⁰ Ana forme un complexe de haute affinité avec la CETP de manière réversible et est un inhibiteur ayant une efficacité de liaison plus grande que le Dal.

Dans des essais cliniques sur des donneurs sains, l'administration d'Ana durant 10 jours a permis d'augmenter de 139 % et diminuer de 38 % les niveaux de HDL-C et LDL-C respectivement.⁵²² De même, chez des patients dyslipidémiques traités avec l'atorvastatine, où l'Ana a été donné durant 8 semaines, on a observé une hausse de 120 % et une diminution de 30 % des niveaux de HDL-C et LDL-C respectivement.⁵²³ De plus, une diminution de 50 % des niveaux plasmatiques de Lp(a) a aussi été notée suivant l'administration d'Ana.⁵²³ En plus de ses effets sur les paramètres lipidiques plasmatiques, Ana agit aussi sur la fonction des HDL en promouvant un plus grand efflux de cholestérol à partir des macrophages spumeux vers les HDL de patients traités 8 semaines avec l'Ana comparé aux patients traités avec un placebo.⁵²⁴

De plus, un autre essai clinique de phase III, l'essai DEFINE (*Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib*) a été conduit afin d'évaluer une administration quotidienne d'Ana durant 18 mois sur les niveaux de LDL-C, d'HDL-C et de Lp(a) sur une cohorte de patients atteints de maladies coronariennes. Une diminution de 40 % et de 36 % des niveaux de LDL-C et de Lp(a) a été établie comparativement aux patients ayant reçu le placebo.⁵²⁵ De plus, une hausse de 138 % du HDL-C a aussi été observée.⁵²⁵

D'autres essais cliniques sont à l'ordre du jour dont l'étude de phase III REVEAL (*Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid modification*) qui vise à déterminer l'effet de l'Ana sur le nombre d'événements coronariens majeurs chez une cohorte de patients atteints de maladies

coronariennes. Avec les informations qui seront obtenues des études en cours, de meilleurs fondements pour l'utilisation en clinique des inhibiteurs de la CETP pourront être établis.

3.2.6.2.2. La niacine (acide nicotinique)

Une autre approche, qui vise à hausser les niveaux de HDL-C plasmatiques, est l'emploi de la niacine. Elle ne doit pas être négligée puisque cette molécule demeure le médicament le plus efficace disponible pour augmenter de 20-30 %⁵²⁶ les niveaux de HDL-C et de 24 % les niveaux d'apoA-I.⁵²⁷ La niacine est une vitamine hydrosoluble de la classe B, qui se lie au récepteur GPR109A présent sur les adipocytes, permettant la diminution de la formation de TG par l'inhibition de l'enzyme limitante impliquée dans leur synthèse, la DGAT2 (*acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 2*), qui estérifie les diglycérides en triglycérides.⁵²⁸

De plus, la niacine est connue pour augmenter le catabolisme de l'apoB, ce qui induit une diminution de la production et de la sécrétion de lipoprotéines à apoB-100 par le foie.⁵²⁸ La niacine réduit aussi le catabolisme des HDL en diminuant l'expression de la partie F₁ du récepteur F₁-ATPase, résultant en une baisse de la captation de la particule entière par le foie.⁵²⁸

La renommée de la niacine repose sur des résultats positifs de plusieurs études menées sur des patients atteints de maladies coronariennes. En effet, dans une étude de patients atteints de maladie coronarienne, un traitement à la niacine a fait régresser l'épaisseur intima-média des carotides par rapport au groupe traité à l'ézétimibe, un traitement connu pour diminuer le LDL-C.⁵²⁹ De plus, le groupe traité à la niacine a démontré une hausse de 23 % du HDL-C malgré une légère hausse de 7 % du niveau des LDL-C.⁵²⁹

L'étude AIM-HIGH (*Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglycerides and Impact on Global Health Outcomes*) sur les effets de la niacine en combinaison avec des traitements diminuant le LDL-C est parue dernièrement.⁵³⁰ Cette étude s'échelonnant sur trois ans a rassemblé une

cohorte de 3414 patients souffrant de MCV, qui ont tous reçu un traitement avec la simvastatine (et l'ézétimibe si nécessaire) en combinaison avec la niacine ou le placebo. Après deux ans de traitement, le groupe niacine a démontré une hausse de HDL-C et une diminution des niveaux de TG et de LDL-C.⁵³⁰ Néanmoins, aucun avantage clinique supplémentaire n'a été observé en lien avec cette combinaison de niacine avec les statines malgré les résultats encourageants des niveaux de HDL-C et de TG. Les résultats d'une autre étude sur les propriétés bénéfiques de la niacine, soit l'étude HPS2-THRIVE (*Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events*) vont être communiqués au cours de l'année à venir.

Malgré ses effets bénéfiques sur le métabolisme des lipides, la niacine comporte des effets indésirables sur la peau qui se caractérise par un rougissement du visage et d'autres parties du corps. Ce rougissement de la peau est le résultat d'une vasodilatation cutanée, qui mène à une sensation de chaleur et d'irritation.⁵²⁸ Cette vasodilatation est initiée par l'activation de la formation des prostaglandines D₂ (PGD₂) et E₂ (PGE₂), qui se lient respectivement à leur récepteur PGD₂ (DP1) et PGE₂ (EP2 et EP4) dans la peau.⁵³¹

À cet effet, un nouvel agent thérapeutique, le Cordaptive (MK-0524A) qui est une combinaison de la niacine et d'un bloqueur de DP1, le laropiprant a été proposé pour prévenir la vasodilatation due à l'activation de la PGD₂.⁵²⁸ Ce dernier est aussi en cours d'évaluation dans l'étude HPS2-THRIVE. Après une utilisation de la niacine s'échelonnant sur près de 50 ans, ce composé pharmacothérapeutique demeure le plus efficace des agents connus pour augmenter les niveaux de HDL-C.⁵³²

3.2.6.3. Les agonistes du LXR

Les agonistes du LXR, comme mentionné précédemment, agissent au niveau de facteurs de transcription qui augmentent la mobilisation du cholestérol intracellulaire, l'efflux de cholestérol par les voies d'ABCA1 et d'ABCG1 et qui permettent la génération d'HDL d'origine intestinale et hépatique.⁴⁹⁵ En effet, ce

sont des régulateurs de l'expression de plusieurs gènes incluant l'apoE, la LCAT, la CETP, la LPL et l'ABCG5/G8, ce qui résulte en une coordination à la hausse du TIC.⁵³³

Leur utilisation dans les modèles *in vivo* de souris et de hamster les qualifie comme des composés pouvant stimuler le TIC puisqu'ils promeuvent le TIC des macrophages aux fèces *in vivo* et qu'ils démontrent un effet athéroprotecteur en diminuant le développement de l'athérosclérose.^{467,534-536}

Cependant, dans une étude sur des humains avec l'agoniste non sélectif de LXR α et LXR β , le LXR-623, des effets néfastes sur le système nerveux central ont été constatés menant à l'arrêt de cet essai clinique malgré la hausse de l'expression d'ABCA1 et d'ABCG1 systémique.⁵³⁷

De plus, ce type d'agents pharmaceutiques peut aussi agir sur la CYP7A1 et sur la paire ABCG5/G8 au niveau hépatique pour initier le transport de cholestérol vers la bile.⁵³⁸ Cependant, l'action des agonistes du LXR α ne se limite pas aux effets bénéfiques sur le TIC, mais cause aussi une stimulation à la hausse de l'expression de la SREBP-1c²¹⁷ qui cause une hausse de la synthèse d'acides gras, une hausse de la teneur en TG dans les VLDL et une accumulation de lipides (stéatose) dans les hépatocytes.^{217,539}

Or, un agoniste systémique et non sélectif des isoformes du LXR, soit le GW3965 a été étudié dans un modèle de souris déficientes en LXR α et en apoE et l'on a observé une nette amélioration des niveaux plasmatiques du HDL-C et une diminution du développement de la plaque au niveau de l'aorte.⁵⁴⁰ Ceci démontre que des agonistes du LXR β pourraient constituer une alternative possible pour augmenter le TIC sans entraîner des effets indésirables comme une hypertriglycéridémie.

De plus, d'autres cibles que les macrophages peuvent être activées par la voie des LXR, notamment dans l'intestin, qui lui aussi contribue à la régulation du TIC. En effet, un agoniste du LXR, non sélectif du LXR α et LXR β , mais ciblant uniquement l'intestin, soit le GW6340, a augmenté le TIC des macrophages aux fèces, avec une hausse de 52 % des stérols marqués radioactivement dans les fèces, et ceci, par la production d'HDL au niveau intestinal dans un modèle de souris.⁵³⁶ De plus, une stimulation des gènes cibles du LXR α intestinal impliqués dans la sécrétion du cholestérol dans le compartiment plasmatique (ABCA1) et luminal (ABCG5/ABCG8) a été observée. Ceci a mené à une hausse des niveaux de pré- β -HDL, qui s'est reflétée par une amélioration du TIC et par une diminution du volume de la plaque au niveau aortique chez des souris transgéniques exprimant une protéine de fusion, le VP16-LXR α sous le contrôle du promoteur de la villine.⁵⁴¹ Les agonistes ciblant le LXR au niveau intestinal sont donc eux aussi des voies pharmacologiques potentielles pour promouvoir le TIC.

4. Problématique et but de l'étude

Les outils pour l'évaluation du TIC chez l'humain sont présentement limités. En effet, comme mentionné précédemment, les modèles unicellulaires et le modèle utilisant les isotopes stables ne permettent d'étudier que l'étape initiale du TIC et les modèles *in vivo* de souris et de hamsters permettent une étude du TIC spécifique aux macrophages, ce qui occasionne une dilution du signal radioactif dans l'animal, vu la part quantitativement minime que ceux-ci jouent dans le TIC. De plus, ces derniers sont dispendieux en temps et diminuent l'efficacité de l'analyse du TIC.

Or, un système d'étude du TIC réunissant les avantages et éliminant les désavantages des méthodes déjà en place serait utile pour l'évaluation de la régulation du TIC et de sa pertinence dans l'athérogénèse.

Nous proposons d'élaborer un système de co-culture *in vitro* afin de pouvoir évaluer les étapes du TIC. Ce système de co-culture veut combiner les avantages apportés par l'utilisation des systèmes unicellulaires d'efflux et ceux apportés par

les modèles *in vivo*. En effet, notre système repose sur la présence de deux types cellulaires différents mis en co-culture. Ce système permet d'effectuer des essais de flux de cholestérol marqué au tritium entre les deux types cellulaires, pour étudier, par exemple, le transfert de cholestérol entre des macrophages et des cellules hépatiques.

Notre objectif est d'utiliser ce nouveau modèle de TIC pour prédire la charge athérosclérotique d'un patient et le risque CV qui en découle, pour qualifier et quantifier l'efficacité d'un traitement donné à un patient par l'entremise de l'analyse de sérums de patients et pour évaluer de nouveaux traitements contre l'athérosclérose par leur effet sur le TIC *in vitro* avant même de l'appliquer chez l'humain.

MÉTHODES DÉTAILLÉES

1. Préparation de lipoprotéines et de sérums.

1.1. Isolement des LDL et HDL à partir du plasma humain ⁵⁴²

Les LDL humaines ont été obtenues à partir de plasma humain mis en commun (n=10 volontaires sains) additionné d'EDTA (Bioreclamation, Huntsville, NY, États-Unis) par ultracentrifugation séquentielle isopycnique. À cette fin, on a ajouté au plasma fraîchement collecté 0,01 % d'azoture de sodium (NaN_3) et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) à titre d'inhibiteurs de la croissance bactérienne et de protéases, respectivement. Puis, la densité originale du plasma (1,006 g/mL) a été haussée à la densité maximale des VLDL (1,019 g/mL) par ajout de bromure de potassium (KBr) selon la formule de Radding et Steinberg.⁵⁴³

Le plasma ajusté a ensuite été centrifugé dans les tubes Optiseal (Beckman-Coulter, Mississauga, Ont., Canada.) durant 16 h à 129 024 g à 16 °C dans le rotor 50,2Ti (Beckman) pour faire flotter les VLDL. Les tubes ont été coupés à la hauteur désirée avec le Tube Slicer (Beckman Coulter, Mississauga, Ont., Canada) pour récupérer le sous-nageant contenant les LDL et les HDL. Ensuite, la densité du sous-nageant a été haussée à la densité maximale des LDL (1,063 g/mL) pour les faire flotter par une ultracentrifugation de 16 h à 129 024 g dans le même rotor.

Les LDL ont été lavées à la même densité pour s'assurer de leur pureté, qui a été vérifiée par gel d'agarose 0,75 % coloré pour les protéines avec du bleu de Coomassie (Biosafe Coomassie, Bio-Rad, Saint-Laurent, Qc, Canada).

Les HDL totales ont été isolées à la densité maximale de 1,21 g/mL dans le même rotor, puis lavées et caractérisées de la même façon. Avant leur utilisation, toutes les lipoprotéines ont été dialysées extensivement dans 4 L (deux fois) de tampon Tris salin (TBS) au pH physiologique de 7,4 de façon à les débarrasser de leur KBr et ce, dans l'obscurité.

1.2. Préparation de sérum déplété en apolipoprotéine B ⁴²³

En plus d'utiliser du sérum humain complet et des lipoprotéines isolées de plasma sanguin comme accepteurs de cholestérol dans les essais, du sérum humain déplété en apoB est aussi utilisé. Ceci permet de n'avoir que les composantes riches en apoA-I.

Pour ce faire, un volume de 0,4 mL d'une solution de polyéthylène glycol ayant un poids moléculaire de 6000 daltons (PEG-6000) à une concentration de 20 % dans un tampon glycine 200 mM à pH 7,4 est ajoutée à un volume de 1 mL sérum humain complet non-dilué. Ce polymère est utilisé comme un agent de précipitation qui attire de manière non-ionique les molécules d'eau de la couche d'hydratation autour des protéines, et augmente ainsi la formation d'interactions protéines-protéines, qui occasionnent la précipitation des lipoprotéines contenant l'apoB. Des mouvements d'inversions sont faits afin d'assurer une homogénéité de la solution. La solution est alors incubée sur glace, (4°C), durant 20 min. Par la suite, on centrifuge le tube durant 30 min à une vitesse de 9 408 g à 4°C pour sédimenter le précipité. Une fois la séparation exécutée, on récolte le surnageant, soit le sérum déplété en apoB.

1.3. Préparation des LDL acétylés (LDLac)

Pour obtenir la morphologie caractéristique des macrophages spumeux, une préparation de LDLac est nécessaire. Pour ce faire, à 1 mL contenant 16 mg de protéines de LDL (i.e. 16 mg/ml), on ajoute 1 mL d'acétate de sodium saturé, soit environ 4,5 M, que l'on mélange avec une agitation constante et légère à 4°C soit dans un bac de glace mis sur une plaque agitatrice. On additionne ensuite une masse d'anhydride acétique 1,5 fois supérieure à la masse de protéines contenue dans le tube, ce qui nous donne un excès de 40 fois la molarité des lysines des LDL. La réaction permet alors de modifier la majorité des lysines de l'apoB-100 des LDL en convertissant le groupement α -aminé des lysines (chargé positivement) en groupement neutre. On divise cette masse en 6 aliquotes que l'on répartit sur 1 h.

On laisse agiter 30 min de plus, toujours à 4°C. On transfère la solution dans un sac de dialyse (membrane Spectra/Por) (VWR, Mont-Royal, QC, Canada) ayant des parois poreuses. Les pores qui constituent le sac possèdent un seuil de porosité de 6-8 kiloDaltons (kDa), ce qui nous assure de retenir les LDL acétylées dans le sac. On dialyse le contenu du sac dans 4 L de tampon Tris-Buffered-Saline (TBS) deux fois à 4°C, à un pH 7,4 durant 4 h suivi de 16 h.

1.4. Dosage de protéines selon la méthode de Lowry

Pour déterminer la concentration des lipoprotéines préparées, on fait appel à une méthode de dosage de protéines : la méthode de Lowry. La méthode de Lowry est une méthode colorimétrique permettant de déterminer la concentration d'un échantillon protéique inconnue en se référant à une courbe standard. La protéine standard utilisée lors des essais est l'albumine de sérum bovin (BSA) (Fisher Scientific, Ottawa, Ont., Canada) à une concentration de 1 mg/mL. Plusieurs dilutions de cette dernière (0 à 100 µg) dans 100 µL d'eau distillée permettront d'obtenir une courbe standard. De même, on dose un volume donné de la solution de concentration inconnue dans un volume final de 100 µL d'eau distillée. On ajoute aux solutions de la courbe standard ainsi qu'à la solution à doser 1 mL d'une solution fraîchement préparée contenant 48 parties de solution alcaline de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 2 % dans 0,1 N d'hydroxyde de sodium (NaOH), une partie de tartrate de sodium et de potassium (2 %) dans l'eau et une partie de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) (1 %) dans l'eau. On incube le tout 10 min à température pièce. Après ce temps d'incubation, on ajoute 100 µL du réactif Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) durant 30 min en agitant quelques secondes afin d'assurer l'homogénéité de l'échantillon. Le réactif Folin-Ciocalteu interagit avec les réactifs de la solution précédente afin de réduire les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) présents dans les échantillons et de former un complexe qui est coloré en bleu. On effectue ensuite une lecture à l'aide d'un spectromètre à une longueur d'onde de 595 nm. La lecture des absorbances obtenues permet de tracer la courbe standard et de déterminer la concentration de la solution inconnue en rapportant la valeur d'absorbance des inconnues sur la courbe.

2. Culture cellulaire

2.1. Culture cellulaire des macrophages J774 et des hépatocytes HepG2

Les macrophages de souris J774 (ATCC, TIB-67) sont cultivés dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) à haute teneur en glucose à 4,5 g/L (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) supplémenté à 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) inactivé et sont passés chaque semaine à une densité de 1 000 cellules par cm^2 dans des pétris de 100 mm. Pour préserver le niveau de variation morphologique lors des essais de TIC, les cellules de passage p^{+5} au passage p^{+15} sont utilisées lors de l'ensemencement.

Les cellules hépatiques HepG2 (ATCC, HB-8065) sont cultivées dans un milieu Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) à faible teneur en glucose à 1,0 g/L (ATCC, 30-2003) supplémenté à 10 % de FBS inactivé et sont passées à chaque semaine à une densité de 15 000 cellules/ cm^2 dans des pétris de 100 mm. De même que pour les J774, on utilise des cellules de passage p^{+2} au passage p^{+24} lors de l'ensemencement.

3. Essais cellulaires de transport de ^3H -cholestérol pour l'évaluation du TIC

3.1. Essais d'efflux de ^3H -cholestérol par la méthode classique

Les macrophages de souris J774 sont ensemencés dans des puits de 3,8 cm^2 d'une plaque de 12 puits à une densité d'environ 5 000 cellules/ cm^2 durant 72 h dans un incubateur à 37°C, 5 % CO_2 , afin d'atteindre une confluence approximative de 80-90 %.

Une fois la confluence désirée atteinte, les cellules sont rincées au tampon phosphate salin (PBS) contenant de l'albumine de sérum bovin (0,1 %) (PBS-0,1 % BSA) (Fisher) ainsi qu'un complément de calcium et de magnésium (0,1 %). Cet ajout permet d'assurer une adhésion adéquate de ce type cellulaire lors des rinçages

et d'augmenter l'efficacité de l'essai. Les macrophages sont par la suite gorgés et marqués avec 50 µg/mL de LDLac et 2 µCi/mL de ³H-cholestérol (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) durant 24 h dans un milieu DMEM riche en glucose contenant 1 % pénicilline/streptomycine et 1 % de sérum fœtal bovin (milieu de marquage). Les macrophages subissent un changement de morphologie et se transforment en cellules spumeuses.

Les cellules J774 gorgées et marquées sont rincées avec du PBS-0,1 % BSA avec calcium et magnésium et ensuite avec du DMEM supplémenté avec 0,2 % d'albumine de sérum bovin dépourvue d'acides gras (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) DMEM-0,2 % BSA. Les cellules spumeuses sont ensuite incubées en présence ou non de traitements pharmacologiques dans du DMEM-0,2 % BSA durant une nuit en triplicata. Le traitement à l'AMPc (0,3 mM) est utilisé comme agent stimulant de l'efflux de cholestérol.

Après un autre lavage au PBS-0,1 % BSA avec calcium et magnésium, on ajoute ensuite du milieu DMEM sans rouge de phénol (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) (milieu d'efflux) comportant les différents accepteurs de cholestérol, soit des lipoprotéines isolées ou un pool de sérum humain pour chaque condition étudiée. L'incubation avec le milieu se fait sur une période d'incubation de 24 h. Ce milieu d'efflux est ensuite récolté dans des tubes de 1,5 mL (Fisher Scientific, Ottawa, Ont., Canada) et centrifugé à une vitesse de 124 g durant 10 min afin de sédimenter les cellules et les séparer du milieu. Ceci évite l'introduction d'un biais dans l'analyse des résultats obtenus pour le milieu. Les cellules J774 sont lavées avec du PBS-0,1 % BSA avec calcium et magnésium et du PBS pour décrocher le cholestérol tritié libre de la surface cellulaire, qui pourrait fausser les comptes de radioactivité dans les cellules. La monocouche de J774 est alors lysée avec 0,5 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) (0,5 N) et récoltée. Les puits sont ensuite rincés avec 0,25 mL de NaOH 0,5 N additionnel. Le rinçage est combiné au lysat cellulaire de J774 pour un total de 750 µL. Une aliquote de 100 µL du surnageant du milieu d'efflux et le 1 mL de lysat cellulaire sont transférés séparément dans un vial de

20 mL contenant 15 mL de liquide à scintillation (MP Biomedical) afin de mesurer le nombre de coups par minutes (cpm) de chaque échantillon à l'aide d'un compteur β (Beckman -Coulter).

Un facteur de dilution de 10 est appliqué aux comptes pour les échantillons du milieu d'efflux. Le pourcentage d'efflux est calculé comme suit, soit le nombre de coups par minutes (cpm) retrouvé dans le milieu d'efflux sur la somme totale des cpm retrouvés dans le milieu d'efflux et retrouvés dans le lysat cellulaire de J774 de chaque échantillon multiplié par 100.

3.2. Essais de transport du ^3H -cholestérol dans un système *in vitro* du TIC du milieu d'efflux des cellules J774 sur les cellules HepG2

Ce système par transfert débute comme pour un essai d'efflux classique de ^3H -cholestérol. Cependant des étapes supplémentaires y sont ajoutées.

Les hépatocytes humains HepG2 sont ensemencés dans des puits de 3,8 cm² d'une plaque de 12 puits à une densité de 60 000 cellules/cm² durant 5 jours dans un incubateur à 37°C, 5 % CO₂, afin d'atteindre une confluence souhaitée de 80-90 %. Un changement de milieu des HepG2 est effectué après 72 h.

Au jour 5, les cellules HepG2 sont lavées avec du PBS-0,1 % BSA avec calcium et magnésium. Les surnageants du milieu d'efflux des différentes conditions, maintenant dépourvu des débris cellulaires par centrifugation, sont alors mis en commun et redistribués sur les cellules hépatiques pour un temps d'incubation identique à l'efflux, soit 24 h. Les cellules hépatiques deviennent donc les cellules réceptrices d'un milieu d'efflux conditionné par les J774.

Le temps d'incubation terminé, on récolte le milieu qui se définit maintenant comme le milieu d'influx puisqu'il a été conditionné par les cellules HepG2. La même procédure de récolte du milieu d'influx et du lysat cellulaire utilisée pour les cellules J774 est appliquée. Une aliquote de 800 μL du surnageant du milieu

d'influx et le 1 mL de lysat cellulaire de HepG2 sont transférés séparément dans un vial de 20 mL contenant 15 mL de liquide à scintillation (MP Biomedical) afin de mesurer le nombre de cpm de chaque échantillon à l'aide d'un compteur β (Beckman Coulter).

Un facteur de correction de 1,25 est appliqué aux comptes pour les échantillons du milieu d'influx. Les comptes d'influx sont alors mesurés comme étant le nombre de cpm contenus dans le lysat cellulaire des cellules HepG2.

3.3. Essais de transport du ^3H -cholestérol dans un système de co-culture *in vitro* (protocole standard)

Le système de co-culture partage les mêmes étapes initiales quant au marquage et au gorgement par les LDLac des cellules J774. L'étape d'équilibration peut différer par l'addition de différents traitements.

Dans le cadre des expériences décrites ultérieurement, la stimulation avec de l'AMPC (0,3 mM) est encore utilisée. De plus, d'autres traitements pharmacologiques stimulant l'expression de l'ABCA1 tels que les agonistes LXR naturels et synthétiques soit l'oxystérol, 22-R-hydroxycholestérol (22-OH-chol.) en combinaison avec un dérivé de la vitamine A, soit l'acide cis-9-rétinoïque (9c-RA) et l'agent synthétique TO901317 (TO) à des concentrations finales de 10 μM dans 0,1 % (v/v) DMSO sont aussi utilisés durant une incubation de 16 h. Après ce temps d'incubation, les cellules spumeuses sont lavées avec du PBS-0,1 % BSA avec calcium et magnésium.

Les cellules HepG2 dans ce système sontensemencées à une densité de 60 000 cellules/cm² sur des chambres de Boyden (Transwell plates, Corning, New York, NY, États-Unis), constituées d'un support en polystyrène et d'une membrane en polyester ayant une taille de pores de 3,0 μm , une surface de 1,12 cm² et une porosité de 2×10^6 pores/cm². Un changement de milieu est effectué après 72 h.

Après 5 jours de culture, les hépatocytes sont rincés au PBS-0,1 % BSA avec calcium et magnésium. Le système de co-culture est mis en place, c'est-à-dire que l'on place les inserts contenant les cellules HepG2 dans les puits avec la monocouche de J774. Un milieu dépourvu en rouge de phénol (4 mL), contenant les différents accepteurs de cholestérol est ajouté et partagé par les deux compartiments de la chambre de Boyden, ce dernier étant défini comme le milieu d'échange. Différents types d'accepteurs de cholestérol sont ajoutés au milieu tels que des HDL isolées, différentes concentrations de sérum humain mis en commun ou provenant de donneurs sains normolipidémiques ou du sérum déplété en apoB.

Après une période d'échange de 24 h, on récolte le milieu dans des tubes de 15 mL, que l'on centrifuge à 124 g pendant 10 min. Le système de co-culture est lavé avec du PBS-0,1 % BSA avec calcium et magnésium, puis avec du PBS. L'insert est ensuite retiré du puits, séparant ainsi les deux compartiments. Les cellules dans le fond du puits de 3,8 cm² sont lysées comme décrit précédemment.

En ce qui a trait aux membranes de polyester, elles sont détachées de leur support de polystyrène à l'aide d'une lame de rasoir et sont mises en contact avec 1 mL de NaOH 0,5 N pour une période de 30 min à température ambiante. Après ce temps, le lysat cellulaire est récolté et la membrane est rincée avec 1 mL de NaOH 0,5 N additionnel, qui est combiné au lysat cellulaire pour un volume total de 2 mL.

Une aliquote de 1 mL du surnageant du milieu, les lysats cellulaires des J774 et des HepG2 (1 mL et 2 mL, respectivement) ainsi que la membrane sont transférés dans quatre vials avec 15 mL de liquide de scintillation pour mesurer la radioactivité de chaque compartiment de la co-culture par un compteur β .

Un facteur de correction de 4 est appliqué aux comptes du milieu. De plus, un facteur de correction de 10 % et de 13 % est aussi appliqué au milieu de flux ainsi qu'au lysat cellulaire des HepG2, respectivement, pour corriger l'effet de *quench*, causé par le milieu (1 mL) et le NaOH (2 mL) échantillonnée par le compteur. En

effet, des substances colorées (milieu) ainsi que des facteurs chimiques (solution basique, le NaOH) peuvent affecter la mesure de la radioactivité dans l'échantillon, respectivement, en causant l'absorption des photons produits par l'énergie des rayonnements bêta dans le liquide à scintillation ou en réduisant l'efficacité de transfert de l'énergie des rayonnements bêta du solvant au scintillateur.

Le pourcentage d'efflux du système de co-culture est calculé comme étant la somme des comptes (en cpm) retrouvés dans le milieu, des comptes dans le lysat cellulaire des HepG2 et les comptes du résidu sur la membrane, divisée par la somme totale des comptes (en cpm) dans le système, soit dans les cellules J774, dans le milieu, dans le lysat cellulaire des HepG2 et du résidu sur la membrane, le tout multiplié par 100.

Les comptes d'influx sont mesurés comme étant le nombre de cpm contenus dans le lysat cellulaire des cellules HepG2.

3.3.1. Essais dans un système de co-culture *in vitro* pour déterminer la densité optimale d'ensemencement des HepG2

La densité optimale d'ensemencement des HepG2 a été évaluée lors d'expériences préliminaires pour la culture des HepG2 sur la membrane de l'insert. Différentes concentrations cellulaires ont étéensemencées et ont été cultivées sur une période de 5 jours, où un changement de milieu a été effectué au jour 3. Au jour 5, les cellules HepG2 ont été rincées avec du PBS. Les inserts ont ensuite été traités avec trois solutions d'un ensemble de coloration Kwik-Diff (Thermo Scientific). Ainsi, les inserts ont été incubés 30 sec dans 2 mL d'une solution composée de méthanol, d'éosine et de bleue de méthylène, successivement. La solution de méthanol permet de fixer la forme des cellules et les deux autres permettent la coloration des cellules. Cette méthode a rendu possible l'estimation de la confluence cellulaire sur la membrane de l'insert par analyse d'images à l'aide d'ImagePro 7,0.

3.3.2. Essais de transport du ^3H -cholestérol dans un système de co-culture *in vitro* pour déterminer la proportion de ^3H -cholestérol associée aux cellules HepG2

Afin de déterminer la proportion associée aux cellules HepG2 et celle associée à l'adsorption de ^3H -cholestérol par la membrane poreuse, un essai a été mené avec différentes méthodes de solubilisation des cellules sur la membrane. La solubilisation des cellules J774 contenues dans les puits (Lysat J774-puits) ainsi que la récolte du milieu de transport (Milieu) ont été effectuées de la même manière dans les deux cas. Les deux méthodes de solubilisation pour les cellules sur la membrane sont: 1) la méthode standard (M1) par laquelle la solubilisation de la membrane se fait avec du NaOH 0,5 N afin d'en récolter le lysat cellulaire des HepG2 (Lysat HepG2-M1), et 2) la méthode par trypsination (M2), qui fait appel à une incubation de 5 min sur les cellules HepG2 avec de la trypsine-ETDA 1X (Sigma), suivie d'une inactivation de celle-ci avec du EMEM-10 % FBS. Cette dernière méthode permet de détacher les cellules de la membrane et de récolter celles-ci par une centrifugation à 124 g durant 10 min (Cellules HepG2-M2). Les membranes récoltées après la solubilisation cellulaire par la M1 (Résidu-membrane-M1) et par la M2 (Résidu-membrane-M2) sont alors également comptées par scintillation afin d'en connaître le résidu de ^3H -cholestérol.

3.3.3. Essais de ^3H -cholestérol dans un système de co-culture *in vitro* pour déterminer l'effet de différents revêtements sur l'adsorption non-spécifique du ^3H -cholestérol sur la membrane.

Différents revêtements de la membrane poreuse ont été évalués afin d'essayer de minimiser les résidus de ^3H -cholestérol. Avant l'ensemencement des cellules HepG2 pour l'essai de ^3H -cholestérol, les inserts ont été prétraités respectivement avec du EMEM-10 % FBS, de l'alcool polyvinylique (1 %) (Sigma), de la BSA (0,5 %) (Sigma) ou avec de la poly(L)-lysine (0,01 %) (Sigma) durant 1 h à 37°C. Après le prétraitement, les inserts ont été rincés avec du PBS pour permettre

l'ensemencement des cellules HepG2 sur la membrane. Les procédures subséquentes ont été celles de la méthode standard.

3.3.4. Essais de ^3H -cholestérol dans un système de co-culture *in vitro* pour déterminer l'effet de différents types d'inserts sur l'adsorption non-spécifique du ^3H -cholestérol sur la membrane.

De plus, différents types de membranes ont été évalués. La méthode standard a été utilisée pour évaluer le TIC dans différents types d'inserts (Corning) où la membrane était faite de polycarbonate (PC), de polyester (PE) en présence ou non d'un revêtement en collagène (Coll.), avec des tailles de pores de 0,4 ou 3,0 μm .

4. Immunobuvardage (Western blot)

Afin de valider les résultats obtenus lors des essais de ^3H -cholestérol pour évaluer le transport du cholestérol, des immunobuvardages (Western blot) ont été effectués. L'implication des différents transporteurs tels que l'ABCA1 et le SR-BI ainsi que la modulation de leur expression par l'entremise de différents traitements tels que le gorgement cellulaire par les LDLac et la stimulation par l'AMPc et des agonistes LXR ont été observées.

La préparation des lysats des deux types cellulaires utilisés dans le système de co-culture, a été faite à l'aide d'un tampon de lyse RadioImmunoPrecipitation Assay (RIPA) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases pour usage général (numéro de catalogue : P2714, Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) pour les protéases à sérine (*AEBSF, Aprotinin, EDTA, Leupeptin hemisulfate salt*), à cystéine (*E-64, Leupeptin hemisulfate salt*) et les métalloprotéases (*EDTA*).

Le dosage des protéines a été effectué en usant d'un ensemble de dosage de BCA (Pierce) puisqu'une interférence entre le tampon de lyse RIPA et les réactifs de la méthode de Lowry a été observée. Des quantités de protéines s'échelonnant de 20-40 μg ont été mises sur des gels d'acrylamide de 7,5 % avec tampon réducteur

de chargement (stock 4 fois concentré : (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10 %; 2-mercaptoéthanol 2 M; sucrose 1,2 M, EGTA 0,2 M; bleu de bromophénol 0,4 mM). Une échelle de poids moléculaire (Bio-Rad, Saint-Laurent, Qc, Canada) a été ajoutée parallèlement aux échantillons afin de pouvoir estimer la taille en kDa des bandes révélées. Les échantillons ont été chauffés durant 30 min. à 37°C pour ABCA1 ou 5 min. à 95°C pour SR-BI, ce qui permet de dénaturer les protéines et de les réduire. Les échantillons mis sur gel ont migré environ 1 h 30 dans du tampon de migration pH 8,6 (25 mM Trizma Base, 192 mM glycine, 0,1 % SDS, ddH₂O) à un voltage de 200 V. Après la migration des échantillons, les protéines du gel d'acrylamide ont été transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) dans un tampon de transfert 1X pH 8,6 (25 mM Trizma Base, 192 mM glycine) durant 3 h à 100 V, ou durant 16 h à 20 V à une température de 4°C. Afin de détecter les bandes d'intérêt, la membrane incubée avec un anticorps primaire de lapin anti-humain ABCA1 (Novus Biologicals, NB 400-105, Oakville, Ont., Canada) à une dilution de 1/1000 et à un anticorps primaire de lapin anti-souris de SR-BI (Novus Biologicals, NB 400-104, Oakville, Ont., Canada) à une dilution de 1/5000. La détection de ces deux protéines a été faite par le même anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) à une dilution de 1/1000. Un immunobuvardage d'une protéine domestique, la β -actine, a aussi été effectué afin de pouvoir rapporter les changements d'intensité sur une protéine dont le niveau d'expression demeure habituellement stable.

Le signal sur les membranes a été révélé par un ensemble de détection ECL (Western Lightning Chemiluminescence Reagent plus NEL104) (PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis) sur des films (Kodak) dans la noirceur avec différents temps d'exposition variant entre 30 sec et 2 min. Les films ont été analysés par ImageQuant 5 (GE Healthcare).

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées lors de mes essais sont le test t de Student non apparié ainsi qu'une analyse de variance (ANOVA) à un critère de classification, suivi d'un post-test de Tukey. Ces derniers ont été effectués avec le logiciel Prism version 5,03 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). De plus, une valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée comme significative. Les données sont représentées par la valeur moyenne plus ou moins l'écart-type (S.D).

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

1. Transport du ³H-cholestérol par efflux classique.

1.1. Dose-réponse avec différentes concentrations d'apoA-I et de HDL isolées.

L'utilisation de différents types d'accepteurs extracellulaires du cholestérol permet l'étude de la contribution des différentes voies impliquées dans la modulation de l'efflux de cholestérol à partir des macrophages. Tout d'abord, une expérience de dose-réponse a été établie avec de l'apoA-I purifiée ainsi que la fraction totale des HDL isolées de plasma humain. Les résultats obtenus démontrent un efflux avec des cellules J774, prétraitées ou non à l'AMPc, vers un milieu contenant soit de l'apoA-I (0-20 µg/mL) (Figure 5 A, p.114) soit un milieu contenant des HDL (0-60 µg/mL) (Figure 5B, p.114) pendant 24 h. L'efflux de ³H-cholestérol vers l'apoA-I permet d'observer une différence significative entre la condition traitée à l'AMPc et celle non-traitée à partir d'une concentration de 10 µg/mL, tandis qu'aucune différence significative n'est notée dans les valeurs d'efflux pour les cellules ayant subi un prétraitement à l'AMPc par rapport à celle sans traitement pour les concentrations de HDL étudiées. Puisque que le traitement à l'AMPc est couramment utilisé pour observer l'efflux de cholestérol par la voie d'ABCA1, ceci démontre bien que l'apport d'apoA-I comme accepteurs de cholestérol dans le milieu de culture stimule l'efflux à la hausse et que l'efflux médié par ABCA1 a très peu d'influence sur l'efflux vers les HDL isolées, qui emprunte plutôt les voies d'ABCG1 et de SR-BI.

Cependant, lorsque l'on compare les cellules traitées ou non avec l'AMPc et exposées à l'apoA-I ou HDL avec le DMEM seul, c'est-à-dire un milieu ne contenant aucun accepteur de cholestérol, on peut distinguer des valeurs d'efflux de ³H-cholestérol significativement différentes à partir de la concentration de 5 µg/mL pour l'apoA-I et 10 µg/mL pour les HDL.

De plus, des courbes de régression non-linéaire ont été effectuées pour la dose-réponse avec l'apoA-I et les HDL isolées. Un modèle de saturation par liaison a été choisi, qui suppose la contribution d'un compartiment non-spécifique et spécifique. Pour l'apoA-I, on distingue bel et bien deux courbes différentes pour les cellules J774 traitées à l'AMPc ou non, et ce basé sur des paramètres statistiquement différents. En effet, la valeur maximale d'efflux du compartiment spécifique (Bmax) est grandement augmentée en présence du traitement à l'AMPc (51,9 %) par rapport à la condition sans stimulation (22,6 %). Un autre paramètre qui appuie la distinction entre les deux courbes est la concentration d'apoA-I permettant d'atteindre la moitié du Bmax, soit le Kd. Le Kd de la courbe représentant celle du traitement des cellules illustre une concentration de 16,2 µg/mL tandis que cette concentration est de 9,1 µg/mL pour la courbe des cellules non-traitées. Malgré ces paramètres différents, le bruit de fond ainsi que la pente du compartiment non-spécifique (NS), correspondant à l'efflux basal en absence d'apoA-I demeurent négligeable.

En ce qui a trait à la régression pour la dose-réponse des HDL, aucune distinction n'est révélée entre les deux courbes représentant celles traitées ou non l'AMPc. En effet, les valeurs de Bmax (11,6 vs 13,8 % d'efflux), de Kd (18,1 vs 24,5 µg/mL d'HDL), du bruit de fond (3,1 vs 3,2 % d'efflux) et du NS (0,21 vs 0,20 % d'efflux/ µg/mL d'HDL) pour les courbes en présence d'un prétraitement ou non à l'AMPc respectivement ne sont pas statistiquement différents

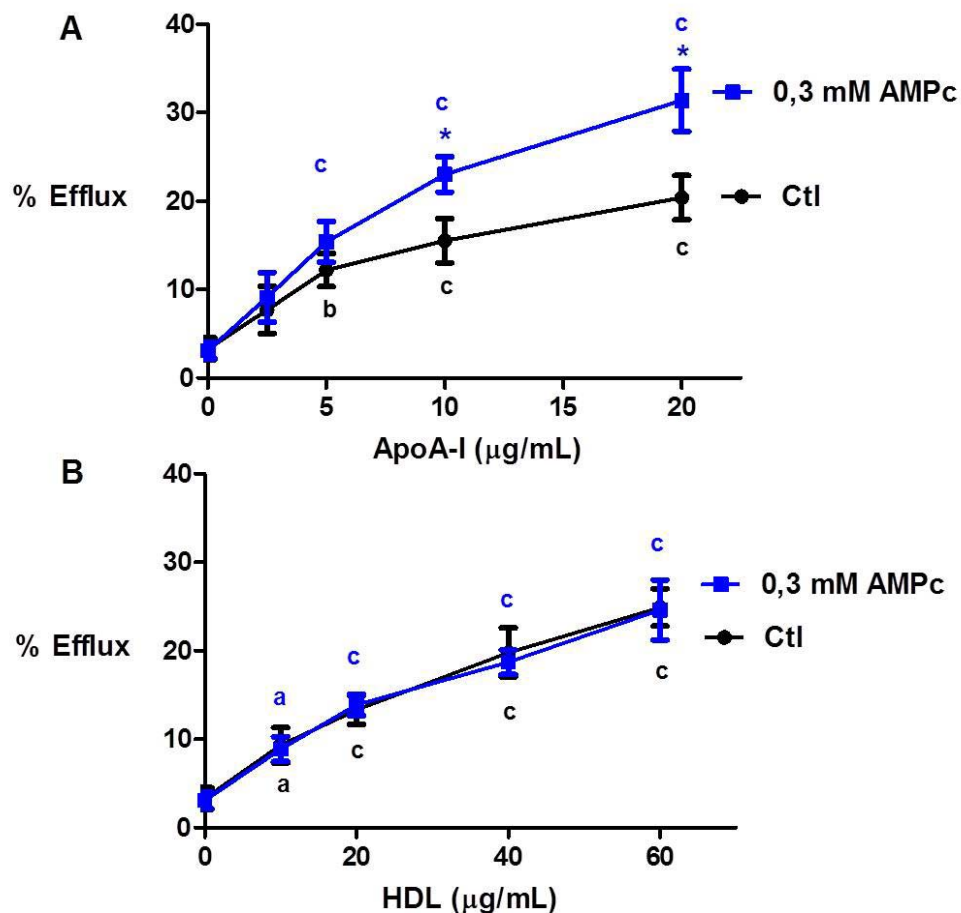


Figure 5: Pourcentage d'efflux de cholestérol lors d'une expérience de dose-réponse avec différentes concentrations d'apoA-I et de HDL isolées par efflux classique.

Les cellules J774 ont été marquées (^3H -cholestérol) et gorgées (LDLac) pendant 24 h tel que décrit dans les méthodes. Elles ont ensuite été prétraitées durant 16 h en présence ou non d'AMPc (0,3 mM), suivi d'un efflux classique de 24 h vers l'apoA-I (0-20 µg/mL) (**A**) ou des HDL totales (0-60 µg/mL) (**B**). La ligne noire correspond à la condition non traitée et la ligne bleue, à celle traitée avec l'AMPc. Les points représentent la moyenne \pm E.T. de 3 expériences réalisées en triplicata.

* $p < 0,05$ vs ctl sans AMPc: test T non apparié

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ et ^c $p < 0,001$ vs DMEM : analyse de variance à un critère, post-test de Tukey

2. Transport du ³H-cholestérol dans un système *in vitro* du TIC par transfert de milieu conditionné

2.1. Dose réponse avec différentes concentrations de sérum humain mis en commun

Pour mieux comprendre les effets de l'efflux des macrophages sur des hépatocytes lors du TIC, un système *in vitro* du TIC par transfert de milieu conditionné a été créé qui permet l'étude des voies impliquées dans l'efflux de cholestérol à partir de J774 stimulées ou non à l'AMPc et son influence sur l'étape de la captation du cholestérol dans les hépatocytes en transférant un milieu conditionné (milieu d'efflux) par les J774.

L'utilisation d'un sérum complet permet d'obtenir une analyse quantitative des différents accepteurs retrouvés dans celui-ci et permet d'étudier la contribution de chacun pour le TIC. Les résultats obtenus à la Figure 6A, p.116 démontrent tout d'abord une dose-réponse avec différentes concentrations de sérum humain (0-10 % HS) où des cellules J774 sont prétraitées ou non à l'AMPc. Le transfert de ce milieu qui est incubé pendant 24 h sur les cellules HepG2 est illustré à la Figure 6 B, p.116. On note une différence significative entre la condition traitée et celle non traitée pour l'efflux ainsi que pour la captation de cholestérol marqué hépatique uniquement à une concentration de 1 % HS. Une tendance est malgré tout présente à 2 % HS ($p=0,054$), mais n'atteint pas le seuil de significativité fixé. Une hausse de 45 % de l'efflux est associée au traitement avec l'AMPc à cette concentration de sérum. Lorsque l'on examine l'effet de la concentration de sérum comparé au DMEM seul, on observe qu'un efflux de cholestérol significatif est détecté à partir de 1 % HS pour les cellules traitées ou non avec l'AMPc.

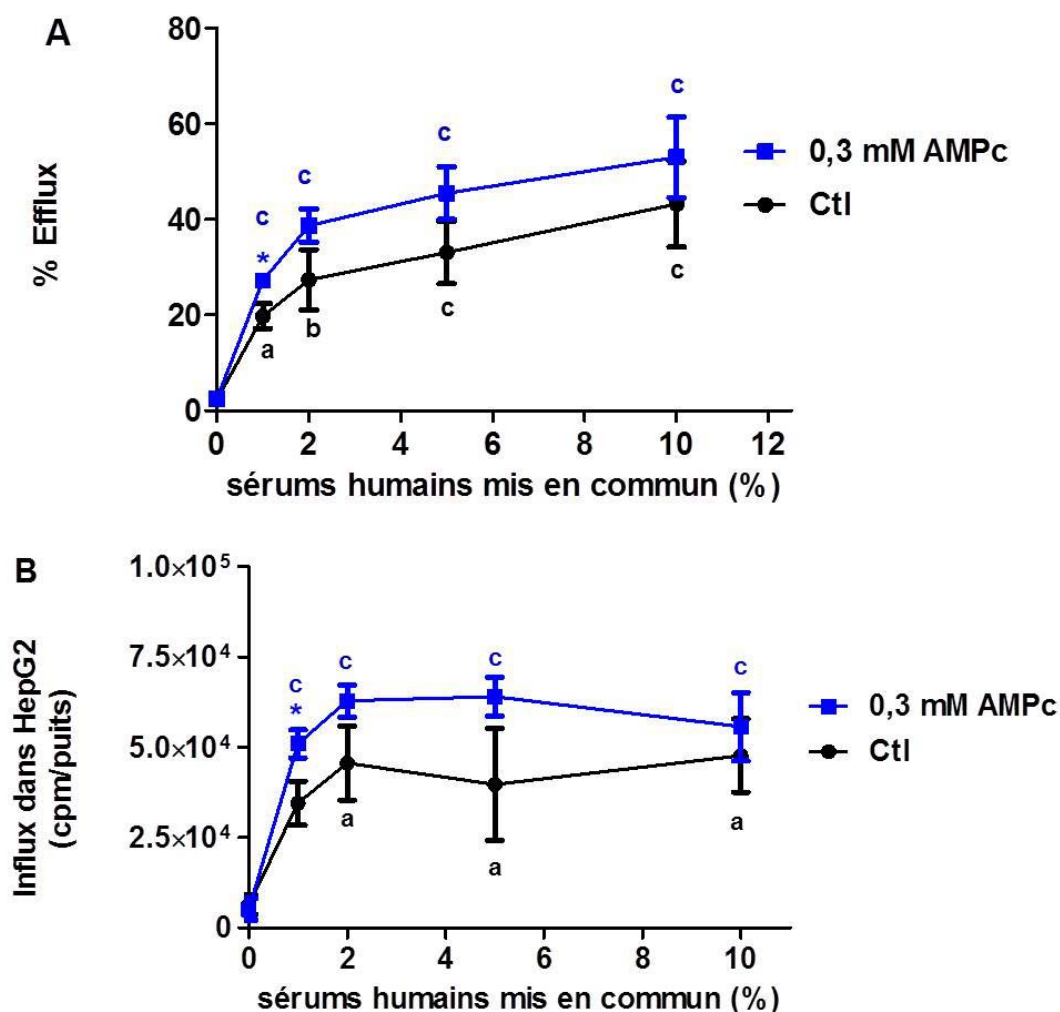


Figure 6. Pourcentage d'efflux et comptes bruts (en cpm) d'influx dans les HepG2 lors d'une dose-réponse par transfert avec des sérums humains individuels mis en commun.

Les cellules J774 ont été marquées (³H-cholestérol) et gorgées (LDLac) pendant 24 h tel que décrit dans les méthodes. Elles ont ensuite été prétraitées durant 16 h en présence ou non d'AMPc (0,3 mM), suivi d'un efflux classique de 24 h (A) et d'un transfert du milieu d'efflux des J774 sur les HepG2 durant 24 h, vers du sérum humain mis en commun à diverses concentrations par dilution avec du DMEM sans rouge de phénol(0-10 % HS) (B). La ligne noire correspond à la condition non traitée et la ligne bleue, à celle traitée avec l'AMPc. Les points représentent la moyenne ± E.T. de 3 expériences réalisées en triplicata.

* $p < 0,05$ vs ctl sans AMPc: test T de Student non apparié

^a $p < 0,05$ ^b $p < 0,01$ et ^c $p < 0,001$ vs DMEM : analyse de variance à un critère, post-test de Tukey

En ce qui a trait aux comptes récoltés dans le lysat cellulaire des HepG2, on perçoit une différence significative par rapport au DMEM seul à une concentration de 2 % HS pour les cellules J774 sans traitement et à une concentration de 1 % pour celle où les cellules ont été stimulées. Un apport supplémentaire de cpm de 45 % est aussi observé lorsque les cellules HepG2 sont incubées avec le milieu conditionné provenant des cellules J774 stimulées par l'AMPc. Au-delà de 2 % HS, une saturation des cpm dans les cellules HepG2 survient, on n'observe pas une entrée plus grande du cholestérol marqué dans les cellules acceptrices. De plus, de faibles cpm sont mesurés dans les cellules HepG2 avec le DMEM seul par rapport à ceux observés dans les cellules HepG2 incubés avec le sérum humain, ce qui permet une distinction bien marquée des cpm spécifiques au sérum.

Afin de vérifier que les courbes d'efflux et d'influx en présence ou non du traitement par AMPc soient différentes l'un de l'autre, une régression non linéaire a été effectuée. On observe bel et bien une différence des courbes d'efflux en distinguant des valeurs de Bmax (49,9 vs 27,5 % d'efflux), de Kd (0,97 vs 0,65 % de sérum humain) et de NS (0,48 vs 2,3 cpm/ % d'efflux) pour la courbe représente les cellules traitées ou non, respectivement. Les valeurs de bruit de fond demeurent cependant équivalentes pour les deux courbes. Pour les courbes d'influx, la distinction entre les deux courbes en présence ou non de l'AMPc est maintenue. En effet, des valeurs de Bmax (84 084 cpm vs 38 432 cpm), de Kd (0,72 vs 0,28 % de sérum humain), de NS (-2 873 vs 261 cpm/ % sérum humain) et de bruit de fond (5 065 vs 6 326 cpm) ont été rapportées statistiquement différentes pour la courbe indiquant les cellules stimulées ou non à l'AMPc, respectivement.

En somme, vu le soutien statistique obtenu avec 2 % HS pour la captation de cholestérol marqué hépatique, cette concentration de sérum est choisie pour poursuivre les expériences. À cette concentration de sérum humain, si l'on considère la condition sans traitement, on observe un efflux de 25 % par les cellules J774 et une entrée de 39 000 cpm dans les cellules HepG2, après soustraction de l'efflux et l'influx basal (DMEM).

2.2. Essai avec différents types d'accepteurs de cholestérol et du sérum humain mis en commun

Les voies connues pour promouvoir l'efflux de cholestérol dans les macrophages emploient chacune un substrat de prédilection. Il nous est alors paru intéressant d'étudier ces divers accepteurs de cholestérol dans le modèle cellulaire par transfert. Les concentrations de 20 et de 40 µg/mL ont été respectivement choisies pour l'apoA-I et la fraction totale des HDL isolées du plasma humain. La concentration d'apoA-I a été choisie pour observer un efflux distinguable entre la condition sans et avec traitement, où la concentration choisie représente 100 fois la concentration d'apoA-I sérique, soit 2 mg/mL. Or, la concentration protéique des HDL isolées reflète sensiblement celle retrouvée dans 2 % de sérum humain mis en commun de volontaires normolipidémiques.

L'efflux provenant des macrophages J774 vers ces trois types d'accepteurs de cholestérol est présenté à la Figure 7 A, p.120. La stimulation à l'AMPc a pu augmenter de manière significative l'efflux de cholestérol de 2,0 fois vers l'apoA-I et de 1,5 fois vers le sérum complet, une fois soustrait l'efflux basal (DMEM). Aucune différence n'est apparente pour l'efflux stimulé avec les HDL isolées. De plus, les efflux de chaque accepteur dans les macrophages stimulés ou non à l'AMPc, sont significativement différents du DMEM seul. Malgré un effet positif du traitement à l'AMPc sur l'efflux de cholestérol, ce traitement n'a pas pu augmenter de manière statistiquement significative les comptes d'influx obtenus dans les cellules HepG2 par rapport à la condition non traitée pour l'apoA-I et le sérum complet. Cependant, pour l'apoA-I, une forte tendance ($p=0,0501$) est observée.

Comme pour l'efflux, le traitement n'a pas augmenté l'incorporation de cholestérol marqué dans les HepG2 en présence des HDL isolées. (Figure 7 B, p.120) Lorsqu'on a voulu comparer les différents accepteurs de cholestérol entre eux, on a noté des différences significatives entre l'apoA-I et les HDL par rapport au sérum complet dans l'efflux de cholestérol des macrophages stimulés ou non. Pour les

comptes mesurés dans les HepG2, des différences significatives ont été notées entre la captation faite par le milieu contenant l'apoA-I et par le milieu contenant le sérum complet, sans aucune différence entre le milieu ayant des particules isolées d'HDL et le sérum complet pour les cellules non traitées. Pour la condition où les cellules hépatiques ont été incubées avec le milieu provenant de cellules stimulées, des différences significatives sont perçues pour la captation par l'apoA-I et les HDL isolées comparée à celle obtenue avec le sérum complet.

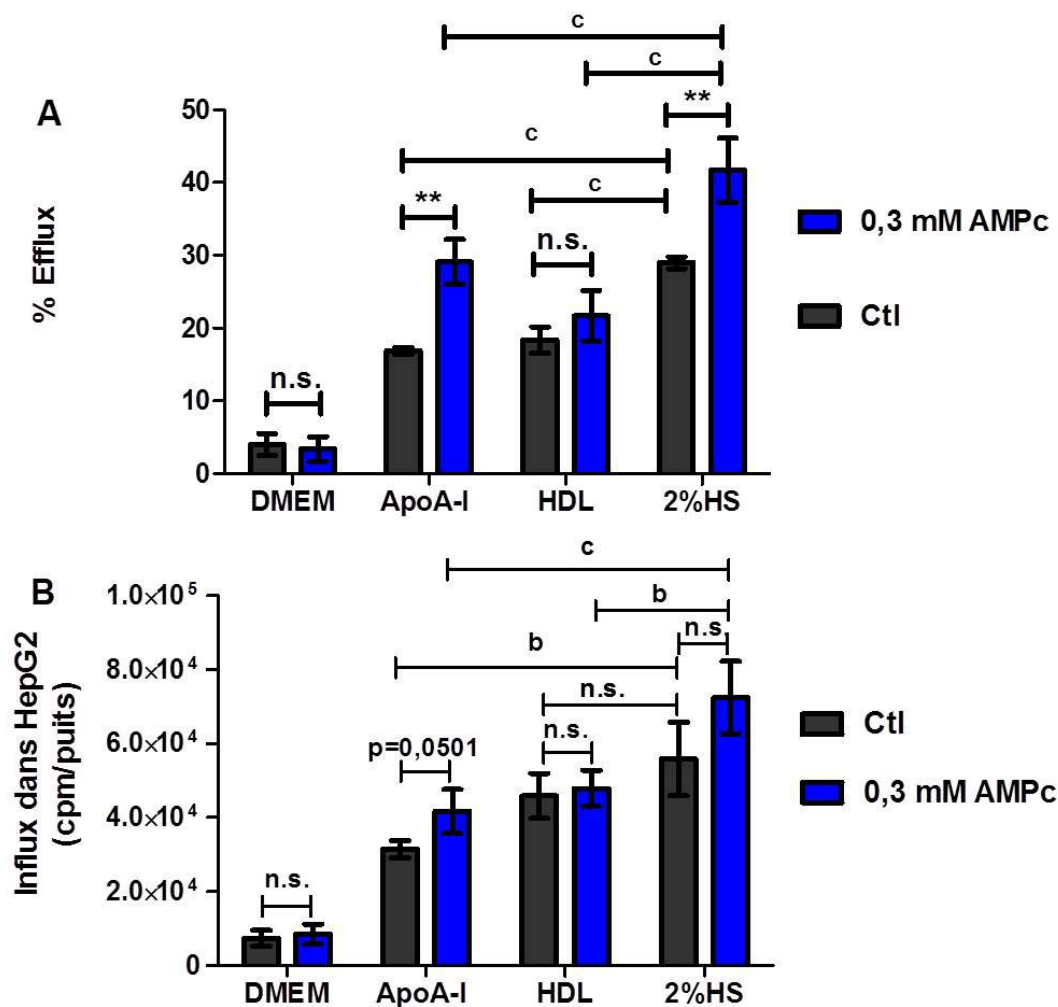


Figure 7. Pourcentage d'efflux et comptes bruts dans les HepG2 avec différents accepteurs de cholestérol par transfert.

Les cellules J774 ont été marquées (^3H -cholestérol) et gorgées (LDLac) pendant 24 h tel que décrit dans la section décrivant les méthodes. Elles ont ensuite été prétraitées durant 16 h en présence ou non d'AMPc (0,3 mM), suivi d'un efflux classique de 24 h (A) et d'un transfert du milieu d'efflux des J774 sur les HepG2 durant 24 h vers des accepteurs de cholestérol isolés comme l'apoA-I (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), des HDL totales (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et du sérum humain mis en commun (2 % HS) (B). Les barres noires correspondent à la condition non traitée et les barres bleues, le prétraitement avec l'AMPc. Les barres représentent la moyenne \pm E.T. de 3 expériences réalisées en triplicata.

** $p < 0,01$ vs ctl sans AMPc: test T de Student non apparié

^b $p < 0,01$ et ^c $p < 0,001$: analyse de variance à un critère, post-test de Tukey

3. Transport du ^3H -cholestérol dans un système *in vitro* du TIC en co-culture

3.1. Détermination de la densité d'ensemencement optimale des HepG2 dans l'insert

Avant même d'effectuer des expériences de co-culture, on a préalablement tenté d'évaluer la confluence cellulaire sur la membrane de l'insert. Pour ce faire, différentes quantités de cellules HepG2 ont été ensemencées et cultivées dans l'insert durant 5 jours.

Le pourcentage de confluence cellulaire pour chaque densité d'HepG2 de départ est illustré dans la (Figure 8, p.122). On démontre un pourcentage de la confluence cellulaire de 66 %, 83 %, 83 % et 87 % respectivement pour les densités de 20 000, 40 000, 45 000 et 60 000 cellules/cm². Aucune différence significative n'a été décelée entre les différentes densités cellulaires. De plus, une saturation de la confluence cellulaire sur la membrane de l'insert semble évidente à partir d'une densité de 40 000 cellules/cm².

Pour se prononcer sur le choix de densité cellulaire à privilégier, on a basé nos critères de sélection sur le pourcentage de confluence, qui influence l'espacement intercellulaire sur la membrane et la variabilité inter-essai. Les densités cellulaires de 20 000 et 40 000 cellules/cm² n'ont pas été choisies puisqu'elles possèdent les pourcentages de confluence les plus faibles ainsi que les variabilités inter-essais les plus élevées. Un ensemencement de départ avec 45 000 ou 60 000 cellules/cm² procure une confluence cellulaire adéquate, soit entre 80-90 % ainsi qu'une variabilité inter-essai faible.

La densité de 60 000 cellules/cm² a été retenue comme densité optimale pour l'ensemencement des HepG2 dans l'insert afin d'obtenir une réduction de l'espacement entre les cellules HepG2 sur la membrane, diminuant ainsi la possibilité que du cholestérol marqué se lie de manière non-spécifique à la membrane.

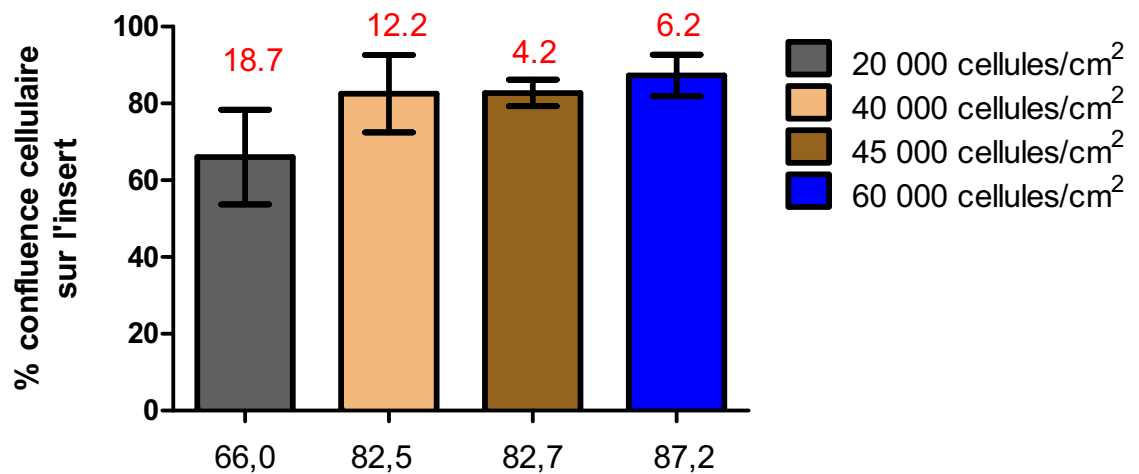


Figure 8. Détermination de densité optimale d'ensemencement des cellules HepG2 sur la membrane de l'insert du système de co-culture.

Les cellules HepG2 ont étéensemencées puis cultivées durant cinq jours sur la membrane des inserts en polyester du système de co-culture. Les inserts ont ensuite été traités avec un ensemble de coloration Kwik-Diff et la confluence cellulaire sur la membrane a été évaluée par Image-Pro 7,0. Les valeurs en rouge et en noir représentent respectivement le coefficient de variation (en %) et la confluence cellulaire (en %). Les barres représentent la moyenne \pm E.T. de 3 expériences réalisées en triplicata.

3.2. Détermination de la proportion ^3H -cholestérol associée aux cellules HepG2 dans l'insert

Une fois la densité cellulaire des HepG2 choisie, on a ensuite voulu établir la proportion des comptes retrouvés spécifiquement dans les cellules HepG2 sur la membrane. Pour ce faire, des essais de co-culture vers un milieu dépourvu en accepteurs de cholestérol, ainsi qu'un milieu contenant 2 % HS tels que décrit dans les méthodes détaillées, ont été exécutés de la manière standard ou en décollant les cellules avec une solution de trypsine-ETDA.

Le graphique présenté à la Figure 9A, p.124 représente les comptes (cpm) obtenus dans différents compartiments de la co-culture en fonction des deux méthodes de solubilisation en présence ou non de sérum complet. On peut observer les cpm récoltés dans le lysat de J774, dans le résidu laissé dans le puits, dans le milieu et dans l'insert, ces derniers étant présentés de manière isolés au graphique de la Figure 9B, p.124 afin de faciliter l'analyse.

Pour les comptes obtenus dans le lysat cellulaire de J774 et le résidu retrouvé dans le fond du puits, une légère différence d'environ 10 % et 40 % respectivement est observée entre le système de co-culture avec du DMEM seul et celui avec 2 % HS. Ce déficit en cpm est probablement attribuable en partie à une perte du ^3H -cholestérol par le matériel en plastique utilisé. Or, on estime qu'une perte de moins de 20 % est tolérable pour les expériences en co-culture. L'autre partie du déficit est probablement justifiable par le milieu contenant du sérum humain dans le cas du résidu dans le fond du puits, vu que le sérum possède une meilleure efficacité à accepter le cholestérol. De plus, 7 fois plus de cpm est noté dans le milieu de la co-culture avec du sérum comparé à la situation basale.

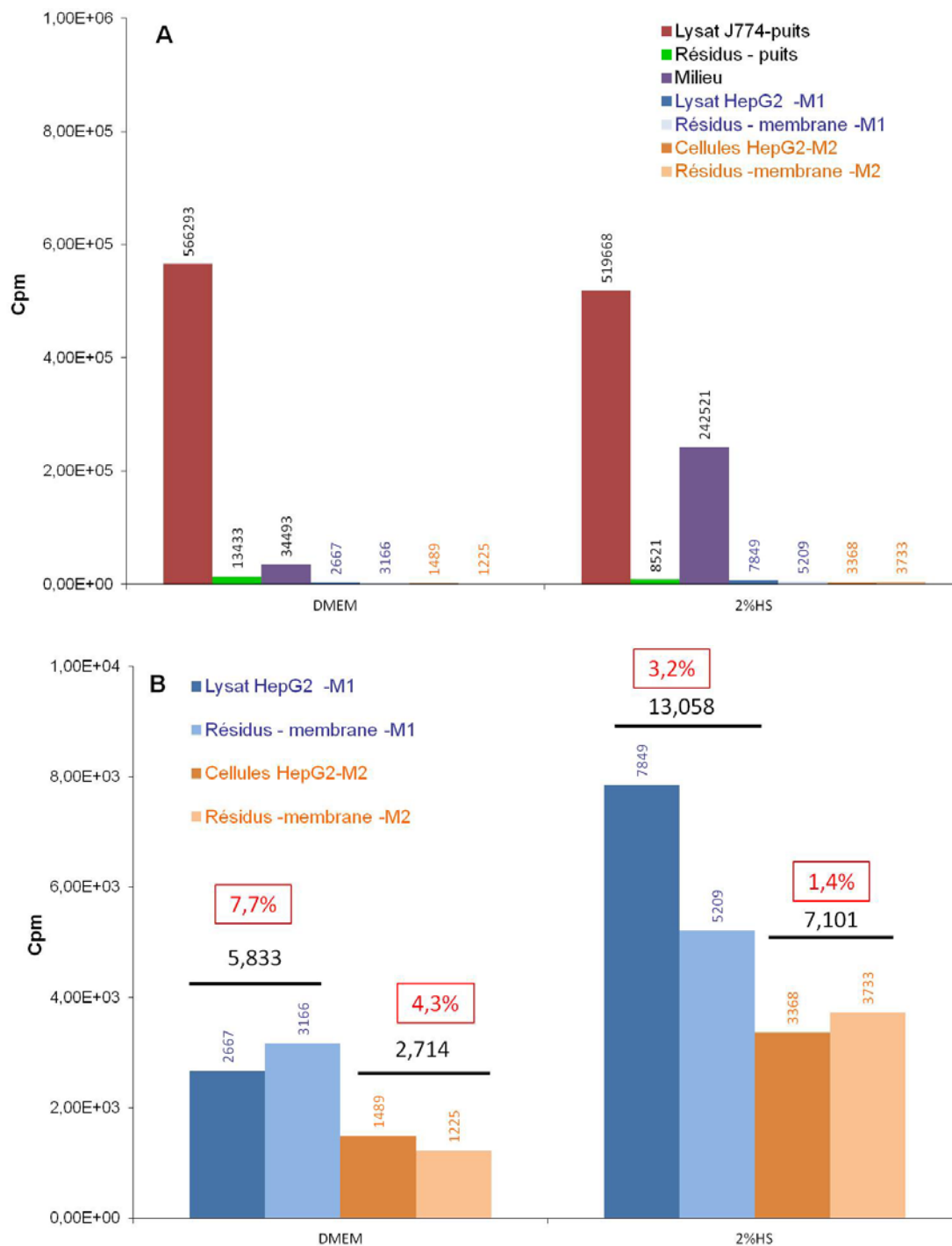


Figure 9: Détermination de la proportion de ^3H -cholestérol restante dans les cellules HepG2 avec deux méthodes de solubilisation de l'insert dans le système de co-culture.

Lors d'un essai de 24 h dans le système de co-culture avec du DMEM et du sérum humain mis en commun (2 %), les comptes (en cpm) dans les différents compartiments du système (A) et plus précisément le compartiment insert (B) ont été

obtenus comme décrit dans les méthodes. L'insert a été traité par deux méthodes différentes de récolte des cellules HepG2. Pour la **Méthode 1 (M1)** : le lysat cellulaire des HepG2, solubilisé dans 0,5 N NaOH (en bleu foncé), ainsi que le résidu sur la membrane obtenu directement dans le liquide à scintillation (bleue pâle) ont été obtenus. Pour la **Méthode 2 (M2)** : les cellules HepG2 ont été détachées par trypsination (en orange foncé), tandis que le résidu sur la membrane a été mesuré directement dans le liquide à scintillation (orange pâle). Les chiffres en noir sur la barre représentent la somme des cpm dans le compartiment insert dans chaque condition et les chiffres encadrés en rouge représentent la proportion de radioactivité effluée dans le lysat cellulaire et les cellules HepG2.

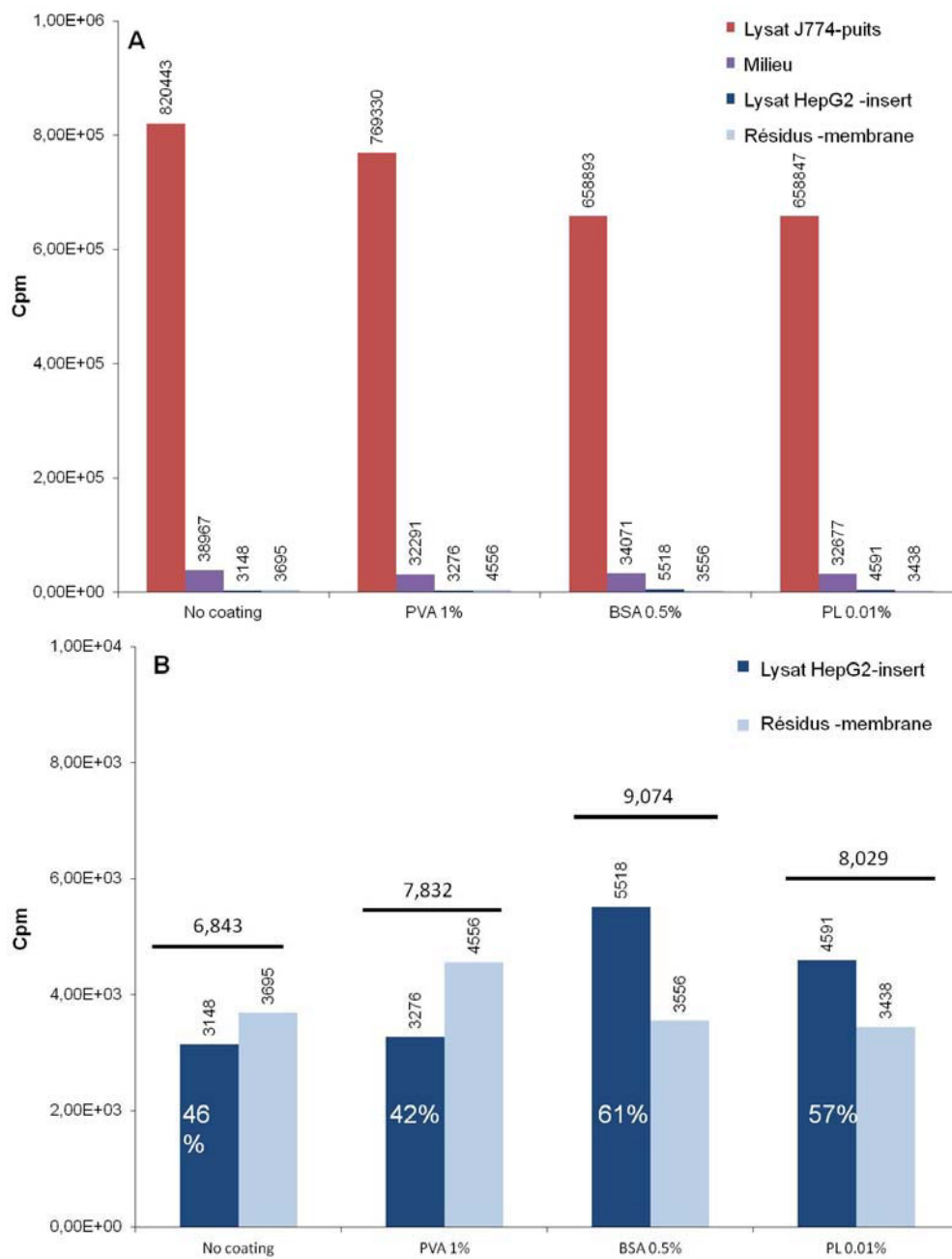
En ce qui concerne les cpm récoltés dans l'insert, c'est-à-dire les comptes obtenus par la M1 du lysat cellulaire des HepG2 ou des cellules HepG2 récoltées par la M2 ainsi que leur résidu sur la membrane respective, on observe une diminution des cpm retrouvés dans les cellules HepG2-M2 comparativement à ceux présents dans le lysat HepG2-M1, que ce soit en présence ou non de sérum complet. De plus, une diminution des cpm dans le résidu de la membrane est aussi perceptible entre la M1 et la M2 dans les deux systèmes de co-culture. Ceci laisse sous-entendre qu'une fraction des cpm mesurés dans le lysat HepG2-M1 ainsi que son résidu sur la membrane est présente dans le surnageant (milieu d'inactivation de la trypsine suivant la centrifugation des cellules) lors de la récolte des cellules HepG2-M2 après la trypsination. En effet, près de la moitié des comptes est perdue entre la méthode de récolte 1 et 2, ce qui démontre qu'en moyenne 50 % du cholestérol marqué est lié uniquement à la surface des cellules et que l'autre moitié est retrouvée dans les cellules. Ceci est d'autant plus validé si l'on mesure la proportion de la radioactivité effluée présente dans les cellules HepG2. En effet, la proportion de l'influx dans les cellules HepG2 passe de 7,7 % et 3,2 % avec la M1 à 4,3 % et 1,4 % avec la M2 pour l'influx du DMEM seul et le milieu contenant 2 % HS, respectivement.

Par ailleurs, on observe aussi plus de résidu radioactif sur la membrane dans la condition en présence de 2 % HS par rapport à l'expérience en DMEM seul. Néanmoins, ce qui nous intéressait était de pouvoir distinguer les cpm en présence de DMEM ou de sérum complet, ce qui est possible dans la M1 comme dans la M2. L'emploi de trypsine-EDTA permet donc de quantifier l'incorporation intracellulaire du cholestérol marqué au tritium dans les cellules HepG2, mais son utilisation ne sera pas ajoutée au protocole standard, vu la variation que peut apporter l'utilisation de la trypsine-EDTA pour le détachement des cellules.

3.3. Détermination de l'effet de différents revêtements pour la prévention de l'adsorption non-spécifique du ³H-cholestérol sur la membrane de l'insert

La présence d'un résidu plus élevé sur la membrane en co-culture en présence de 2 % HS a suscité un questionnement sur l'existence d'adsorption non-spécifique de cholestérol marqué sur la membrane poreuse de l'insert. Afin de voir si l'on peut réduire ce phénomène, différents revêtements tels que l'alcool polyvinylique (PVA) 1 %, de l'albumine de sérum bovin (BSA) 0,5 %, ainsi que de la poly-L-lysine (PL) 0,01 % ont été testés pour recouvrir l'insert. Les graphiques présentés à la Figure 10 A, et B p.128 représentent respectivement les cpm recueillis dans les différents compartiments et ceux isolés uniquement de l'insert du système de co-culture exposé au DMEM seul. En présence de DMEM, on observe une similarité des cpm dans le lysat cellulaire des J774 et dans le milieu partagé entre les deux chambres du système de co-culture, et ce malgré une tendance à la diminution du lysat cellulaire des J774 entre les différents revêtements dans la Figure 10 A, p.128.

Pour ce qui est des cpm obtenus pour l'insert, soit le lysat des HepG2 ainsi que le résidu sur la membrane, le pourcentage du lysat sur les cpm totaux récoltés sur l'insert correspond à une plus grande valeur dans la condition où un revêtement est fait avec la BSA 0,5 % et avec le PL 0,01 %. (Figure 10B, p.128) De plus, on observe que la plus grande fraction liée au résidu sur la membrane est notée sur les inserts recouverts avec du PVA 1 %, ce qui est non-désiré. Puisque l'on recherche une condition où le système de co-culture, soumis à un milieu sans accepteurs, donne un bas influx de cpm dans les cellules HepG2, le système sans revêtement possède la somme de cpm totaux dans les HepG2 la plus faible parmi les différents revêtements étudiés. En effet, vu des proportions du lysat élevées pour les inserts traités à la BSA 0.5 % (5 518/9 074) et PL 0,01 % (4 591/8 029) et une proportion du résidu élevée pour les inserts traités à la PVA 1 % (4 556/7 832), nous avons opté pour le système sans revêtement qui nous permet d'obtenir un différentiel plus élevé entre les cpm récoltés sur l'insert du système de co-culture exposé au DMEM et ceux obtenus dans le système de co-culture en présence de sérum complet.



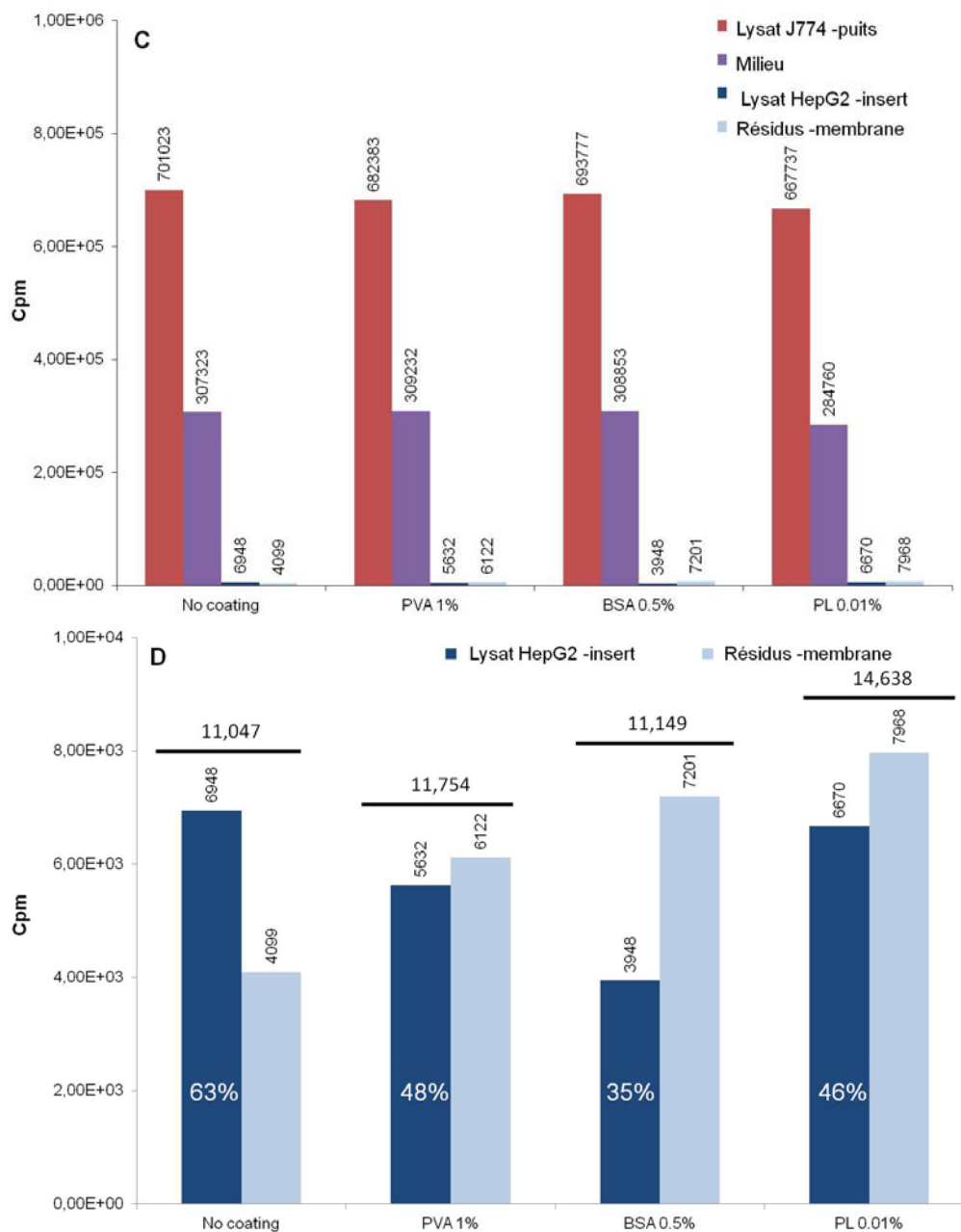


Figure 10. Détermination des effets de différents revêtements contre l'adsorption non spécifique du ^3H -cholestérol par la membrane de l'insert du système de co-culture.

Lors d'un essai de 24 h dans le système de co-culture avec du DMEM et du sérum humain mis en commun (2 % HS), différents revêtements ont été testés tels que le polyvinyl alcool (PVA) 1 %, la BSA 0,5 % et la poly(L-lysine) (PL) 0,01 % ont été évalués. Les différents compartiments (A); (C) et l'insert isolé (B); (D) du système ont été comptés comme décrit dans les Méthodes pour la condition DMEM et la condition 2 % HS, respectivement. Les chiffres en noir au dessus de la barre représentent la somme des cpm dans chaque compartiment insert. Les chiffres en

blanc représentent le pourcentage attribué au lysat des cellules HepG2 par rapport aux comptes (cpm) totaux.

De même, les graphiques de la Figure 10 C et D, p.129 représentent les mêmes éléments précédemment énoncés du système de co-culture exposé à 2 % HS. Les cpm du lysat cellulaire de J774 et du milieu sont semblables pour chaque insert qu'il soit recouvert ou non. Une hausse moyenne de 9 fois est observée pour les cpm du milieu par rapport à celui du système de co-culture en DMEM seul. Les pourcentages en blanc représentent la portion des cpm retrouvés dans le lysat des HepG2 sur le total des cpm recueillis sur l'insert. De plus, les cpm de la membrane des inserts démontrent la présence de résidus plus élevée sur celles traitées au PVA 1 %, à la BSA 0,5 % et au PL 0,01 % par rapport à la membrane non traitée lorsque les cpm dans le système en présence de 2 % HS sont comparés à ceux en DMEM seul pour chaque revêtement. En effet, des hausses de 1,3 fois pour le PVA 1 %, et d'environ 2,0 fois pour les inserts traités à la BSA 0,5 % et au PL 0,01 %, respectivement, sont observées pour le résidu sur la membrane par rapport à une hausse de moins de 1,1 fois pour la membrane non traitée.

Un différentiel des cpm obtenus pour chaque revêtement étudié entre le système de co-culture incubé avec 2 % HS et celui incubé uniquement avec du DMEM est distinguable, et est d'environ 4 100, 3 900, 2 100 et 6 600 cpm pour les inserts non traités, ainsi que ceux traités au PVA 1 %, à la BSA 0,5 % et au PL 0,01 %, respectivement. Malgré un différentiel de cpm similaire ou plus élevé respectivement pour les inserts traités au PVA 1 %, et au PL 0,01 % comparé aux inserts non-traités, la présence d'une hausse du résidu sur les membranes traitées nous force à opter pour un système de co-culture sans revêtement.

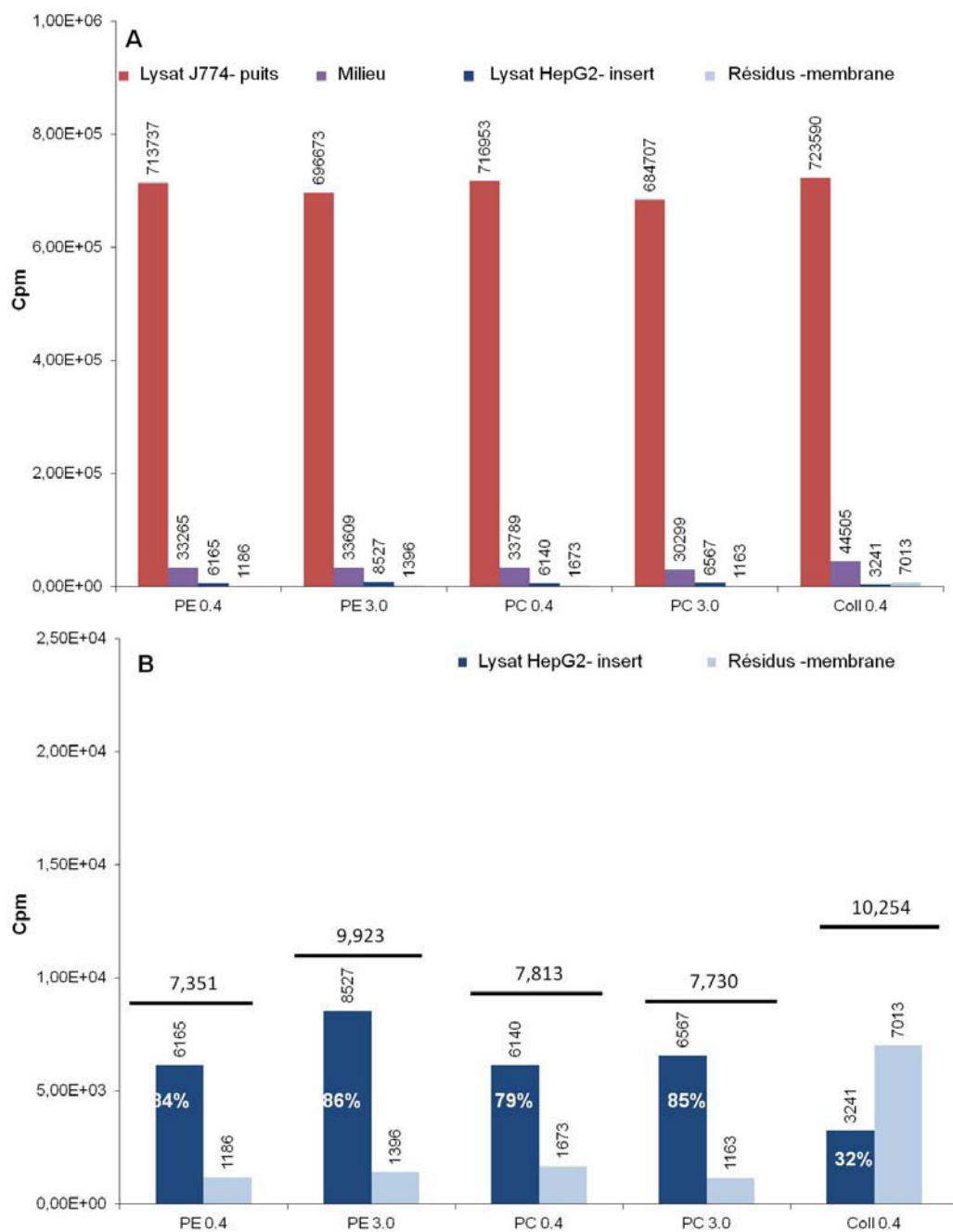
3.4. Détermination de l'effet d'inserts faits de différents matériaux et de tailles de pores différentes pour la prévention de l'adsorption non-spécifique du ³H-cholestérol sur la membrane.

Le revêtement des inserts n'ayant pas amélioré la présence de résidu radioactif sur la membrane, on s'est tourné vers différents types de matériaux constituant les inserts ainsi que la taille des pores de la membrane afin de déterminer si des inserts en polyester recouvert ou non de collagène ou des inserts en polycarbonate, les deux

types ayant des pores de 0,4 ou 3,0 μm amèneraient des avantages pour le système de co-culture.

Les graphiques présentés dans la Figure 11 A et B, p.133 représentent les cpm dans chaque compartiment de la co-culture en DMEM seul ainsi que ceux de l'insert uniquement, respectivement. Le graphique à la Figure 11 A, p.133 montre encore une fois la similitude des cpm dans le lysat de J774 et dans le milieu entre les différentes conditions du système de co-culture sans accepteurs. Les résultats des cpm totaux sur les inserts sont montrés à la Figure 11 B, p.133, où les pourcentages relatifs aux lysats de HepG2 ont été calculés sur le total des cpm recueillis. Les inserts de polyester ayant des pores de 3,0 μm représentent les inserts standards généralement utilisés dans notre système de co-culture. Les résidus sur la membrane des différents types d'inserts sont équivalents sauf pour les inserts faits en polyester recouvert d'un revêtement en collagène avec des pores de 0,4 μm (Coll. 0,4) où le résidu représente plus de la moitié des cpm totaux pour ces inserts.

Dans la poursuite de notre objectif visant à trouver une condition permettant d'obtenir un différentiel avantageux entre les cpm sur l'insert du système de co-culture entre le sérum complet et le DMEM seul, nous avons établi qu'à première vue, les inserts de polyester 0,4 μm (PE 0.4), de polycarbonate 0,4 μm (PC 0.4) et 3,0 μm (PC 3.0) sont de bons candidats pour atteindre l'objectif fixé puisque ces derniers possèdent les cpm totaux sur l'insert les plus bas, contrairement aux inserts standards (PE 3,0), dont les cpm totaux sont un tant soit peu plus élevés.



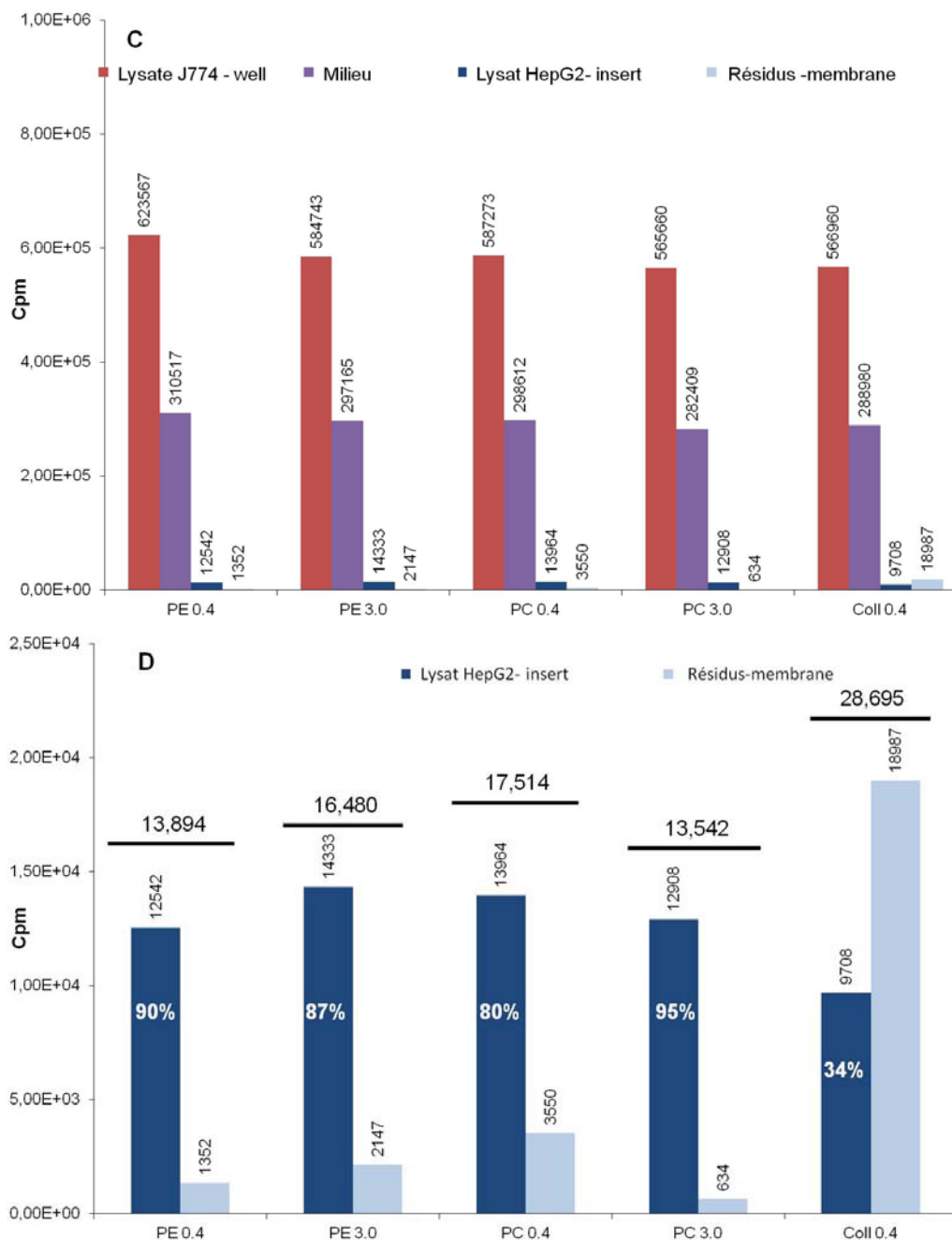


Figure 11 : Détermination des effets de différents matériaux et tailles de pores sur l'adsorption du ^3H -cholestérol par la membrane de l'insert du système de co-culture.

Lors d'un essai de 24 h dans le système de co-culture avec du DMEM et 2 % HS, différents matériaux tels que le polycarbonate (PC), le polyester sans revêtement (PE) et avec un revêtement au collagène (coll) et tailles de pores de 0,4 ou 3,0 μm ont été évalués. Les différents compartiments (A);(C) ainsi que l'insert isolé (B);(D) du système ont été comptés tel que décrit dans les Méthodes pour la condition DMEM et la condition 2 % HS, respectivement. Les chiffres en noir au dessus de la

barre représentent la somme des cpm dans le compartiment insert pour chaque condition. Les chiffres en blanc représentent le pourcentage attribué au lysat des cellules HepG2 par rapport aux comptes totaux.

Les graphiques présentés dans la Figure 11 C et D, p.134 représentent les cpm dans chaque compartiment de la co-culture avec 2 % HS ainsi que ceux de l'insert uniquement. Des cpm équivalents sont notés pour le lysat de J774 et ceux du milieu entre les différentes conditions du système de co-culture avec sérum complet. (Figure 11 C, p.134). Pour le milieu avec 2 % HS, la moyenne des cpm est augmentée de 8 fois par rapport à celle du milieu dépourvu en accepteur. De plus, en termes de la proportion recueillie dans le lysat de HepG2 ainsi que dans le résidu sur la membrane, les inserts PC 3,0 permettent une meilleure récolte du lysat HepG2 et réduisent le résidu membranaire. En termes de cpm totaux recueillis sur les inserts, les inserts Coll 0,4 sont ceux qui obtiennent les plus grands comptes, en grande partie dus à une hausse très grande du résidu sur la membrane. Or, une diminution du résidu sur la membrane est ce qui nous intéresse, ce qui exclut ce type d'insert. Les différentiels entre le système de co-culture avec sérum et celui sans sérum sont de 6 500, 6 600, 9 700 et de 5 800 cpm pour PE 0,4, PE 3,0, PC 0,4 et PC 3,0, respectivement.

Le PC 0,4 semble le choix évident, puisqu'il permet le plus grand différentiel entre le sérum complet et le DMEM seul, cependant il occasionne un résidu membranaire qui double en présence de sérum par rapport au résidu en condition sans accepteurs. Le PC 3,0 semble aussi un choix prometteur pour la co-culture en termes de différentiel entre les systèmes, la proportion de lysat HepG2 obtenu ainsi que le résidu membranaire, mais les caractéristiques physiques du polycarbonate telles qu'une mauvaise transparence et donc visibilité cellulaire au microscope rendent difficile la capacité à évaluer la croissance cellulaire sur la membrane et nous oblige à exclure ces inserts. (Tableau II, p.137) Ce faisant, il ne nous reste que les inserts faits de PE 0,4 et PE 3,0 comme possibilité. Ceux-ci démontrent les meilleurs résultats en termes de visibilité cellulaire ainsi que pour la capacité à évaluer la croissance cellulaire sur ces membranes.

De plus, les cpm des résidus sur ce type de membrane augmentent malgré tout en présence de sérum mais pas exagérément comparativement aux inserts Coll. 0,4. Puisqu'aucune différence majeure n'a été démontrée entre les inserts faits de polyester, les inserts standards soit le PE 3,0 sont conservés pour l'élaboration du système de co-culture pour l'évaluation du TIC.

Tableau II : Observation microscopique de la culture des cellules HepG2 sur des membranes de différents matériaux et tailles de pores.

	PE 0,4	PE 3,0	PC 0,4	PC 3,0	Coll. 0,4
Visibilité cellulaire	Moyenne	Moyenne	Mauvaise	Faible	Excellente
Croissance cellulaire	Bonne	Bonne	Impossible à évaluer	Impossible à évaluer	Formation d'agrégats
Densité de pores (pores/cm ²) ^a	4x10 ⁶	2X10 ⁶	1x10 ⁸	2x10 ⁶	Aucune information

^a **Adapté du** guide d'instructions de Corning. *“Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide”*

CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE

L'article suivant comprend la majeure partie de mes travaux de maîtrise. Tous les essais, l'optimisation des méthodes et protocoles, la compilation et l'analyse des résultats ainsi que la rédaction de l'article ont été effectués, en très grande partie, par le premier auteur de l'article.

Les coauteurs ont principalement contribué à cet article sur le plan de la conception et à la réalisation du projet ainsi que par le partage de leurs connaissances. Daniel Charpentier a collaboré à la réalisation des immunobuvardages de type western pour la détection des protéines impliquées dans le TIC. Dr David Rhains a partagé ses nombreuses connaissances sur le métabolisme des lipides et s'est impliqué dans l'analyse des essais de ³H-cholestérol. Les Dr Eric Rhéaume et Jean-Claude Tardif ont dirigé et supervisé mes travaux.

De plus, l'article est en voie de soumission dans le *Journal of Lipid Research*

**DEVELOPMENT OF A CO-CULTURE *IN VITRO* MODEL FOR REVERSE
CHOLESTEROL TRANSPORT EVALUATION**

Roberta Daila Carling ^{a,b}, David Rhainds ^a, Daniel Charpentier ^a, Eric Rhéaume^{a,b},
Jean-Claude Tardif ^{a,b,*}

SHORT TITLE: Co-culture *in vitro* model and RCT

^a Research Center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal

^b Department of Medicine, Université de Montréal

* Corresponding author. Dr. Jean-Claude Tardif, Montreal Heart Institute, 5000
Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.

ABSTRACT

Background: Reverse cholesterol transport (RCT) is the mechanism by which excess cholesterol from peripheral tissue can be effluxed and transported to the liver for biliary excretion to feces. However, available *ex vivo* and *in vivo* RCT models are limited, either supplying a partial view on the RCT pathway or providing RCT information of arguable relevance to humans. Thus, we propose a new co-culture *in vitro* model for the evaluation of RCT where both efflux and influx of cholesterol can be dynamically studied. To validate this new model, we will observe the effect of LXR agonists known to increase RCT. The RCT parameters will also be correlated with lipid parameters from healthy donor's serum. Later patients' samples data could be correlated with coronary atherosclerosis risk factors and associated events.

Method: Transwell inserts were used to grow the human hepatoma HepG2 cells, whereas lipid-laden mice J774 macrophages loaded with acetylated LDL and labelled with [³H] cholesterol were grown in the bottom of the wells. Labelled cholesterol transport via different acceptors present in the medium was monitored by scintillation counting of its distribution between the media and the two cells types.

Results: We established conditions where we observed a 30 % efflux of labelled cholesterol from J774 foam cells and a serum-specific influx of 4 000 cpm/ inserts in HepG2 cells, using a medium containing 2 % pooled human serum. We also observed that stimulation by synthetic and natural LXR agonists increased cholesterol efflux by approximately 70 %, with no significant increase of hepatic influx. More so, using serum from 13 healthy individuals, we demonstrated correlations among both efflux and influx parameters and between both RCT parameters with their HDL-C levels.

Conclusion: A co-culture *in vitro* model was developed for the evaluation of RCT. Drugs, such as LXR agonists have shown to increase efficiently one of RCT parameters and correlation with HDL-C levels from healthy donors was made possible in this model.

Key words: atherosclerosis, reverse cholesterol transport (RCT), co-culture *in vitro* model. LXR agonists

INTRODUCTION

Although there has been a decrease in the rates of cardiovascular diseases (CVD) over the past 40 years, (Canada, 2012) CVD nonetheless is the first cause of mortality and morbidity in the industrialised countries.(Lloyd-Jones et al., 2009) The pressing need to develop additional therapies to treat and prevent CVD is supported by the lack of total protection from low density lipoproteins lowering therapies, which only account for a 30% decrease of the risk of CVD incidence.(Smith, 2010) Many epidemiological studies have concluded that HDL-cholesterol (HDL-C) therapies would be an interesting strategy to address the residual risk. Indeed, a robust inverse association between the level of HDL-C and the risk of CVD has been well established in the literature.(Genest et al., 1999; Gordon et al., 1977) However, increased HDL-C is not necessarily related to reducing adverse events in coronary artery disease (CAD) patients.(Briel et al., 2009; Singh et al., 2007)

The static measurement of HDL-C levels has limitations as a metric of the beneficial effects of HDL.(Khera et al., 2011) Among the many functions of HDL, the promotion of reverse cholesterol transport (RCT) has been suggested to play a critical role in the removal of cholesterol from the arterial wall, which may be the main mechanism for atherosclerosis regression observed from HDL infusion therapies.(Shaw et al., 2008) RCT is a process by which excess cholesterol from peripheral cells, such as vascular wall macrophages, is taken by plasma lipoproteins and delivered to the liver where it can lead to cholesterol catabolism and excretion via the feces, thus increasing the net excretion of cholesterol.(Cuchel and Rader, 2006) Therefore, quantification of the RCT pathway is quite challenging since this process is not limited to export of cholesterol from macrophages but also relates to the capacities of downstream organs, such as the liver, to take up the cholesterol load from the lipoproteins.

The current methods to evaluate RCT are limited. First, the use of cellular cholesterol efflux assays using human serum as *ex vivo* cholesterol acceptors has allowed many researchers to evaluate serum samples properties for the first step of

RCT.(Fielding et al., 1983; Rothblat et al., 1978; Tall, 2008; Truong et al., 2010; Via et al., 1989) *Ex vivo* cholesterol efflux correlates with measures of atherosclerosis quantified by angiography (Linsel-Nitschke et al., 2009; Pajunen et al., 2001) or subclinical atherosclerosis by carotid intima–media thickness (cIMT).(Attie et al., 2001; Khera et al., 2011) This method was also used to screen human serum samples for their ability to stimulate cholesterol efflux via serum components such as the levels of various lipoproteins, apolipoproteins or lipids present.(de la Llera Moya et al., 1994; Mikkola et al., 2003; Mweva et al., 2006; Rothblat et al., 1999; Tan et al., 2011)

Another method was recently reported to assess cholesterol efflux in humans using stable isotope tracer of cholesterol and is based on the dilution of the concentration of injected labelled cholesterol in plasma to characterize cholesterol efflux *in vivo* from extra-hepatic tissues.(Santos-Gallego et al., 2011) However, both models are representative of one of the many steps of RCT and omit to investigate the downstream steps which accounts for cholesterol capture by the liver and intestinal cholesterol excretion. In addition, the latter method is still under development and clinical evaluation as a RCT model that could actually predict CAD risks.(Santos-Gallego et al., 2011)

The development of another method to assess with a more global approach macrophage-to-feces RCT has been achieved with the use of a mouse *in vivo* model (Zhang et al., 2003) and more recently a hamster *in vivo* model.(Briand, 2010) These animal models involve the intraperitoneal injection of [³H]cholesterol-loaded macrophages (J774) followed by monitoring over time the radioactive tracer in key compartments of the animal implicated in the RCT process such as the plasma, the liver and the feces. Although an array of information is provided by the former mouse model such as evaluation of macrophage-specific RCT in mice expressing with different genetic background or mice being subjected to different treatments known to modulate RCT pathway, their application to humans is restrained by their deficiency to express cholesteryl ester transfer protein (CETP), a plasma transport protein that play a critical role in cholesterol clearance in humans. The hamster model is more

representative of the human HDL metabolism because this specie does express CETP, so the results obtained can be more reliably extrapolated to humans.(Briand, 2010)

However, the RCT assessment in both models requires time-consuming steps such as the induction of the pathogenesis/ dyslipidemia by the cholesterol-rich diet or the development of their modified genetic background profile, which precludes a high-throughput measurement of macrophage cholesterol excretion into the feces. Also, both animal models makes the specific measurement of macrophage-to feces RCT difficult to assess, since it only account for a minimal part of whole-body RCT.(Santos-Gallego et al., 2011) Moreover, these models are limited for the assessment of drug effects in humans where drug-target interactions may differ in different species such as for PPAR agonists.(Willson et al., 2000)

Therefore for those reasons, our objective is to design an *in vitro* co-culture model for RCT evaluation that will allow monitoring [³H] cholesterol flux simultaneously between two cell types, such as foam cells and hepatocytes. It will also improve the information of RCT parameters by combining the best of both described methods, thus incorporating the use of cellular models and adding the complexity of an *in vivo* model where cholesterol transfer to hepatic cells can be followed as a downstream step of RCT. To this end, we have used transwell inserts in which human HepG2 hepatocytes have been cultivated as recipient (influx) for [³H] cholesterol released to cholesterol acceptors (efflux) in a shared medium from mice J774 macrophages previously loaded with acetylated LDL, to achieve foam cells morphology, and labelled with [³H] cholesterol.

Overall, we were able to set parameters in the co-culture system to observe cholesterol efflux from J774 macrophages and cholesterol uptake by HepG2, using 2% pooled human serum. As a proof-of-concept of its utility, we validated this model with the use of synthetic and endogenous LXR agonists, effectors known to increase RCT pathway (Yasuda et al., 2010) and showed an approximately 70 % increase of cholesterol efflux for both LXR. As to cholesterol influx in HepG2 cells, no increase

has yet been noticed with LXR agonists. Furthermore, we were able to demonstrate a significant correlation between efflux values and influx counts in HepG2 and observed limited but significant correlation between HDL-cholesterol levels (HDL-C) from healthy volunteers' serum and efflux and influx, encouraging the need to evaluate RCT from coronary patients in our *in vitro* co-culture model to see if similar results occur.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

1. Materials

[1,2-³H(N)]cholesterol, scintillation vials and ECL kit were obtained from Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA). Scintillation liquid cocktail was obtained from MP Biomedicals (Solon, OH, USA). Human apoA-I was purchased at Biomedical Technologies, Inc. (Stoughton, MA, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (29,4 mM), 8-bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), 22-R-hydroxycholesterol (22-OH-cholesterol), 9-cis-retinoic acid (9cis-RA), TO901317 (TO), fatty acid-free bovine serum albumin were all purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Eagle's minimal essential medium (EMEM) was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). 12-well plates and transwell inserts were purchased from Corning (New York, NY, USA). Murine J774 macrophages and human HepG2 hepatocytes were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA).

2. In vitro co-culture studies

J774 murine macrophages were plated and grown in DMEM high glucose plus 10 % FBS in 12-well plates at a density of 20 000 cells/well for 4 days. HepG2 cells were plated and grown in EMEM plus 10% FBS in 12-well transwell inserts at a density of 67 000 cells/insert for 5 days. After 4 days, J774 cells were labelled for 24 h with 2 µCi/mL ³H-cholesterol and loaded with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL) in DMEM high glucose plus 1 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin. The J774 cells were then washed once with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.1 % BSA (PBS-0.1 % BSA) with calcium and magnesium and once with DMEM-0.2 % BSA, and equilibrated for 16 h in DMEM-0.2% BSA in presence or absence of treatment. Final concentration used were 0.3 mM 8-bromo-AMPC in water, 10 µM 22-OH-cholesterol, 10 µM 9cis-RA and 10 µM TO compound all in 0.1 % DMSO. After cholesterol equilibration, J774 cells were rinsed with PBS-0.1 % BSA with calcium and magnesium. At day 5, inserts containing HepG2 hepatoma cells were washed with PBS-0.1 % BSA with calcium and magnesium. To maximize transfer between the two

cell types, the medium level was higher than that recommended by the manufacturer, thereby allowing increased transfer between HepG2 cells and J774 media than would be allowed by the permeable membrane alone. Incubations of the co-culture were carried on for 24 h with DMEM high glucose, red phenol free, containing the indicated exogenous cholesterol acceptors. (Figure 12, p.146)

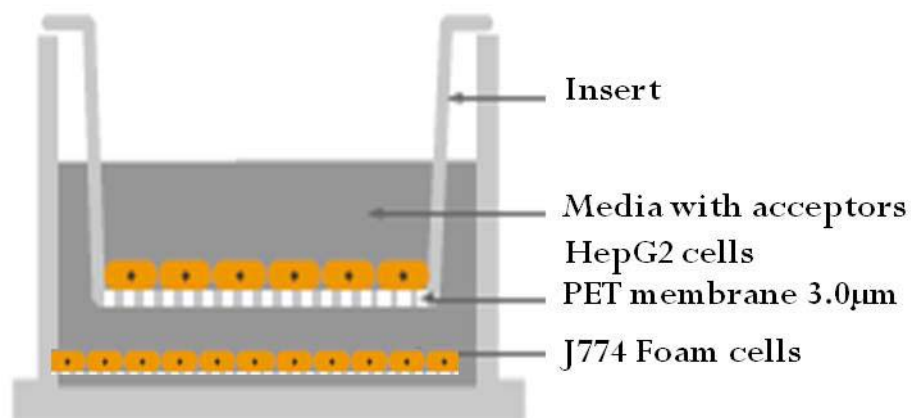


Figure 12: The *in-vitro* co-culture system assembly. Adapted from Corning manual “Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide”

A condition with DMEM containing no cholesterol acceptors was used to calculate background values. The efflux of labelled cholesterol in the co-culture system was the percentage of radiolabel in the media plus the HepG2 cells divided by the total radiolabel in J774 and HepG2 cells and in the media. As for cholesterol uptake, it is the counts per minutes (cpm) in the HepG2 cells. The amount of radiolabel present in the cells was determined by the solubilization of J774 cells in wells and HepG2 cells in the inserts by NaOH 0.5 N and measured by liquid scintillation counting. 1 mL of media is also measured by liquid scintillation counting. Each experiment was performed in triplicate.

3. Protein analysis by western blot

Cells were grown under the desired conditions before being scraped from plate with RadioImmunoPrecipitation Assay (RIPA) lysis buffer (Tris 50 mM, NP-40 1%, Na-deoxycholate 0.25 %, NaCl 150 mM, and EDTA 1 mM) with protease inhibitor

cocktail. The cell lysates were put on ice for 15 min and centrifuged at 16 060 g for 15 min at 4°C to remove unbroken cells and debris. The supernatant concentrations were measured by the BCA assay kit from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA). 50 μg protein were electrophoresed on a 7.5 % SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane obtained from Millipore (Billerica, MA, USA) at 4°C for either 3 h at 100 V (SR-BI) or 16 h at 20 V (ABCA1). Anti-ABCA1 (Novus Biologicals, NB400-105, 1/1000 dilution) and SR-BI (Novus Biologicals, NB400-104, 1/5000) antibodies were used for probing, followed with an anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase from Pierce Antibodies (Rockford, IL, USA) for detection. The detection was done using Western Lightning Chemiluminescence Reagent plus.

4. Preparation of lipoproteins and human sera

Human low density lipoproteins (LDL) and total high density lipoproteins (HDL) were isolated from pooled human plasma of healthy, normolipidemic individuals ($n=10$) by sequential ultracentrifugation as previously described (LDL, $d=1.063$ g/mL and total HDL, $d=1.210$ g/mL).(Havel et al., 1955) Both were washed and their purity was verified on a 0.75 % agarose gel, stained with Coomassie Blue from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Before use, LDL and HDL were dialyzed extensively against Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4. Preparation of acLDL was achieved by repeated addition of acetic anhydride to LDL as previously described.(Basu et al., 1976) AcLDL was dialyzed against TBS (pH 7.4) and stored in a dark environment at 4°C for *in vitro* co-culture studies. The human serum pool used in these studies was obtained from 10 fasted healthy men (non smokers, not taking any medication) from Bioreclamation (Huntsville, NY, USA). Also, individual human sera from 13 healthy men were used. To isolate the serum HDL fraction, the pool of human serums and individual samples were depleted of apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins by precipitation with polyethylene glycol (PEG) 6 000 (5.7 % final concentration) as described previously.(Asztalos et al., 2005) Because of the dilution of the sera by the precipitation reagent, 2.8 % of the apoB-depleted serum used in the assay is equivalent to 2 % whole serum.

5. Serum lipids and lipoproteins analysis

Serum total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG) were measured in the Dimension RxL analyzer (Siemens) and human apolipoprotein A-I (ApoA-I), ApoB and lipoprotein (a) (Lp(a)) were measured by nephelometry on the BN Prospec system for 13 human serum of healthy volunteers. Mean values are presented in Supplementary Table 1, p.169.

6. Statistics

Results presented are the mean \pm standard deviation (S.D.) of at least three independent experiments unless mentioned otherwise. Results were analyzed by either unpaired two-tailed Student's t test or one-way analysis of variance (ANOVA) as indicated with GraphPad Prism software version 5.03 (GraphPad Software, San Diego USA, www.graphpad.com). Statistical significance for all comparisons was obtained at $p < 0.05$.

EXPERIMENTAL RESULTS

1. Detection of cholesterol transporters and receptors in J774 foam cells and HepG2 cells.

In order to characterize J774 foam cells used in our models and to determine the effects of drugs used in experiments described below, western blot analysis were performed on transporters and receptors known to modulate RCT parameters. J774 cells were grown in similar conditions than those used for the co-culture, in 12-wells plates while HepG2 were also grown in 12-wells plates, contrary to the co-culture.

First, we wanted to determine the effects of acLDL loading and cAMP stimulation on ATP binding cassette type 1 (ABCA1) and scavenger receptor class B type I (SR-BI) expression in J774 foam cells. We were able to observe, as shown in Figure 13A p.150, an increase of ABCA1 expression when cells are loaded with acLDL and treated with cAMP. Furthermore, the expression of SR-BI in the presence of acLDL loading was decreased. Although cAMP treatment seems to have no effect on SR-BI expression in absence of acLDL, this treatment seems to counteract the decrease that was associated with acLDL loading. GAPDH remained unaltered in the different conditions.

Then, we studied the effects of cAMP and LXR agonists, both natural (combination of 22-OH chol. and 9-cis-RA) and synthetic (TO901317) on J774 foam cells and HepG2 cells, as shown in Figure 13 B and C p.150, respectively. In J774 foam cells, all three treatments increased ABCA1 expression compared to their respective control (ctl for cAMP, and DMSO for both LXR agonists). Moreover, ABCA1 protein expression was higher after treatment of J774 foam cells with cAMP than with the LXR agonists, whereas the natural LXR agonist showed increased ABCA1 protein level compared to treatment with the synthetic LXR agonist. We did not notice significant change in SR-BI expression in J774 cells with those treatments. GAPDH expression was stable throughout the different conditions.

As for treatments of HepG2 cells with cAMP and LXR agonists, we were able to uncover an increase in ABCA1 protein expression for cAMP treatment only as the DMSO control itself seems to be associated with a similar increase in ABCA1 than the LXR agonists. Similarly to the results obtained in J774 foam cells, no change is apparent in SR-BI protein expression after treatment with cAMP and LXR agonists in HepG2 cells. GAPDH level of expression was unchanged in any condition presented.

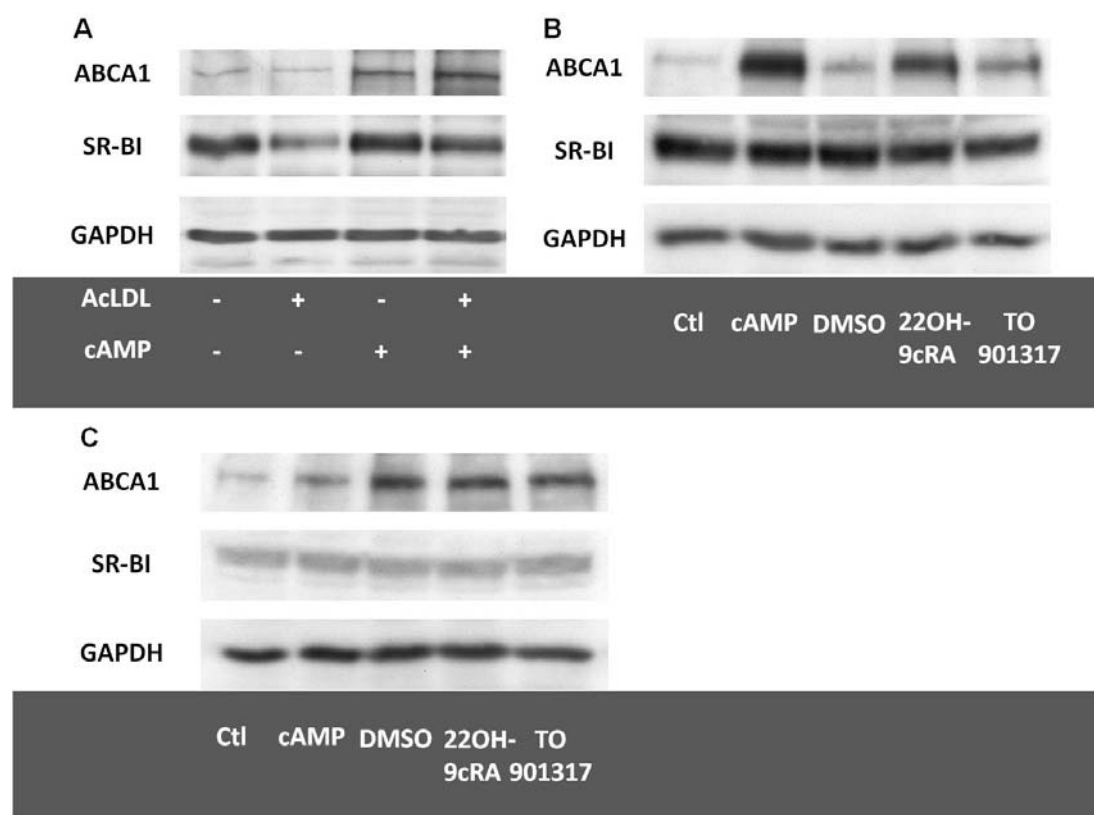


Figure 13: Western blot of cholesterol transporter ABCA1 and receptor SR-BI in J774 foam cells and HepG2 cells in different conditions.

J774 cells were loaded or not and stimulated or not with 0.3 mM cAMP for 16 h (A). J774 cells were loaded with 50 µg/ mL acLDL and stimulated with either 0.3 mM cAMP, combination of 10 µM 22-OH chol. with 9cRA or 10 µM TO901317 for 16 h (B) HepG2 cells were grown in wells in absence of J774 cells and are stimulated with either 0.3 mM cAMP, combination of 10 µM 22-OH chol with 9cRA or 10 µM TO901317 for 16 h. (C). Cells lysates and western blots analysis were performed as described in Methods. Data represent one cell passage out of 3 independent experiments performed in triplicate.

2. Dose-response curve with pooled human serum in co-culture system

After we established by western blot analysis the expression of essential transporters and receptors modulating RCT pathway in foam cells and hepatic cells, we determined the optimal concentration of serum for assessment of cholesterol exchange between the two cell types. Dose-response curves show the ^3H -cholesterol efflux values from the foam cells (Figure 14 A p.152) and the ^3H -cholesterol influx in the hepatocytes (Figure 14 B p.152) in the co-culture system using pooled human serum (HS) (0-10 %). For the ^3H -cholesterol efflux values, all tested concentrations of HS showed a significant difference from DMEM without serum (DMEM). The concentration of 1 or 2 % HS seem sufficient to measure cholesterol efflux, as a saturation effect starts to occur after 2 % HS. As for the ^3H -cholesterol influx in HepG2 cells, 1 % and 2 % HS are also the only two concentrations at which a significant difference with DMEM influx values is observed. Serum-specific counts observed were of 4 500 cpm and 4 000 cpm for 1 and 2 % HS, respectively. So, 1 % HS is the concentration at which the highest difference with DMEM influx counts is observed, nonetheless, no significant difference is noted between 1 and 2 % HS. Also, beyond 2 % HS, a decrease in serum-specific influx counts is observed.

Furthermore, a nonlinear regression analysis with a one-site total binding model has been fulfilled on the human serum dose-response curve. Curve values like Bmax, the maximal percentage of specific efflux, Kd (the concentration of human serum at 50 % of maximal specific efflux is observed), NS (the slope of non-specific efflux) and background (the percentage of efflux in absence of human serum), have been determined and were respectively 36.4 %, 0.85 % of HS, 0.32 and 5.6 %.

Thus, based on the combination of both efflux and influx counts values and similar assays made in a preliminary RCT system (data not shown), 2 % HS is the concentration that will be used to evaluate RCT in co-culture system.

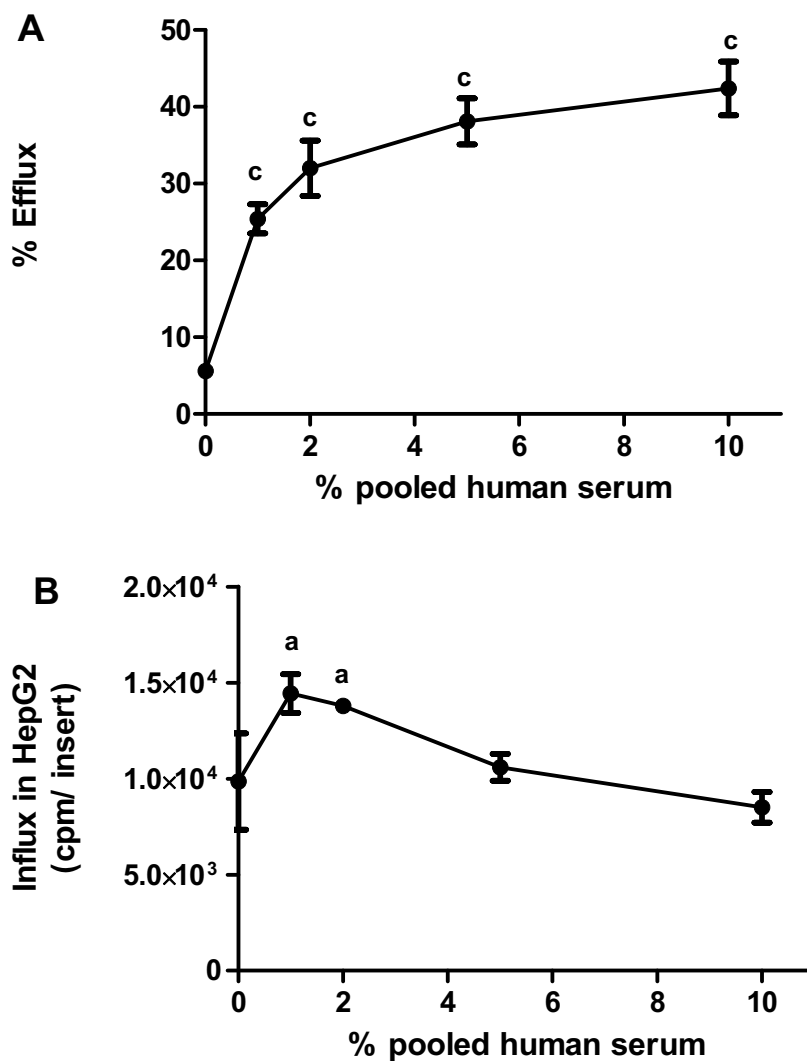


Figure 14: Efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) values in co-culture system during a 24 h dose-response experiment with pooled human serum.

J774 cells were loaded and labelled for 24 h as described in Methods. Monolayers of cells were equilibrated with DMEM-BSA 0.2 % for 16 h. Co-culture was performed with different concentrations of pooled human serum (0-10% HS) for 24 h and efflux (%) (A) and crude counts in HepG2 cells (B) are reported. Data represent the mean \pm S.D. of 3 independent experiments performed in triplicate.

^a $p < 0.05$ and ^c $p < 0.001$ vs. DMEM: one-way ANOVA, with post-test Tukey's multiple comparison test)

3. Effects of different cholesterol acceptors in the co-culture system

To gain a better understanding of the cholesterol transport in the co-culture system, we designed an experiment with different cholesterol acceptors and so, measured the contribution of different cholesterol efflux pathways and examined their impact to influx counts simultaneously. The different cholesterol acceptors used interact with different transporters and receptors on the macrophage cell membrane to promote cholesterol efflux.

The graphs showed in Figure 15 A and B p.154 represent, respectively, the ^3H -cholesterol efflux from J774 and ^3H -cholesterol influx in the HepG2 values for total isolated HDL (see experimental procedures) at 40 μg protein/mL, a representative HDL protein concentration of what is expected to be found in 2 % HS (based on apoA-I content from biochemistry analysis of whole serum), for 2 % HS or for 2.8 % apoB-depleted HS, which should be equivalent in terms of apoA-containing lipoproteins to 2 % whole serum. Exposure of J774 labelled with ^3H -cholesterol to isolated HDL, 2 % HS and 2.8 % apoB-depleted HS resulted in cholesterol efflux values that seem distinct from background efflux with DMEM alone. Additionally, an approximately 2-fold increase is observed between isolated HDL efflux and either 2 % HS or 2.8 % apoB-depleted HS efflux, when background efflux values are subtracted (18.8 % for HDL vs 35.6 % for HS vs 36.1 % for apo-B-depleted HS). Efflux values in presence of apoB-depleted serum did not change compared to whole serum.

As for ^3H -cholesterol influx in HepG2 cells, all cholesterol acceptors provided serum-specific influx counts compared to DMEM. Overall, apoB-depleted serum seems to generate better donors of ^3H -cholesterol to HepG2 cells than whole serum. In fact, when background DMEM influx counts were subtracted, a 73 % increase of ^3H -cholesterol influx in the HepG2 cells was achieved with apoB-depleted serum compared to whole serum. As for isolated HDL-mediated influx, it seems to be promoted compared to whole serum, but to a lesser extent than apoB-depleted serum.

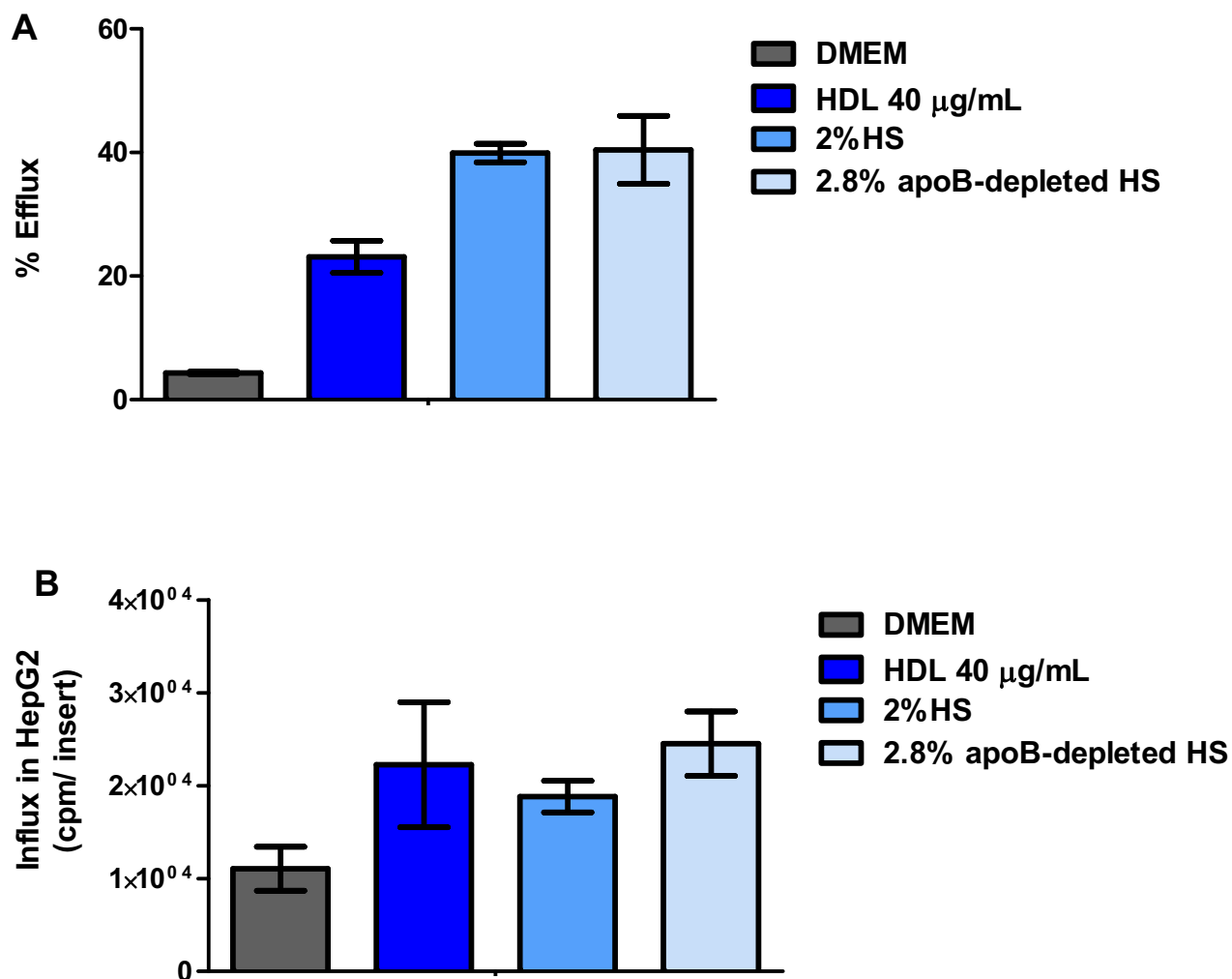


Figure 15: Efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) values in co-culture system to different cholesterol acceptors during a 24 h incubation period.

J774 cells were loaded and labelled for 24 h as described in Methods. Monolayers of cells were equilibrated with DMEM-BSA 0.2% for 16 h. Co-culture was performed with different acceptors of cholesterol in DMEM, plus total HDL (40 µg/mL), HS pool (2 %) or apoB-depleted pooled HS (2.8 %) for 24 h and efflux (%) (A) and crude counts in HepG2 cells (cpm) (B) are reported. Data represent the mean ± S.D. of 2 independent experiments performed in triplicate.

4. Use of effectors known to increase the RCT pathway in the co-culture system

After testing of different cholesterol acceptors implicated in the RCT pathway, the effect of drugs known to stimulate RCT has also been studied in the co-culture system to validate its efficiency for measuring cholesterol flux from macrophages to hepatocytes. Drugs such as cAMP and LXR agonists have been often used to increase cellular cholesterol efflux and in vivo macrophage-to-feces RCT.(Haidar et al., 2002; Yasuda et al., 2010)

The results of the effect of different treatments in the co-culture system are shown in Figure 16 A and B, p.157. ³H-cholesterol efflux for each treatment tested is accompanied by a control with its respective vehicle, with or without the presence of HS. Significant values are obtained for the difference noted between treatments in presence of 2 % HS vs. no cholesterol acceptors. Treatments were separated (thick dark line in Figure 16, p.157) by vehicle used to solubilize drugs, either in H₂O (for cAMP) or in DMSO (LXR agonists). Regarding the effect of the treatments, firstly, cAMP treatment showed a significant increase of 34 % compared to 2 % HS alone, after background (DMEM medium alone) values were subtracted. Natural and synthetic LXR agonists, such as the combination of 22-OH-cholesterol (22-OH-chol.) with 9-cis-retinoic acid (9cis-RA) and TO901317 also showed significant increases of 74 % and 71 %, respectively, compared to 2 % HS-DMSO, after background (DMEM-DMSO) values were subtracted. Overall, efflux values from LXR agonists' conditions are higher than those of untreated conditions. Furthermore, no significant difference was noted in efflux values between the HS stimulated by either natural or synthetic LXR agonist.

As for ³H-cholesterol influx in HepG2 cells, only cAMP and LXR agonist treatments showed significant serum-specific influx counts vs. corresponding DMEM conditions. Both untreated HS conditions failed to provide a distinct elevation of serum-specific influx counts compared to background values. Also, no significant

increase was observed for cAMP and LXR treatment compared to HS alone. Consequently, treatment of J774 cells by either cAMP or LXR agonist enhanced ^3H -cholesterol efflux in our co-culture system as expected, although no significant translation of these effects was noted for the influx of ^3H -cholesterol in HepG2 cells.

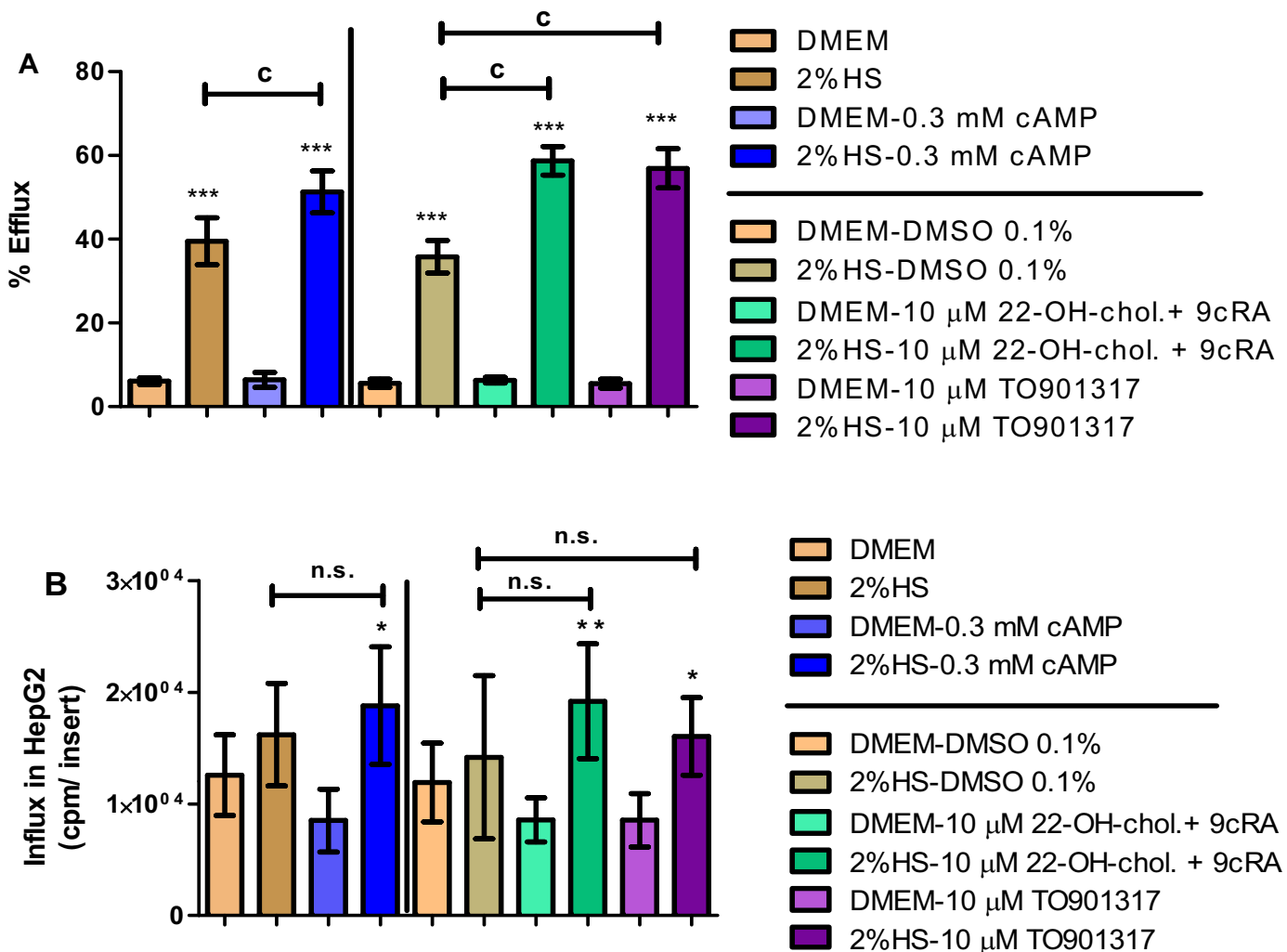


Figure 16: Validation of the co-culture system with different treatments known to increase ABCA1-mediated cholesterol efflux pathway and RCT.

J774 cells were loaded and labelled for 24 h as described in methods. Monolayers of cells were equilibrated with either DMEM-BSA 0.2 % alone or with addition of DMSO (0.1 %) or cAMP (0.3 mM) or a combination of 22-OH-chol. + 9c-RA (both at 10 μM) or TO901317 (10 μM) for 16 h. Co-culture was performed with DMEM and pooled human serum (2 % HS) for 24 h and efflux (**A**) and crude counts in HepG2 cells (**B**) are reported. Data represent the mean ± S.D. of 4 independent experiments performed in triplicate.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. ctl: unpaired T test. ^c $p < 0.001$ vs. 2%HS : one-way ANOVA, with post-test Tukey's multiple comparison test

5. Correlation between lipid parameters and RCT parameters in co-culture system

After our study of drugs known to regulate positively the RCT pathway, we were interested to determine the relationship between serum lipid parameters from 13 healthy volunteer's serum samples and RCT parameters obtained in the co-culture system. Our ultimate goal is to determine later on whether similar correlations would be found using coronary patients' serum samples in the new model, since it has been known that HDL-C plasma levels of coronary patients correlates poorly with cholesterol efflux.(Linsel-Nitschke et al., 2009)

Supplementary Table 1, p.169 provides the mean lipid values of the healthy donors used for this assay. The serum samples were obtained from 13 fasted men between the ages of 18 and 50 years old. None of the subjects were under any medication or reported to have any disease.

Each serum of the 13 healthy donors has been assayed in the co-culture system along with the pool of human serum used in the previous experiments (Figure 17 A and B, p. 159). Variation in the ^3H -cholesterol efflux capacities is illustrated in Figure 17 A, p.159. All healthy donors' serums have cholesterol efflux significantly higher than that of cholesterol efflux toward no acceptors (DMEM alone). One out of the thirteen healthy donors (donor 134) has a better efficiency to promote cholesterol efflux compared to the pooled human serum sample, while some lie below the pooled human serum threshold and others, while above threshold, don't reach significance. Contrary to cholesterol efflux values, only donors 124, 131, 132 and 134 ^3H -cholesterol influx values are significantly higher than DMEM alone, while none are significantly different from cholesterol influx of pooled human serum.

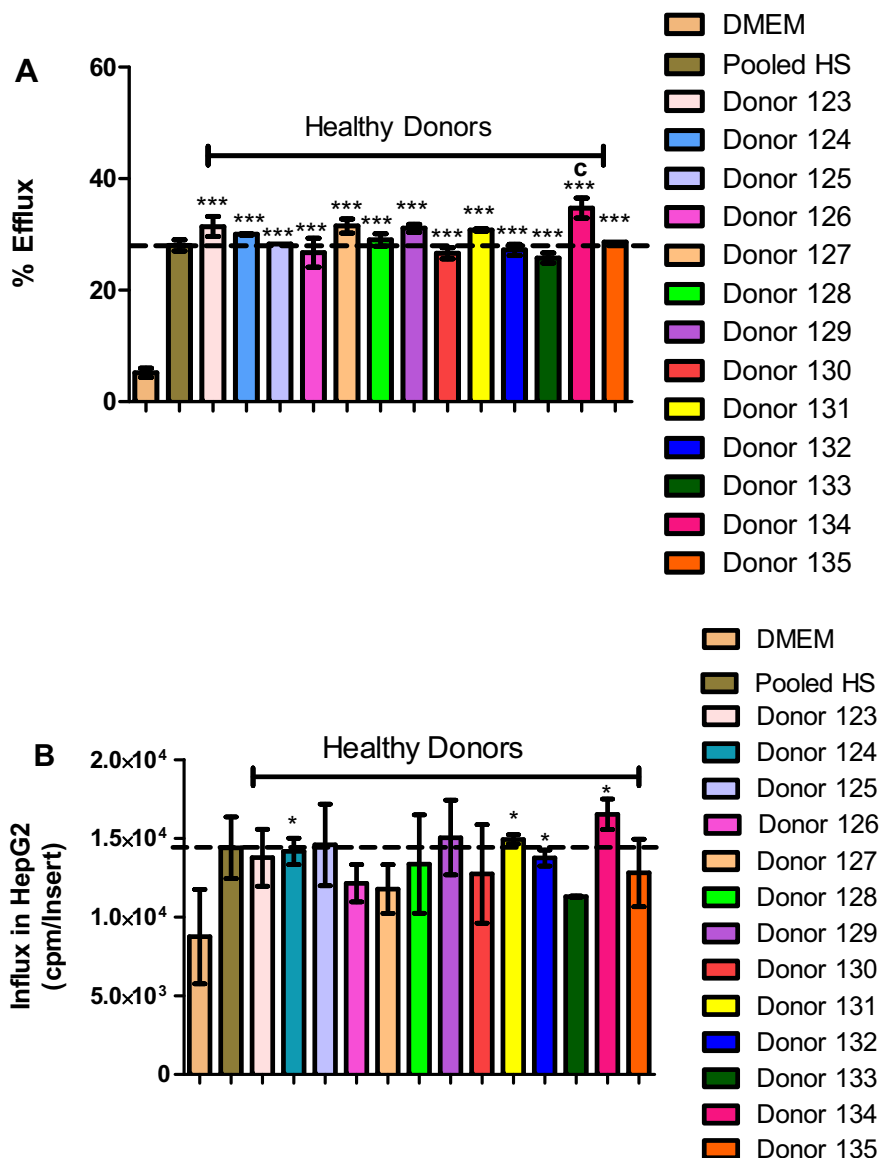


Figure 17: Efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) values in co-culture system with 13 healthy volunteers' serum.

J774 cells were loaded and labelled for 24 h as described in Methods. Monolayers of cells were equilibrated with DMEM-BSA 0.2 % for 16 h. Co-culture was performed with DMEM, pooled human serum (2 % HS) and human serum (2 % HS) of the 13 healthy volunteers for 24 h and efflux (A) and crude counts in HepG2 cells (B) are reported. Data represent mean values \pm S.D of triplicates. Dotted line represent the threshold value of the 2 % pooled HS for the efflux and crude counts in HepG2.

* $p < 0.05$; and *** $p < 0.001$ vs. ctl: unpaired T test. ^c $p < 0.001$ vs. 2%HS : one-way ANOVA, with post-test Tukey's multiple comparison test

To analyze these different trends for cholesterol efflux and influx compared to control serum, we have correlated those RCT parameters in co-culture system with each other to establish if a relationship existed, which has never been done before. The percentage of cholesterol efflux and ^3H -cholesterol influx counts showed a significant relationship, accounting for 43 % of observed variation, (Figure 18,p.160), which, however, means that more than 50 % of influx counts modulation is due to parameters different than cholesterol efflux capacities.

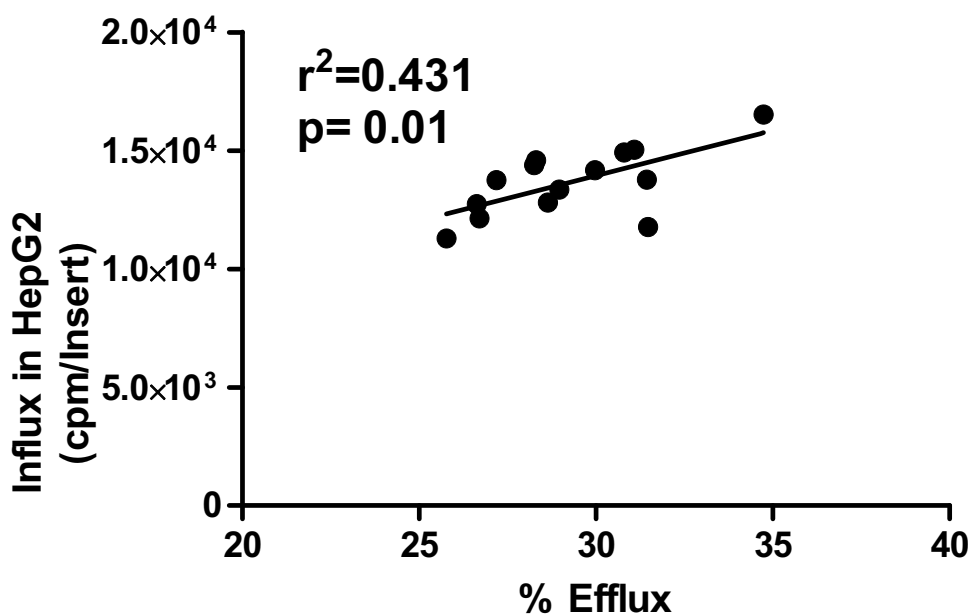


Figure 18: Linear correlation analysis between J774 efflux (%) and crude counts in HepG2 cells (cpm) in co-culture system with 13 healthy volunteers' sera.

Linear correlation (Pearson) was calculated between J774 macrophages efflux (%) and crude counts in hepatic HepG2 cells (cpm). Data represent mean \pm S.D of triplicate values. Determination coefficient r^2 and p value of Pearson's test of correlation significance are shown.

Furthermore, to identify key determinants of cholesterol efflux, correlations between the lipid profiles of each healthy donor and ^3H -cholesterol efflux from the co-culture system were obtained (Figure 19 A-D, p.161). TC, HDL-C, apoA-I and Lp(a) show significant correlations with cholesterol efflux in co-culture system, which accounts, respectively, for 43 %, 56 %, 49 % and 33 % of observed variation. As for LDL-C, TG and apoB, no significant relationship was observed with cholesterol efflux in the co-culture system. (Data not shown)

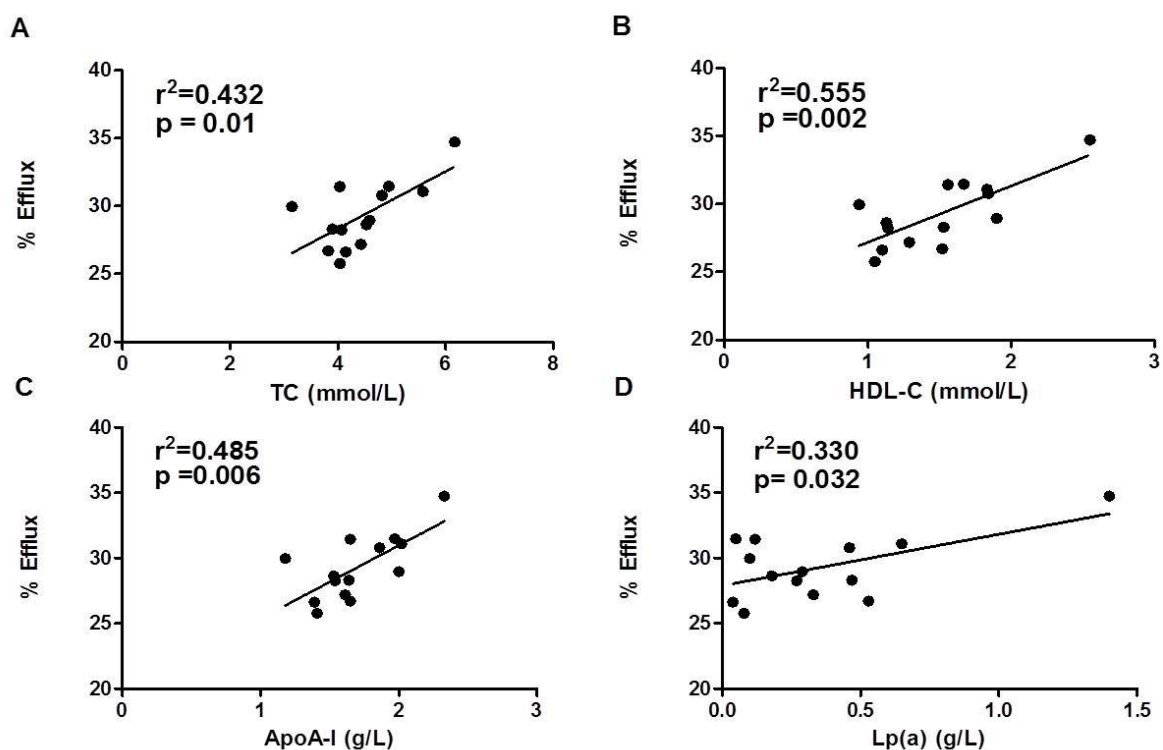


Figure 19: Linear correlation analysis between lipid parameters and J774 efflux (%) in co-culture system with HepG2 cells and with 13 healthy volunteers' sera.

Linear correlations (Pearson) were calculated between J774 efflux (%) and total cholesterol (TC) levels (A), HDL-cholesterol levels (HDL-C) (B), apolipoprotein A-I (apoA-I) levels (C) and lipoprotein(a) (Lp(a)) (D). No significant correlations between efflux (%) and triglycerides (TG), measured LDL-cholesterol (LDL-C) and apolipoprotein B (apoB) were obtained. Data represent mean of triplicate values. Determination coefficient r^2 and p value of Pearson's test of correlation significance are shown.

Correlations between the same lipid parameters and influx in HepG2 cells have also been assessed (Fig 20 A-D, p.162). Only HDL-C and Lp(a) appeared to show a significant correlation with influx counts in HepG2, accounting for 32 % and 53 % of observed variation, respectively. TC, apoA-I, LDL-C, TG and apo B showed no significant relationship with influx values in HepG2 cells. (Data not shown)

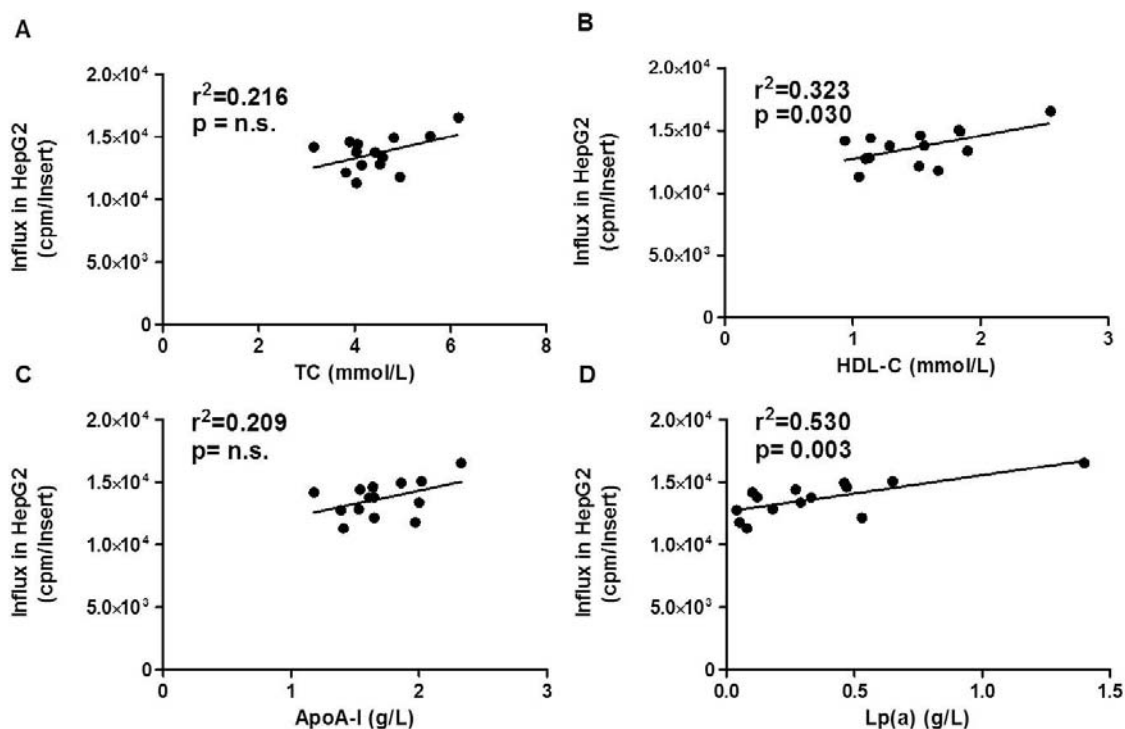


Figure 20: Linear correlation analysis between lipid parameters and crude counts in HepG2 cells (cpm) in the co-culture system using 13 healthy volunteers' sera.

Linear correlation (Pearson) was calculated between crude counts in HepG2 cells (cpm) and total cholesterol (TC) levels (A), HDL-cholesterol levels (HDL-C) (B), apolipoprotein A-I levels (C) and lipoprotein(a) (Lp(a)) (D). No significant correlations between efflux (%) and triglycerides, measured LDL-cholesterol and apolipoprotein B were obtained. Data represent mean of triplicate values. Determination coefficient r^2 and p value of Pearson's test of correlation significance are shown.

DISCUSSION

To solve some of the limitations found in the current models of RCT, we conceived an *in vitro* co-culture system that would embody most of their advantages while also offering an estimation of the efficiency of the macrophages-to-liver portion of RCT. Such model could be at the base of a new biomarker of HDL functionality and/or cardiovascular risk. Moreover, our system can be used to assess the efficiency of any therapeutic strategy that aims at increasing RCT by stimulating cholesterol efflux, which is the first step of RCT and/or by improving hepatic cholesterol uptake and excretion, referring to a downstream critical step for efficient RCT.

To this end, we submitted our *in vitro* co-culture system to a variety of experiments to study the effects of changing conditions on RCT parameters, i.e. cholesterol efflux from macrophages and cholesterol influx in hepatocytes. First, exposure of J774 cells to different concentrations of human serum allowed us to choose a working concentration of 2 % HS, at which we could observe a measurable and reproducible efflux before reaching saturation of serum cholesterol acceptors. The dose-response curves obtained were compatible with the presence of a high capacity, non-specific linear compartment, representing aqueous diffusion-mediated cholesterol efflux and a high affinity saturable serum-specific compartment. Moreover, cAMP and LXR agonists-stimulated J774 cells showed an enhancement of ³H-cholesterol efflux by 35 % and 70 %, respectively, in our co-culture system after 24 h incubation. Those effectors are known to increase the ABCA1-mediated pathway.(Bortnick et al., 2000; Miwa et al., 2009) Finally, correlations of serum components with cholesterol efflux were reported (Mweva et al., 2006), such as the established relationship between HDL-C and apoA-I with cholesterol efflux from unstimulated J774 cells, thus reinforcing the correlations found in our *in vitro* system with the sera from 13 healthy volunteers. Although similar efflux results to previous studies (de la Llera Moya et al., 1994; Mweva et al., 2006) were obtained, the implication of a co-culture system set our data apart and may introduce some discrepancies as to the interpretation of RCT parameters.

Because our co-culture model ushers in an additional compartment where HepG2 cells provides additional cholesterol transport and metabolic pathways, the measurement of cholesterol efflux in our model takes into account these hepatic effects and includes labelled cholesterol found in both medium and captured by hepatocytes. Thus, analysis of RCT parameters in our co-culture system is different from unicellular models. Obviously, a much more elaborate panel of evidence is needed to understand the different pathways used to eliminate excess cholesterol from foam cells towards whole serum and hepatic cells. While this mixture of cholesterol acceptors allows simultaneous evaluation of both efflux and hepatic cholesterol uptake in the co-culture system, testing other cholesterol acceptors in addition to those used in our study (isolated HDL and apoB-depleted HS) such as isolated apoA-I, LDL particles or various combinations of these acceptors would be interesting to assess their relative contribution to cholesterol efflux in our *in vitro* model.

Moreover, utilization of apoE-deprived J774 cells as cholesterol donor cells rules out the contribution of apoE-mediated cholesterol efflux in our system, reducing the complexity of different pathways of cholesterol efflux. However, a possible compensation of apoE-mediated cholesterol efflux may be due to apoE secreted from HepG2 cells in our current system.(Mahley, 1988) Nonetheless, the use of apoE-deprived J774 results in an overall reduction of RCT (Zanotti et al., 2011) and might be improved by the use in our co-culture model of another macrophage cell line expressing apoE, such as human THP-1 macrophages or monocyte-derived macrophages (MDM).(Tedla et al., 2004)

A more complex situation for the downstream steps of the RCT pathway, i.e., hepatic cholesterol uptake and metabolism, was noticed in our *in vitro* co-culture system. First, a co-culture system with two cell types implies more dynamic (and complicated to study) cellular cholesterol fluxes than what is seen in unicellular models. Indeed, both cell types secrete proteins implicated in cholesterol and lipoprotein metabolism and will condition the shared culture medium.

Our choice to use HepG2 cells as cholesterol recipient cells was based on many criteria such as their polarized characteristics and their intracellular cholesterol trafficking properties. These polarized cells have two specialized plasma membrane domains: a basolateral and an apical domain that are separated by tight junctions.(Rodriguez-Boulan and Powell, 1992) This feature makes those transformed hepatocytes able to form apical vacuoles closely resembling bile canalicular structures.(Sormunen et al., 1993) Furthermore, these cells express liver-specific function related to phospholipids, unesterified cholesterol, lipoproteins and bile acid metabolism.(Javitt, 1990) Because HepG2 cells release large amounts of products in the culture media, such as 1) apolipoproteins like apoA-I, apoA-II and apoE, 2) lipoproteins containing apoB (Javitt, 1990) and 3) bile acids, predominantly chenodeoxycholic acid, (Everson and Polokoff, 1986) it creates an ongoing and dynamic movement of cholesterol in and out of HepG2 cells in our co-culture system, however, this make the measurement and analysis of hepatic cholesterol uptake an uneasy and moving target. For example, ³H-cholesterol lipoproteins brought to HepG2 cells after macrophage cholesterol efflux may be internalized and resecreted by HepG2 cells, acting as potent inducer for cholesterol efflux.(Sasahara et al., 1994)

Although we were able to distinguish a serum-specific uptake of labelled cholesterol in HepG2 cells, we failed to notice any significant accumulation of ³H-cholesterol in HepG2 cells exposed to media from J774 cells stimulated with cAMP and LXR agonists compared to untreated cells. In vivo studies with mice and hamsters (Briand et al., 2010; Naik et al., 2006; Yasuda et al., 2010) may provide us with some explanations for what we observed in HepG2 cells.

Comparison between J774 cells, treated or not with LXR agonists, intraperitoneally injected in mice did not show enhanced ³H-cholesterol accumulation in liver from mice who had received stimulated cells compared to control mice.(Naik et al., 2006) Nonetheless, higher ³H-sterol was found in bile of mice exposed to LXR-stimulated macrophages compared to control mice. This suggests that the uptake of cholesterol is efficiently coupled to bile acid synthesis and/or that clearance of

cholesterol and bile acids in the bile are rapid processes, leaving us unable to detect a significant accumulation in the liver. Extraction and quantification of ^3H -bile acids in the media of co-culture could give an indication of the ^3H -cholesterol processing in HepG2 cells (Axelson et al., 1991) and this avenue is still under consideration.

Like mentioned earlier, the HepG2 cell line is a factory for apolipoprotein synthesis and lipoprotein assembly. Cellular cholesterol levels are tightly regulated and the HepG2 cells are programmed to get rid of exceeding cholesterol by its esterification and its secretion in apoB-containing lipoproteins such as LDL.(Thrift et al., 1986) HepG2 cells synthesize and secrete apoA-I, apoE and may efflux cholesterol since they possess transporters and receptors such as ABCA1 and SR-BI, capable of removing FC at the membrane surface.(Denis et al., 2003; Pagler et al., 2006)

Also, it is likely that FC is found on the hepatic cell surface, especially with an impaired secretion of LCAT in the medium of HepG2 cells.(Koren et al., 1985) To rectify the situation, some proposed to: 1) increase SR-BI expression levels to increase hepatic uptake of cholesterol (Annema et al., 2012), 2) block ABCA1 activity in order to limit efflux back to plasma.(Yamamoto et al., 2011) Those strategies would be helpful in the study of the co-culture system by limiting the bidirectional movement of FC at the cell surface, thus facilitating a more unidirectional transport in the HepG2 cells, which could lead to a significant accumulation of cholesterol in hepatic cells. Although effectors like probucol, a well-known molecule which inactivates ABCA1 transporter function as an apoA-I-mediated cellular cholesterol release pathway from the plasma membrane (Wu et al., 2004), are commonly used to treat cells, none are available to stimulate SR-BI receptor in vitro. Also, the efficiency of those compounds may fade over a prolonged interval of time and nullify the desired effect. Other strategies such as cell transfection of hepatic cells with an adenoviral vector expressing SR-BI or the use of siRNA to interfere with expression of hepatocyte ABCA1 could offer more permanent and promising results than those observed with drugs.

Evidence of the opposite effects of SR-BI and ABCA1 on ^3H -cholesterol uptake have already been shown, such as the inhibition of hepatic SR-BI (Zhang et al., 2005)

and stimulation of hepatic ABCA1 (Aravindhan et al., 2006) on hepatocytes, which shows a decrease of hepatic uptake of cholesterol, proving that the proposed arguments have potential to increase the RCT downstream steps.

In addition, although analysis of cholesterol influx in HepG2 cells in such a dynamic model is a difficult task, we were still able to determine a significant correlation between HDL-C levels in healthy volunteers and HepG2 influx counts. It will be interesting to see if a similar correlation can be obtained with coronary patients. We would expect a totally different tendency, probably a lower correlation, since correlation between cholesterol efflux of those individuals and HDL-C indicated a poor association due to a decrease in HDL functionality. Indeed, no significant difference in HDL-C levels was observed between control and coronary patients.(Linsel-Nitschke et al., 2009) But then again, less than 50% of influx counts is attributable to cholesterol efflux as seen in figure 18. As for the correlation seen between Lp(a) and influx counts in HepG2 cells (Figure 20D, p.162), two plausible hypotheses may be considered to explain this result. First, the level of Lp(a) in the serum of one of the healthy donor (donor 134) is very high and strongly influences the linear regression equation. This may result in a statistically significant correlation, when, in fact, no correlation is existent. Secondly, since Lp(a) is known to be a LDL-like particle, some evidence suggests that the catabolism of this lipoprotein implicates the LDL receptor,(Armstrong et al., 1990) thus possibly enhancing cholesterol uptake from Lp(a) in the hepatocyte. Nonetheless, this shows the potential importance of hepatic cholesterol uptake as an underrated marker of HDL functionality. Drugs strategies or interventions to modulate hepatic cholesterol influx as well as those to increase cholesterol efflux are still needed.

Moreover, further optimization is still needed to improve RCT measurement in this new co-culture model. Indeed, our co-culture system presents some limitations. For instance, the measure of hepatic cholesterol influx left us none the wiser, especially with the experiment with LXR agonists (Figure 16, p.157). We need to find a way to decrease the variation that is observed for influx measurements. One way to

resolve this variability could be the use of lower human serum concentration, like 1 %. This would bring the human serum concentration used closer to the dose-response curve K_d (0.85 % HS), the concentration at which 50% of efflux is observed. Also, this could allow us to observe greater magnitude in variation of cholesterol efflux and higher serum-specific counts for influx values. (Figure 14, p.152) Another limitation of our model is that RCT models should also involve the measurement of the transintestinal cholesterol efflux (TICE) pathway, which can account for one third of cholesterol excretion in humans.(van der Velde et al., 2007) One way to include and study TICE pathway could be to replace HepG2 cells in transwells with Caco-2 cells, which when cultured under specific conditions, resembles enterocytes lining the small intestine.(Hidalgo et al., 1989) Additionally, increasing the number of replicates for each experiments (Figure 15, p.154) and/or increasing the power of samples (Figure 18-20, p.160-162) may provide a better analysis of the modulation of ^3H -cholesterol efflux from J774 and hepatic influx in HepG2 cells.

Much more information must be acquired from our *in vitro* co-culture system to fully understand and better measure RCT parameters. Testing different cholesterol acceptors present in serum will allow us to gain more information on how each cholesterol acceptors affect the multi-step process of RCT. These useful informations will come in handy to understand patient's serum capacities to promote RCT and also help identify biomarkers to better predict coronary events. In addition, studying other effectors, drugs that are known to modulate RCT pathway, will help validate the use of our *in vitro* system as a supplementary tool to currently used models of RCT and allow the screening of potential pharmaceutical HDL-based therapies.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1. Baseline characteristics of the 13 healthy men.

Variables	Healthy volunteers n=13
Age, yrs	37.4 ± 10.4
Race, n (%)	Black: 8 (62) Caucasian: 5 (38)
Sex	men
Calcium, mM	4.3 ± 1.1
Glucose, mM	2.3 ± 0.1
Cholesterol levels	
Total cholesterol, mM	4.5 ± 0.8
HDL-cholesterol, mM	1.5 ± 0.4
LDL-cholesterol, mM	2.5 ± 0.5
Triglycerides, mM	1.0 ± 0.6
Apolipoproteins	
Apolipoprotein A-I, g/L	1.7 ± 0.3
Apolipoprotein B, g/L	0.8 ± 0.2
Lipoprotein(a), g/L	0.4 ± 0.4

REFERENCES

- Annema, W., Dijkers, A., Freark de Boer, J., Gautier, T., Rensen, P.C., Rader, D.J., and Tietge, U.J. (2012). ApoE promotes hepatic selective uptake but not RCT due to increased ABCA1-mediated cholesterol efflux to plasma. *J Lipid Res* 53, 929-940.
- Armstrong, V.W., Harrach, B., Robenek, H., Helmhold, M., Walli, A.K., and Seidel, D. (1990). Heterogeneity of human lipoprotein Lp[a]: cytochemical and biochemical studies on the interaction of two Lp[a] species with the LDL receptor. *J Lipid Res* 31, 429-441.
- Asztalos, B.F., de la Llera-Moya, M., Dallal, G.E., Horvath, K.V., Schaefer, E.J., and Rothblat, G.H. (2005). Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res* 46, 2246-2253.
- Attie, A.D., Kastelein, J.P., and Hayden, M.R. (2001). Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 42, 1717-1726.
- Axelsson, M., Mork, B., and Everson, G.T. (1991). Bile acid synthesis in cultured human hepatoblastoma cells. *J Biol Chem* 266, 17770-17777.
- Basu, S.K., Goldstein, J.L., Anderson, G.W., and Brown, M.S. (1976). Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3178-3182.
- Bortnick, A.E., Rothblat, G.H., Stoudt, G., Hoppe, K.L., Royer, L.J., McNeish, J., and Francone, O.L. (2000). The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* 275, 28634-28640.
- Briand, F. (2010). The use of dyslipidemic hamsters to evaluate drug-induced alterations in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 289-297.
- Briand, F., Treguier, M., Andre, A., Grillot, D., Issandou, M., Ouguerram, K., and Sulpice, T. (2010). Liver X receptor activation promotes macrophage-to-feces reverse cholesterol transport in a dyslipidemic hamster model. *J Lipid Res* 51, 763-770.
- Briel, M., Ferreira-Gonzalez, I., You, J.J., Karanicolas, P.J., Akl, E.A., Wu, P., Blechacz, B., Bassler, D., Wei, X., Sharman, A., *et al.* (2009). Association between

change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ* 338, b92.

Canada, H.a.S.F.o. (2012). Decline of cardiovascular disease.

Cuchel, M., and Rader, D.J. (2006). Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 113, 2548-2555.

de la Llera Moya, M., Atger, V., Paul, J.L., Fournier, N., Moatti, N., Giral, P., Friday, K.E., and Rothblat, G. (1994). A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler Thromb* 14, 1056-1065.

Denis, M., Bissonnette, R., Haidar, B., Krimbou, L., Bouvier, M., and Genest, J. (2003). Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines. *Mol Genet Metab* 78, 265-274.

Everson, G.T., and Polokoff, M.A. (1986). HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J Biol Chem* 261, 2197-2201.

Fielding, P.E., Fielding, C.J., Havel, R.J., Kane, J.P., and Tun, P. (1983). Cholesterol net transport, esterification, and transfer in human hyperlipidemic plasma. *J Clin Invest* 71, 449-460.

Genest, J., Jr., Marcil, M., Denis, M., and Yu, L. (1999). High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med* 47, 31-42.

Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, W.B., and Dawber, T.R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 62, 707-714.

Haidar, B., Denis, M., Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J., Jr. (2002). cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J Lipid Res* 43, 2087-2094.

Havel, R.J., Eder, H.A., and Bragdon, J.H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34, 1345-1353.

Hidalgo, I.J., Raub, T.J., and Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.

- Javitt, N.B. (1990). Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J* 4, 161-168.
- Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M.F., Jafri, K., French, B.C., Phillips, J.A., Mucksavage, M.L., Wilensky, R.L., *et al.* (2011). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 364, 127-135.
- Koren, E., McConathy, W.J., Lacko, A.G., and Knowles, B. (1985). Detection of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) in a human hepatoma cell line. *Cancer Biochem Biophys* 7, 301-307.
- Linsel-Nitschke, P., Jansen, H., Aherrahou, Z., Belz, S., Mayer, B., Lieb, W., Huber, F., Kremer, W., Kalbitzer, H.R., Erdmann, J., *et al.* (2009). Macrophage cholesterol efflux correlates with lipoprotein subclass distribution and risk of obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Lipids Health Dis* 8, 14.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T.B., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., *et al.* (2009). Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119, e21-181.
- Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630.
- Mikkola, T.S., Anthony, M.S., Clarkson, T.B., and St Clair, R.W. (2003). Serum cholesterol efflux potential is an independent predictor of coronary artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170, 31-38.
- Miwa, K., Inazu, A., Kawashiri, M., Nohara, A., Higashikata, T., Kobayashi, J., Koizumi, J., Nakajima, K., Nakano, T., Niimi, M., *et al.* (2009). Cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells to serum is preserved in CETP-deficient patients. *Clin Chim Acta* 402, 19-24.
- Mweva, S., Paul, J.L., Cambillau, M., Goudouneche, D., Beaune, P., Simon, A., and Fournier, N. (2006). Comparison of different cellular models measuring in vitro the whole human serum cholesterol efflux capacity. *Eur J Clin Invest* 36, 552-559.
- Naik, S.U., Wang, X., Da Silva, J.S., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2006). Pharmacological activation of

liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 113, 90-97.

Pagler, T.A., Rhode, S., Neuhofer, A., Laggner, H., Strobl, W., Hinterndorfer, C., Volf, I., Pavelka, M., Eckhardt, E.R., van der Westhuyzen, D.R., *et al.* (2006). SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. *J Biol Chem* 281, 11193-11204.

Pajunen, P., Syvanne, M., Castro, G., Nieminen, M.S., and Taskinen, M.R. (2001). Cholesterol efflux capacity in vitro predicts the severity and extent of coronary artery disease in patients with and without type 2 diabetes. *Scand Cardiovasc J* 35, 96-100.

Rodriguez-Boulant, E., and Powell, S.K. (1992). Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol* 8, 395-427.

Rothblat, G.H., Arbogast, L.Y., and Ray, E.K. (1978). Stimulation of esterified cholesterol accumulation in tissue culture cells exposed to high density lipoproteins enriched in free cholesterol. *J Lipid Res* 19, 350-358.

Rothblat, G.H., de la Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D.L., and Phillips, M.C. (1999). Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* 40, 781-796.

Santos-Gallego, C.G., Giannarelli, C., and Badimon, J.J. (2011). Experimental models for the investigation of high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux. *Curr Atheroscler Rep* 13, 266-276.

Sasahara, T., Kobori, S., Kasho, M., Sato, Y., Nishikawa, T., Yano, T., Takeda, H., and Shichiri, M. (1994). The metabolic fate of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins internalized into HepG2 cells: resecreted lipoproteins as a potent inducer for cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 106, 179-190.

Shaw, J.A., Bobik, A., Murphy, A., Kanellakis, P., Blombery, P., Mukhamedova, N., Woollard, K., Lyon, S., Sviridov, D., and Dart, A.M. (2008). Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ Res* 103, 1084-1091.

Singh, I.M., Shishehbor, M.H., and Ansell, B.J. (2007). High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review. *JAMA* 298, 786-798.

- Smith, J.D. (2010). Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 989-996.
- Sormunen, R., Eskelinen, S., and Lehto, V.P. (1993). Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest* 68, 652-662.
- Tall, A.R. (2008). Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 263, 256-273.
- Tan, H.C., Tai, E.S., Sviridov, D., Nestel, P.J., Ng, C., Chan, E., Teo, Y., and Wai, D.C. (2011). Relationships between cholesterol efflux and high-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Lipidol* 5, 467-473.
- Tedla, N., Glaros, E.N., Brunk, U.T., Jessup, W., and Garner, B. (2004). Heterogeneous expression of apolipoprotein-E by human macrophages. *Immunology* 113, 338-347.
- Thrift, R.N., Forte, T.M., Cahoon, B.E., and Shore, V.G. (1986). Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J Lipid Res* 27, 236-250.
- Truong, T.Q., Aubin, D., Falstrault, L., Brodeur, M.R., and Brissette, L. (2010). SR-BI, CD36, and caveolin-1 contribute positively to cholesterol efflux in hepatic cells. *Cell Biochem Funct* 28, 480-489.
- van der Velde, A.E., Vrans, C.L., van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R.P., Kuipers, F., and Groen, A.K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 133, 967-975.
- Via, D.P., Pons, L., Dennison, D.K., Fanslow, A.E., and Bernini, F. (1989). Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1. *J Lipid Res* 30, 1515-1524.
- Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D., and Henke, B.R. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 43, 527-550.
- Wu, C.A., Tsujita, M., Hayashi, M., and Yokoyama, S. (2004). Probucol inactivates ABCA1 in the plasma membrane with respect to its mediation of apolipoprotein

binding and high density lipoprotein assembly and to its proteolytic degradation. *J Biol Chem* *279*, 30168-30174.

Yamamoto, S., Tanigawa, H., Li, X., Komaru, Y., Billheimer, J.T., and Rader, D.J. (2011). Pharmacologic suppression of hepatic ATP-binding cassette transporter 1 activity in mice reduces high-density lipoprotein cholesterol levels but promotes reverse cholesterol transport. *Circulation* *124*, 1382-1390.

Yasuda, T., Grillot, D., Billheimer, J.T., Briand, F., Delerive, P., Huet, S., and Rader, D.J. (2010). Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *30*, 781-786.

Zanotti, I., Pedrelli, M., Poti, F., Stomeo, G., Gomaschi, M., Calabresi, L., and Bernini, F. (2011). Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *31*, 74-80.

Zhang, Y., Zanotti, I., Reilly, M.P., Glick, J.M., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2003). Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* *108*, 661-663.

DISCUSSION

Vu la présence de restrictions dans les modèles courants utilisés pour l'étude du TIC, nous avons tenté de réaliser un système cellulaire *in vitro* qui permettrait de préserver les avantages notés et de combler les points manquants de ces derniers afin d'obtenir une meilleure évaluation de l'effet de différents types d'accepteurs de cholestérol et/ou la modulation de traitements pharmacologiques sur le TIC, compte tenu de son rôle anti-athérogène.

Nous avons donc d'emblée conçu un premier système cellulaire *in vitro* par transfert. Celui-ci se base sur le transfert séquentiel d'un milieu radioactif qui a d'abord été conditionné par des macrophages de souris, les cellules J774, vers des cellules hépatiques humaines, les cellules HepG2 afin de suivre le transport des accepteurs de cholestérol marqués d'une cellule à l'autre. Ce système préliminaire contribue grandement à l'apport d'informations additionnelles soit le mouvement du cholestérol dans l'ensemble du TIC. Ceci diffère des modèles unicellulaires existants puisque ceux-ci focalisent généralement leur essai sur une étape précise du TIC.

Notre véritable système cellulaire *in vitro* adopte une disposition de culture particulière lors des essais du TIC, soit une co-culture entre les macrophages et les hépatocytes, permettant plutôt un échange simultané des accepteurs de cholestérol marqués entre les cellules. La pertinence du système préliminaire par transfert est validée par les informations complémentaires obtenues qui permettent la compréhension des observations tirées du modèle cellulaire *in vitro* de co-culture. En effet, les études préliminaires effectuées avec le système *in vitro* par transfert nous permettent d'analyser de manière claire et individuelle les différentes étapes du TIC, sans l'influence des produits sécrétés des deux types cellulaires l'un sur l'autre, c'est-à-dire l'efflux de cholestérol et la captation hépatique de cholestérol comme étant des circuits fermés indépendants.

Il faut d'abord mentionner que les masses de cholestérol radioactif impliquées dans les résultats d'efflux et d'influx hépatique, antérieurement présentés, ne représentent qu'une infime fraction du flux de masse du cholestérol se déroulant dans les deux systèmes. En effet, l'efflux de cholestérol radioactif à partir des macrophages est accompagné d'une sortie plus élevée de cholestérol non-marqué dû à l'accumulation de cholestérol cellulaire par le gorgement des cellules avec les LDLac. Cependant, certains ont préalablement démontré que la mesure de l'efflux du cholestérol avec un isotope radioactif corrèle positivement de manière significative avec la perte de masse de cholestérol cellulaire à partir de macrophages J774 spumeux.⁵⁴⁴ Ceci permet donc d'étudier la capacité de différents accepteurs de cholestérol à moduler le mouvement du cholestérol hors des cellules dans une situation où le macrophage est en condition de surcharge. De même pour l'influx hépatique, une contribution plus importante du cholestérol non-marqué est sûrement présente comparée par rapport à la captation du cholestérol marqué. Notre signal radioactif est donc dilué par le mouvement de cholestérol non-marqué qui l'accompagne.

L'efflux suivi de la captation hépatique de cholestérol, évalué par transfert, démontre dans nos essais une « déconnexion » au niveau du TIC entre la sortie de cholestérol de macrophages enrichis et les voies d'entrée dans les cellules hépatiques. De fait, nous avons observé une absence de proportionnalité des masses de cholestérol entre les deux paramètres du TIC. (Figure 6, p.116) En effet, malgré la présence de plus d'accepteurs pour l'efflux de cholestérol lorsque les macrophages sont exposés à une concentration de sérum humain croissante, une saturation rapide des cpm est observée au niveau de la captation de cholestérol par les cellules HepG2. Cet effet est aussi observable dans le cas où les cellules J774 ont été traitées à l'AMPc.

Au moins trois hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. La première hypothèse repose sur une captation hépatique du cholestérol limitée. En effet, il est possible que la capacité des particules HDL (ou les transporteurs impliqués dans le

sérum complet) à emmagasiner du cholestérol ait été compromise, soit par une diminution des transferts de cholestérol vers d'autres lipoprotéines plasmatiques par le biais de la CETP, par exemple, ou par une diminution ou limitation de l'estérification du cholestérol efflué par la LCAT.⁵⁴⁵ Ceci pourrait être supporté en effet par la dilution de 10 à 50 fois du sérum humain lors de nos essais expérimentaux, ce qui entraînerait une baisse de l'activité et la fonction de ces enzymes modulatrices des lipoprotéines. Cependant, dans le cas échéant où une dilution de ces protéines plasmatiques serait observée, on pourrait malgré tout noter une hausse de la captation hépatique puisque, premièrement, une voie directe, ne nécessitant pas l'intervention de la CETP, est possible afin d'acheminer le cholestérol au foie et, deuxièmement, l'absence d'estérification du cholestérol n'empêche pas ce dernier, sous sa forme libre, d'être capté par les cellules hépatiques d'où les nombreux débats soulevés sur l'implication de la LCAT dans le TIC.^{297,546}

Une deuxième hypothèse permet d'envisager un retour du cholestérol marqué, capté par les cellules hépatocytes HepG2, vers le milieu par des voies d'efflux et de sécrétion. Si la concentration d'accepteurs de cholestérol est plus grande dans le milieu et que le cholestérol capté par les hépatocytes n'a pas eu le temps d'être estérifié et d'être amené vers des pools intracellulaires, celui-ci peut entamer de nouveau un cycle d'efflux via les transporteurs et les récepteurs à la surface cellulaire hépatique, jusqu'à ce qu'un équilibre soit créé durant le temps utilisé pour l'essai de co-culture.

La troisième hypothèse nous incite à regarder l'activité spécifique du système *in vitro*. Une diminution de l'activité spécifique est apparente au niveau de l'efflux lorsqu'on augmente la concentration de sérum humain, ce qui influence grandement l'influx de ³H-cholestérol dans les cellules hépatiques. En effet, pour une concentration d'accepteurs de cholestérol 5 fois plus élevée dans le milieu entre la condition à 2 % et 10 % (Figure 6, p.116), on n'obtient pas la même proportion de sortie du cholestérol (efflux) des macrophages et d'entrée (influx) dans les

hépatocytes. On note plutôt une augmentation 1,6 fois de l'efflux et 1,1 fois de la captation hépatique, une fois l'efflux et l'influx basal soustraits. Ceci résulte sûrement d'une élimination additionnelle de cholestérol non-marqué des cellules hépatiques. La participation active que joue les cellules du foie dans la synthèse du cholestérol peut expliquer cette réduction.⁵⁴⁷ Les hépatocytes peuvent fournir du cholestérol au milieu, au même titre que les tissus extra-hépatiques (macrophages), en sécrétant des lipoprotéines nouvellement synthétisées, ce qui dilue le pool de cholestérol associé aux lipoprotéines marquées et pourrait compromettre le TIC dans notre système. Cela introduit une compétition entre le cholestérol non marqué et marqué pour la captation hépatique.

Pour améliorer le niveau d'activité spécifique dans le système *in vitro*, il serait intéressant de pré-traiter les cellules HepG2 avec un inhibiteur de la HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante de la synthèse du cholestérol. Le traitement aux statines est la thérapie la plus couramment utilisée et la plus efficace pour diminuer les niveaux de LDL-C chez les patients atteints de MCV.⁵⁴⁸ En effet, la classe de statines qui inclut entre autres les composés atorvastatine, simvastatine et lovastatine, permettrait de mettre un frein à la biosynthèse du cholestérol dans les cellules hépatiques en diminuant l'assemblage et la sécrétion de lipoprotéines contenant l'apoB. Il a déjà été démontré que les cellules HepG2 traitées à l'atorvastatine réduisaient de 30 % de la sécrétion d'apoB.⁵⁴⁹ De plus, une inhibition de l'HMG-CoA réductase peut aussi supprimer la dilution du cholestérol marqué dans les stérols nouvellement synthétisés par les cellules hépatiques, qui diminue son activité spécifique.⁵⁵⁰ Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de la HMG-CoA réductase peut aussi entraîner la sécrétion d'apoA-I et de particules HDL naissantes dans le milieu par les cellules HepG2. En effet, certains chercheurs ont démontré qu'un traitement des cellules hépatiques HepG2 avec 10 μ M de simvastatine augmente de 49% et de 27% respectivement, la sécrétion d'apoA-I et de particules HDL associées avec l'apoA-I dans le milieu par rapport à des cellules HepG2 non-traitées.⁵⁵¹

En jumelant les deux dernières hypothèses soulevées, il serait intéressant de combiner des interventions limitant les voies d'efflux hépatique ainsi que le traitement avec des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase pour tenter d'expliquer la déconnection entre l'efflux des macrophages et l'influx dans les cellules HepG2. En effet, le traitement des hépatocytes avec les statines génère des accepteurs de cholestérol, tel que mentionné ci-haut, susceptible de stimuler un efflux de cholestérol cellulaire. Une combinaison de ce traitement avec une intervention ciblant la diminution de l'expression du transporteur ABCA1 hépatique nous permettrait de limiter cette sortie et possiblement de noter un mouvement de cholestérol unidirectionnel dans les hépatocytes.

Par ailleurs, le système *in vitro* de transfert semble démontrer que la majorité du processus d'efflux et de captation hépatique dans le sérum humain passe par la contribution des particules HDL, puisqu'à masse équivalente en protéines, les HDL isolées donnent des pourcentages d'efflux et d'influx similaires. (Figure 7, p 120) En effet, ces particules possèdent une concentration plasmatique élevée⁵⁴⁵ les rendant les accepteurs de cholestérol les plus abondants dans le plasma et les plus susceptibles à participer au TIC. De plus, l'hétérogénéité des particules HDL permet à celles-ci d'être les substrats de plusieurs transporteurs et récepteurs membranaires connus pour favoriser la sortie du cholestérol des tissus périphériques.^{144,155,170} Cependant, une évaluation du TIC dans notre système préliminaire avec un spectre plus élaboré de lipoprotéines retrouvées dans le sérum humain complet, comme les particules LDL, serait nécessaire afin de valider les résultats obtenus. De plus, une limite existe quant à la provenance des HDL isolées puisqu'elles ne sont pas isolées du même échantillon que le sérum humain.

L'élaboration du système de co-culture *in vitro* a suscité l'évaluation de plusieurs critères préalables afin de rendre fonctionnel un modèle d'étude du TIC. En effet, des tests ont été effectués sur la confluence cellulaire et les caractéristiques physiques nécessaires pour la membrane des chambres de Boyden utilisés pour la co-culture. Un premier objectif était de déterminer la confluence cellulaire

appropriée sur la membrane de l'insert pour optimiser la captation hépatique de notre système. Nous avons choisi d'évaluer la confluence cellulaire par une coloration et une quantification des cellules hépatiques sur la membrane. La coloration nous permet de contraster les cellules HepG2 par rapport à la membrane afin de visualiser l'espacement des cellules sur la membrane et d'évaluer celle-ci par ImagePro 7,0. Or, une meilleure manière d'évaluer la confluence cellulaire nécessaire pour la captation hépatique aurait été de faire des essais de transport de ^3H -cholestérol dans des systèmes de co-cultureensemencés de différentes concentrations cellulaires sur la membrane de l'insert. Ce faisant, une relation entre la confluence cellulaire et la captation hépatique de cholestérol aurait pu être établie.

De plus, nous voulions nous assurer que le matériel et la porosité de la membrane de l'insert choisi influencent peu l'évaluation du TIC dans le système en co-culture, en réduisant l'adsorption du cholestérol sur l'insert et en limitant la rétention de cholestérol dans les pores de la membrane. Nous avons donc opté pour des inserts ayant des membranes faites en polyester et des pores de 3,0 μm . En effet, nous désirions premièrement éviter le passage des cellules au travers de la membrane, ce qui peut se produire avec l'utilisation de pores au-delà de 3,0 μm . Ensuite, nous avons constaté qu'aucun revêtement de la membrane avec les molécules utilisés lors de nos essais n'améliorait l'adsorption et le résidu de ^3H -cholestérol sur la membrane. (Figure 10, p.128-129)

De plus, aucun matériel et tailles de pores n'a apporté d'effets bénéfiques significatifs quant à l'adsorption et au résidu de ^3H -cholestérol sur la membrane. (Figure 11, p.133-134). Le choix d'utiliser des membranes en polyester (PE) repose aussi sur leurs propriétés optimales d'adhésion et de croissance cellulaire. Ces dernières offrent aussi une meilleure visibilité des cellules sur la membrane et permettent l'analyse de la viabilité et la formation d'une monocouche cellulaire par rapport à l'utilisation de membranes faites en polycarbonate (PC). (Tableau II.) En plus, si l'on désire faire l'extraction lipidique afin de déterminer les formes de cholestérol présentes des cellules HepG2 sur la membrane, les membranes en PE

exhibent une meilleure résistance chimique. En outre, la densité des pores peut influencer sur l'emprisonnement de ^3H -cholestérol non spécifique. L'utilisation de membranes ayant des pores inférieurs à $3,0\ \mu\text{m}$ a été rejetée vu une densité de pores 2 à 50 fois plus élevée que celle sur des membranes ayant des pores de $3,0\ \mu\text{m}$. (Tableau II, p.137)

L'utilisation du système de co-culture a apporté certaines préoccupations quant à l'évaluation de la captation hépatique du cholestérol. En effet, lorsqu'on le compare à notre système de transfert *in vitro* préliminaire qui nous permet d'évaluer l'influx de cholestérol de manière isolée dans les cellules HepG2, on note une diminution d'environ 7 fois des comptes spécifiques au sérum avec le système de co-culture.

Nous avons réalisé en faisant l'analyse de nos expériences qu'une diminution de 3,4 fois des cpm dans le système de co-culture par rapport au système par transfert peut être attribuable aux surfaces différentes sur lesquelles la culture des cellules HepG2 est effectuée. En effet, les cellules hépatiques dans notre système *in vitro* par transfert sont mises en culture dans des plaques de 12 puits ayant une surface de $3,8\ \text{cm}^2$ par puits tandis que la surface de la membrane de l'insert se situe à $1,12\ \text{cm}^2$, ce qui peut impliquer une diminution du nombre de cellules HepG2 susceptibles d'effectuer la captation de cholestérol dans les essais de transport du ^3H -cholestérol et une diminution de l'expression de récepteurs engagée dans la captation hépatique de cholestérol. Aucune chambre de Boyden ayant des surfaces de culture plus grande n'existe pour la taille de puits désirée afin d'améliorer la captation hépatique ce qui nous contraint à cette diminution d'un facteur de 3,4.

De plus, comme mentionné précédemment, les capacités d'efflux des cellules hépatiques peuvent entrer, une fois de plus, en compte. Un marquage des cellules HepG2 avec un isotope radioactif différent comme le ^{14}C pourrait nous confirmer s'il y a présence de sécrétion significative de cholestérol hors des cellules, en plus de la quantification et de la localisation du cholestérol sécrété (accumulation dans le

milieu et/ou retour vers les cellules J774). Il nous serait par le même biais possible d'évaluer la proportion de traceur radioactif dans les différentes formes de cholestérol (CL, CE).

Par ailleurs, nous avons aussi réalisé que la diminution restante de 3,9 fois, séparant les cpm spécifiques au sérum dans le système par transfert et le système de co-culture, peut être expliqué par un maintien des cpm dans les cellules hépatiques du système de co-culture lors de la condition sans accepteurs (DMEM seul) par rapport aux cpm attendus après correction du facteur de surface de culture (mentionné ci-haut) dans le système par transfert. En effet, la diminution des cpm apportée par la surface de culture ne semble pas s'appliquer aux cpm dans les cellules HepG2 exposées au DMEM seul du système de co-culture. Donc les cpm dans les cellules HepG2 dans la condition dite « basale » ne diminuent pas de 3,4 fois, et les cpm demeurent similaires à ceux observés par le système par transfert.

Ceci suscite des interrogations quant au choix de notre contrôle négatif lors des essais de transport du ^3H -cholestérol. Sa participation est importante pour établir la captation hépatique spécifique au sérum. Une hypothèse pourrait peut-être expliquer cette captation hépatique de cholestérol substantielle que l'on observe dans un milieu auquel des accepteurs de cholestérol n'ont pas été ajoutés. Les cellules HepG2 sécrètent certainement de l'apoA-I et de l'apoE^{440,552} dans notre milieu de co-culture. Ces accepteurs de cholestérol pourraient alors contribuer à stimuler l'efflux de cholestérol par les cellules J774 et générer une captation hépatique spécifique par SR-BI. De plus, la sécrétion hépatique de lipoprotéines contenant l'apoB⁵⁵³ peut aussi contribuer à augmenter la captation hépatique dans le DMEM seul en participant à des échanges par la CETP avec des lipoprotéines contenant l'apoA-I, afin d'être éliminé par le rLDL. Ce dernier augmente de plus belle l'élimination hépatique de ces lipoprotéines puisqu'il a été démontré que la transcription du gène du rLDL est augmentée considérablement dans les cellules en absence de stérols dans le milieu de culture.⁵⁵⁴ Notre vision du transport de

cholestérol en milieu sans accepteurs, soit un transport par diffusion aqueuse, était peut-être un peu simpliste.

Ainsi, le DMEM sans accepteurs n'est peut être pas le meilleur contrôle puisqu'il ne reflète pas de manière exacte la situation basale recherchée. En effet, il serait peut être préférable d'utiliser un milieu additionné de sérum déplété en lipoprotéines (LPDS), ce qui nous permettrait d'avoir les protéines plasmatiques qui peuvent peut-être avoir un rôle dans la captation hépatique du cholestérol.

Un élément additionnel de réponse pour tenter d'expliquer cette baisse de captation hépatique est la relation spécifique à l'espèce dans notre système qui serait masquée dans notre système *in vitro* par transfert vu une superficie plus grande que celle observée dans le système de co-culture. En effet, l'interaction des accepteurs de cholestérol provenant du sérum humain avec les transporteurs et récepteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol chez des macrophages spumeux de souris peut amener une variabilité lors de la mesure des paramètres du TIC en lien avec l'affinité des transporteurs et récepteurs similaires chez l'humain. (Affinité de l'apoA-I humaine avec la protéine ABCA1 de souris, par exemple) Cette différence inter-espèce peut donc amener un certain obstacle et peut influencer la captation hépatique faite par les cellules hépatiques humaines. C'est pourquoi l'élaboration d'un système de co-culture *in vitro* complètement humanisée permettrait une analyse plus juste du TIC.

Bien que plusieurs questions demandent d'être étudiées plus en profondeur quant à la fonctionnalité du système de co-culture, notre système de co-culture tente de contrecarrer les lacunes perçues dans les modèles *in vitro* et *in vivo* couramment utilisés pour le TIC. En effet, notre système de co-culture a permis de déterminer la contribution considérable des particules HDL dans les paramètres initiaux et finaux du TIC. De plus, les résultats obtenus en co-culture ont été validés dans notre système préliminaire par transfert. Ceci supporte davantage la recherche et l'élaboration d'outils permettant d'étudier les nombreuses étapes du TIC, qui

pourraient devenir de bons biomarqueurs de l'athérosclérose ou du risque CV. En effet, l'unique observation des niveaux de HDL-C chez des patients n'est pas un indice suffisant afin d'entrevoir le développement de l'athérosclérose. La capacité des HDL à extraire le cholestérol des tissus périphériques et à l'acheminer vers une excrétion biliaire semble un bien meilleur indicateur. De plus, un système de coculture comme le nôtre peut aussi permettre l'étude de plusieurs composés ou thérapies pharmacologiques capables d'avoir des effets bénéfiques sur le TIC, en plus de permettre l'évaluation de la susceptibilité d'un patient à développer des MCAS en étudiant la capacité de son sérum à promouvoir le TIC.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **119**, e21-181 (2009).
- 2 Lloyd-Jones, D. M., Larson, M. G., Beiser, A. & Levy, D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* **353**, 89-92 (1999).
- 3 Lerner, D. J. & Kannel, W. B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* **111**, 383-390 (1986).
- 4 Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **115**, e69-171 (2007).
- 5 Goff, D. C., Jr., Brass, L., Braun, L. T., Croft, J. B., Flesch, J. D. *et al.* Essential features of a surveillance system to support the prevention and management of heart disease and stroke: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Stroke, and Cardiovascular Nursing and the Interdisciplinary Working Groups on Quality of Care and Outcomes Research and Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease. *Circulation* **115**, 127-155 (2007).
- 6 McGovern, P. G., Pankow, J. S., Shahar, E., Doliszny, K. M., Folsom, A. R. *et al.* Recent trends in acute coronary heart disease--mortality, morbidity, medical care, and risk factors. The Minnesota Heart Survey Investigators. *N Engl J Med* **334**, 884-890 (1996).
- 7 Collins, R., Armitage, J., Parish, S., Sleight, P., Peto, R. *et al.* Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet* **363**, 757-767 (2004).
- 8 Lawes, C. M., Bennett, D. A., Feigin, V. L. & Rodgers, A. Blood pressure and stroke: an overview of published reviews. *Stroke* **35**, 1024 (2004).

- 9 Furie, K. L., Kasner, S. E., Adams, R. J., Albers, G. W., Bush, R. L. *et al.* Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **42**, 227-276 (2011).
- 10 Doll, R. & Hill, A. B. Mortality of British doctors in relation to smoking: observations on coronary thrombosis. *Natl Cancer Inst Monogr* **19**, 205-268 (1966).
- 11 Lee, C. D., Folsom, A. R. & Blair, S. N. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke* **34**, 2475-2481 (2003).
- 12 Grundy, S. M., Wilhelmsen, L., Rose, G., Campbell, R. W. & Assman, G. Coronary heart disease in high-risk populations: lessons from Finland. *Eur Heart J* **11**, 462-471 (1990).
- 13 Toth, P. P. Cardiology patient page. The "good cholesterol": high-density lipoprotein. *Circulation* **111**, e89-91 (2005).
- 14 Phan, T. G., Koh, M. & Wijedicks, E. F. Safety of discontinuation of anticoagulation in patients with intracranial hemorrhage at high thromboembolic risk. *Arch Neurol* **57**, 1710-1713 (2000).
- 15 Bertram, M., Bonsanto, M., Hacke, W. & Schwab, S. Managing the therapeutic dilemma: patients with spontaneous intracerebral hemorrhage and urgent need for anticoagulation. *J Neurol* **247**, 209-214 (2000).
- 16 Marenberg, M. E., Risch, N., Berkman, L. F., Floderus, B. & de Faire, U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* **330**, 1041-1046 (1994).
- 17 Schunkert, H., König, I. R., Kathiresan, S., Reilly, M. P., Assimes, T. L. *et al.* Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* **43**, 333-338 (2011).
- 18 Innerarity, T. L., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Bersot, T. P., Krauss, R. M. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* **31**, 1337-1349 (1990).

- 19 Luc, G., Bard, J. M., Arveiler, D., Evans, A., Cambou, J. P. *et al.* Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* **14**, 1412-1419 (1994).
- 20 Marcovina, S. M., Hegele, R. A. & Koschinsky, M. L. Lipoprotein(a) and coronary heart disease risk. *Curr Cardiol Rep* **1**, 105-111 (1999).
- 21 Goldstein, J. L., Schrott, H. G., Hazzard, W. R., Bierman, E. L. & Motulsky, A. G. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* **52**, 1544-1568 (1973).
- 22 Eichner, J. E., Dunn, S. T., Perveen, G., Thompson, D. M., Stewart, K. E. *et al.* Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* **155**, 487-495 (2002).
- 23 Lambert, J. C., Brousseau, T., Defosse, V., Evans, A., Arveiler, D. *et al.* Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations-the ECTIM study. *Hum Mol Genet* **9**, 57-61 (2000).
- 24 Boerwinkle, E. & Utermann, G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet* **42**, 104-112 (1988).
- 25 Nakai, K., Fusazaki, T., Zhang, T., Shiroto, T., Osawa, M. *et al.* Polymorphism of the apolipoprotein E and angiotensin I converting enzyme genes in Japanese patients with myocardial infarction. *Coron Artery Dis* **9**, 329-334 (1998).
- 26 Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Ray, K., Boren, J., Andreotti, F. *et al.* Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* **31**, 2844-2853 (2010).
- 27 Kamstrup, P. R., Tybjaerg-Hansen, A., Steffensen, R. & Nordestgaard, B. G. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* **301**, 2331-2339 (2009).
- 28 Suk Danik, J., Rifai, N., Buring, J. E. & Ridker, P. M. Lipoprotein(a), measured with an assay independent of apolipoprotein(a) isoform size, and

- risk of future cardiovascular events among initially healthy women. *JAMA* **296**, 1363-1370 (2006).
- 29 Luke, M. M., Kane, J. P., Liu, D. M., Rowland, C. M., Shiffman, D. *et al.* A polymorphism in the protease-like domain of apolipoprotein(a) is associated with severe coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2030-2036 (2007).
- 30 Stary, H. C. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* **11 Suppl E**, 3-19 (1990).
- 31 Martin, M. J., Hulley, S. B., Browner, W. S., Kuller, L. H. & Wentworth, D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* **2**, 933-936 (1986).
- 32 Brewer, H. B., Jr. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* **83**, 3F-12F (1999).
- 33 Le, N. A., Gibson, J. C. & Ginsberg, H. N. Independent regulation of plasma apolipoprotein C-II and C-III concentrations in very low density and high density lipoproteins: implications for the regulation of the catabolism of these lipoproteins. *J Lipid Res* **29**, 669-677 (1988).
- 34 Windler, E. & Havel, R. J. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res* **26**, 556-565 (1985).
- 35 Alaupovic, P., Knight-Gibson, C., Wang, C. S., Downs, D., Koren, E. *et al.* Isolation and characterization of an apoA-II-containing lipoprotein (LP-A-II:B complex) from plasma very low density lipoproteins of patients with Tangier disease and type V hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* **32**, 9-19 (1991).
- 36 Lamarche, B., St-Pierre, A. C., Ruel, I. L., Cantin, B., Dagenais, G. R. *et al.* A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemic heart disease in men. *Can J Cardiol* **17**, 859-865 (2001).

- 37 Austin, M. A., King, M. C., Vranizan, K. M. & Krauss, R. M. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* **82**, 495-506 (1990).
- 38 Crouse, J. R., Parks, J. S., Schey, H. M. & Kahl, F. R. Studies of low density lipoprotein molecular weight in human beings with coronary artery disease. *J Lipid Res* **26**, 566-574 (1985).
- 39 Tribble, D. L. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior. *Curr Opin Lipidol* **6**, 196-208 (1995).
- 40 Anber, V., Griffin, B. A., McConnell, M., Packard, C. J. & Shepherd, J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* **124**, 261-271 (1996).
- 41 Bjornheden, T., Babyi, A., Bondjers, G. & Wiklund, O. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis* **123**, 43-56 (1996).
- 42 Krauss, R. M. Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Curr Opin Lipidol* **5**, 339-349 (1994).
- 43 Kuusi, T., Saarinen, P. & Nikkila, E. A. Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein2 in man. *Atherosclerosis* **36**, 589-593 (1980).
- 44 Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science* **292**, 1310-1312 (2001).
- 45 Marks, D., Thorogood, M., Neil, H. A. & Humphries, S. E. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* **168**, 1-14 (2003).
- 46 Hobbs, H. H., Russell, D. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* **24**, 133-170 (1990).

- 47 Spady, D. K., Bilheimer, D. W. & Dietschy, J. M. Rates of receptor-dependent and -independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3499-3503 (1983).
- 48 Zuliani, G., Arca, M., Signore, A., Bader, G., Fazio, S. *et al.* Characterization of a new form of inherited hypercholesterolemia: familial recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 802-809 (1999).
- 49 Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* **52**, 223-261 (1983).
- 50 Soria, L. F., Ludwig, E. H., Clarke, H. R., Vega, G. L., Grundy, S. M. *et al.* Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 587-591 (1989).
- 51 Milne, R., Theolis, R., Jr., Maurice, R., Pease, R. J., Weech, P. K. *et al.* The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. *J Biol Chem* **264**, 19754-19760 (1989).
- 52 Pandit, S., Wisniewski, D., Santoro, J. C., Ha, S., Ramakrishnan, V. *et al.* Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J Lipid Res* **49**, 1333-1343 (2008).
- 53 Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* **34**, 154-156 (2003).
- 54 Lagace, T. A., Curtis, D. E., Garuti, R., McNutt, M. C., Park, S. W. *et al.* Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* **116**, 2995-3005 (2006).
- 55 Fisher, T. S., Lo Surdo, P., Pandit, S., Mattu, M., Santoro, J. C. *et al.* Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem* **282**, 20502-20512 (2007).

- 56 Ridker, P. M., Glynn, R. J. & Hennekens, C. H. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* **97**, 2007-2011 (1998).
- 57 Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Gallimore, J. R., Grillo, R. L., Rebuffi, A. G. *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* **331**, 417-424 (1994).
- 58 Haverkate, F., Thompson, S. G., Pyke, S. D., Gallimore, J. R. & Pepys, M. B. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* **349**, 462-466 (1997).
- 59 Nathan, D. M., Singer, D. E., Hurxthal, K. & Goodson, J. D. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* **310**, 341-346 (1984).
- 60 Madamanchi, N. R., Vendrov, A. & Runge, M. S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 29-38 (2005).
- 61 Griendling, K. K. & FitzGerald, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **108**, 1912-1916 (2003).
- 62 Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R. E., Szocs, K. *et al.* Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1429-1435 (2002).
- 63 Michiels, C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* **196**, 430-443 (2003).
- 64 Vita, J. A. & Keaney, J. F., Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* **106**, 640-642 (2002).
- 65 Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S. *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* **108**, 1772-1778 (2003).
- 66 Cybulsky, M. I. & Gimbrone, M. A., Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**, 788-791 (1991).
- 67 Ross, R. The arterial wall and atherosclerosis. *Annu Rev Med* **30**, 1-15 (1979).

- 68 French, J. E. Atherosclerosis in relation to the structure and function of the arterial intima, with special reference to the endothelium. *Int Rev Exp Pathol* **5**, 253-353 (1966).
- 69 Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809 (1993).
- 70 Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* **272**, 20963-20966 (1997).
- 71 Gooch, K. J., Dangler, C. A. & Frangos, J. A. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* **171**, 252-258 (1997).
- 72 Malek, A. M., Alper, S. L. & Izumo, S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* **282**, 2035-2042 (1999).
- 73 Cancel, L. M., Fitting, A. & Tarbell, J. M. In vitro study of LDL transport under pressurized (convective) conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H126-132 (2007).
- 74 Cancel, L. M. & Tarbell, J. M. The role of mitosis in LDL transport through cultured endothelial cell monolayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H769-776 (2011).
- 75 Carew, T. E., Pittman, R. C., Marchand, E. R. & Steinberg, D. Measurement in vivo of irreversible degradation of low density lipoprotein in the rabbit aorta. Predominance of intimal degradation. *Arteriosclerosis* **4**, 214-224 (1984).
- 76 Davies, M. J., Richardson, P. D., Woolf, N., Katz, D. R. & Mann, J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* **69**, 377-381 (1993).
- 77 Williams, K. J. & Tabas, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 551-561 (1995).
- 78 Xu, X. X. & Tabas, I. Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Biol Chem* **266**, 24849-24858 (1991).

- 79 Catapano, A. L., Maggi, F. M. & Tragni, E. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* **15**, 355-363 (2000).
- 80 Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* **108**, 785-791 (2001).
- 81 Krieger, M. & Herz, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* **63**, 601-637 (1994).
- 82 Terpstra, V., van Amersfoort, E. S., van Velzen, A. G., Kuiper, J. & van Berkel, T. J. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1860-1872 (2000).
- 83 Insull, W., Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* **122**, S3-S14 (2009).
- 84 Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126 (1999).
- 85 Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503-516 (2001).
- 86 Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. & Schwartz, S. M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1262-1275 (2000).
- 87 Geng, Y. J., Phillips, J. E., Mason, R. P. & Casscells, S. W. Cholesterol crystallization and macrophage apoptosis: implication for atherosclerotic plaque instability and rupture. *Biochem Pharmacol* **66**, 1485-1492 (2003).
- 88 Van Vre, E. A., Ait-Oufella, H., Tedgui, A. & Mallat, Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 887-893 (2012).
- 89 Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-874 (2002).

- 90 Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827-839 (2003).
- 91 Burke, A. P., Virmani, R., Galis, Z., Haudenschild, C. C. & Muller, J. E. 34th Bethesda Conference: Task force #2--What is the pathologic basis for new atherosclerosis imaging techniques? *J Am Coll Cardiol* **41**, 1874-1886 (2003).
- 92 Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Finn, A. V., Gold, H. K. *et al.* Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2054-2061 (2005).
- 93 Zhang, J., Pan, L., Xu, Y., Wu, C., Wang, C. *et al.* Total cholesterol content of erythrocyte membranes in acute coronary syndrome: correlation with apolipoprotein A-I and lipoprotein (a). *Coron Artery Dis* **22**, 145-152 (2011).
- 94 Imoto, K., Hiro, T., Fujii, T., Murashige, A., Fukumoto, Y. *et al.* Longitudinal structural determinants of atherosclerotic plaque vulnerability: a computational analysis of stress distribution using vessel models and three-dimensional intravascular ultrasound imaging. *J Am Coll Cardiol* **46**, 1507-1515 (2005).
- 95 Sekiya, M., Osuga, J., Igarashi, M., Okazaki, H. & Ishibashi, S. The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells. *J Atheroscler Thromb* **18**, 359-364 (2011).
- 96 Parthasarathy, S., Fong, L. G., Otero, D. & Steinberg, D. Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 537-540 (1987).
- 97 Nicholson, A. C., Frieda, S., Pearce, A. & Silverstein, R. L. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 269-275 (1995).

- 98 Nicholson, A. C. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPAR γ signaling. *Trends Cardiovasc Med* **14**, 8-12 (2004).
- 99 Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L. *et al.* Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* **277**, 49982-49988 (2002).
- 100 Nakata, A., Nakagawa, Y., Nishida, M., Nozaki, S., Miyagawa, J. *et al.* CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1333-1339 (1999).
- 101 Han, J., Hajjar, D. P., Febbraio, M. & Nicholson, A. C. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* **272**, 21654-21659 (1997).
- 102 Giese, S. P., Amit, Z., Yang, Y. T., Shchepetkina, A. & Katouah, H. Oxidant production, oxLDL uptake, and CD36 levels in human monocyte-derived macrophages are downregulated by the macrophage-generated antioxidant 7,8-dihydroneopterin. *Antioxid Redox Signal* **13**, 1525-1534 (2010).
- 103 Manning-Tobin, J. J., Moore, K. J., Seimon, T. A., Bell, S. A., Sharuk, M. *et al.* Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 19-26 (2009).
- 104 Quan, Z., Yang, H., Yang, Y., Yan, B., Cao, R. *et al.* Construction and functional analysis of a lentiviral expression vector containing a scavenger receptor (SR-PSOX) that binds uniquely phosphatidylserine and oxidized lipoprotein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **39**, 208-216 (2007).
- 105 Kuchibhotla, S., Vanegas, D., Kennedy, D. J., Guy, E., Nimako, G. *et al.* Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* **78**, 185-196 (2008).

- 106 Khoo, J. C., Miller, E., McLoughlin, P. & Steinberg, D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* **8**, 348-358 (1988).
- 107 Boyanovsky, B. B., van der Westhuyzen, D. R. & Webb, N. R. Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans. *J Biol Chem* **280**, 32746-32752 (2005).
- 108 Kruth, H. S., Jones, N. L., Huang, W., Zhao, B., Ishii, I. *et al.* Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem* **280**, 2352-2360 (2005).
- 109 Schmitz, G. & Grandl, M. Lipid homeostasis in macrophages - implications for atherosclerosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **160**, 93-125 (2008).
- 110 Nicolaou, G. & Erridge, C. Toll-like receptor-dependent lipid body formation in macrophage foam cell formation. *Curr Opin Lipidol* **21**, 427-433 (2010).
- 111 Steck, T. L. & Lange, Y. Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends Cell Biol* **20**, 680-687 (2010).
- 112 Mesmin, B. & Maxfield, F. R. Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 636-645 (2009).
- 113 Radhakrishnan, A., Goldstein, J. L., McDonald, J. G. & Brown, M. S. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab* **8**, 512-521 (2008).
- 114 Feng, B. & Tabas, I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J Biol Chem* **277**, 43271-43280 (2002).
- 115 Blom, T. S., Koivusalo, M., Kuismanen, E., Kostainen, R., Somerharju, P. *et al.* Mass spectrometric analysis reveals an increase in plasma membrane polyunsaturated phospholipid species upon cellular cholesterol loading. *Biochemistry* **40**, 14635-14644 (2001).

- 116 Calkin, A. C. & Tontonoz, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 213-224 (2012).
- 117 Dean, R. T. Direct evidence of importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins. *Nature* **257**, 414-416 (1975).
- 118 Jerome, W. G. Lysosomes, cholesterol and atherosclerosis. *Clin Lipidol* **5**, 853-865 (2010).
- 119 Maxfield, F. R. & Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**, 612-621 (2005).
- 120 Brasaemle, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* **48**, 2547-2559 (2007).
- 121 Ducharme, N. A. & Bickel, P. E. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* **149**, 942-949 (2008).
- 122 Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K. & Anderson, R. G. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol* **82**, 597-613 (1979).
- 123 Brown, M. S., Ho, Y. K. & Goldstein, J. L. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem* **255**, 9344-9352 (1980).
- 124 Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I. *et al.* Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab* **13**, 655-667 (2011).
- 125 Ouimet, M. & Marcel, Y. L. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 575-581 (2012).
- 126 Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I. *et al.* Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**, 1131-1135 (2009).
- 127 Neufeld, E. B., Remaley, A. T., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Cooney, A. M. *et al.* Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* **276**, 27584-27590 (2001).

- 128 Tanaka, A. R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G. *et al.* Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J Biol Chem* **278**, 8815-8819 (2003).
- 129 Jerome, W. G. Advanced atherosclerotic foam cell formation has features of an acquired lysosomal storage disorder. *Rejuvenation Res* **9**, 245-255 (2006).
- 130 Yuan, X. M., Li, W., Olsson, A. G. & Brunk, U. T. The toxicity to macrophages of oxidized low-density lipoprotein is mediated through lysosomal damage. *Atherosclerosis* **133**, 153-161 (1997).
- 131 Vellodi, A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* **128**, 413-431 (2005).
- 132 Cox, B. E., Griffin, E. E., Ullery, J. C. & Jerome, W. G. Effects of cellular cholesterol loading on macrophage foam cell lysosome acidification. *J Lipid Res* **48**, 1012-1021 (2007).
- 133 Kruth, H. S., Ifrim, I., Chang, J., Addadi, L., Perl-Treves, D. *et al.* Monoclonal antibody detection of plasma membrane cholesterol microdomains responsive to cholesterol trafficking. *J Lipid Res* **42**, 1492-1500 (2001).
- 134 Sun, Y., Ishibashi, M., Seimon, T., Lee, M., Sharma, S. M. *et al.* Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K. *Circ Res* **104**, 455-465 (2009).
- 135 Kaufman, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* **110**, 1389-1398 (2002).
- 136 Seimon, T. A., Obstfeld, A., Moore, K. J., Golenbock, D. T. & Tabas, I. Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19794-19799 (2006).
- 137 Devries-Seimon, T., Li, Y., Yao, P. M., Stone, E., Wang, Y. *et al.* Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol* **171**, 61-73 (2005).

- 138 Oyadomari, S. & Mori, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**, 381-389 (2004).
- 139 Timmins, J. M., Ozcan, L., Seimon, T. A., Li, G., Malagelada, C. *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest* **119**, 2925-2941 (2009).
- 140 Scull, C. M. & Tabas, I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 2792-2797 (2011).
- 141 Rader, D. J., Alexander, E. T., Weibel, G. L., Billheimer, J. & Rothblat, G. H. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S189-194 (2009).
- 142 Rothblat, G. H., de la Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D. L. *et al.* Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* **40**, 781-796 (1999).
- 143 Kawano, M., Miida, T., Fielding, C. J. & Fielding, P. E. Quantitation of pre beta-HDL-dependent and nonspecific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochemistry* **32**, 5025-5028 (1993).
- 144 de La Llera-Moya, M., Connelly, M. A., Drazul, D., Klein, S. M., Favari, E. *et al.* Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res* **42**, 1969-1978 (2001).
- 145 Rigotti, A., Acton, S. L. & Krieger, M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* **270**, 16221-16224 (1995).
- 146 Liu, T., Krieger, M., Kan, H. Y. & Zannis, V. I. The effects of mutations in helices 4 and 6 of ApoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. *J Biol Chem* **277**, 21576-21584 (2002).
- 147 Krieger, M. The "best" of cholesterols, the "worst" of cholesterols: a tale of two receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4077-4080 (1998).

- 148 Wang, X., Collins, H. L., Ranalletta, M., Fuki, I. V., Billheimer, J. T. *et al.* Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* **117**, 2216-2224 (2007).
- 149 Voloshyna, I. & Reiss, A. B. The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis. *Prog Lipid Res* **50**, 213-224 (2011).
- 150 Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113 (1992).
- 151 Gottesman, M. M. & Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**, 385-427 (1993).
- 152 Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M. F. *et al.* Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 29-33 (1999).
- 153 Baldan, A., Bojanic, D. D. & Edwards, P. A. The ABCs of sterol transport. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S80-85 (2009).
- 154 Nofer, J. R. & Remaley, A. T. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2150-2160 (2005).
- 155 Rust, S., Walter, M., Funke, H., von Eckardstein, A., Cullen, P. *et al.* Assignment of Tangier disease to chromosome 9q31 by a graphical linkage exclusion strategy. *Nat Genet* **20**, 96-98 (1998).
- 156 Fielding, P. E., Nagao, K., Hakamata, H., Chimini, G. & Fielding, C. J. A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* **39**, 14113-14120 (2000).
- 157 Rothblat, G. H., Mahlberg, F. H., Johnson, W. J. & Phillips, M. C. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J Lipid Res* **33**, 1091-1097 (1992).
- 158 Yancey, P. G., Bortnick, A. E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M. C. *et al.* Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 712-719 (2003).

- 159 Bolanos-Garcia, V. M., Renault, A. & Beaufils, S. Surface rheology and adsorption kinetics reveal the relative amphiphilicity, interfacial activity, and stability of human exchangeable apolipoproteins. *Biophys J* **94**, 1735-1745 (2008).
- 160 Chieze, L., Bolanos-Garcia, V. M., Pinot, M., Desbat, B., Renault, A. *et al.* Fluid and condensed ApoA-I/phospholipid monolayers provide insights into ApoA-I membrane insertion. *J Mol Biol* **410**, 60-76 (2011).
- 161 Palgunachari, M. N., Mishra, V. K., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Adeyeye, S. O. *et al.* Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity. Implications for HDL assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 328-338 (1996).
- 162 Iatan, I., Bailey, D., Ruel, I., Hafiane, A., Campbell, S. *et al.* Membrane microdomains modulate oligomeric ABCA1 function: impact on apoAI-mediated lipid removal and phosphatidylcholine biosynthesis. *J Lipid Res* **52**, 2043-2055 (2011).
- 163 Kellner-Weibel, G., de La Llera-Moya, M., Connelly, M. A., Stoudt, G., Christian, A. E. *et al.* Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry* **39**, 221-229 (2000).
- 164 Lammers, B., Out, R., Hildebrand, R. B., Quinn, C. M., Williamson, D. *et al.* Independent protective roles for macrophage Abcg1 and Apoe in the atherosclerotic lesion development. *Atherosclerosis* **205**, 420-426 (2009).
- 165 Venkateswaran, A., Repa, J. J., Lobaccaro, J. M., Bronson, A., Mangelsdorf, D. J. *et al.* Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* **275**, 14700-14707 (2000).
- 166 Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F. & Tall, A. R. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1310-1316 (2006).
- 167 Oram, J. F. & Vaughan, A. M. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* **99**, 1031-1043 (2006).

- 168 Sankaranarayanan, S., Oram, J. F., Asztalos, B. F., Vaughan, A. M., Lund-Katz, S. *et al.* Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J Lipid Res* **50**, 275-284 (2009).
- 169 Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K. *et al.* Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res* **47**, 1791-1802 (2006).
- 170 Kennedy, M. A., Barrera, G. C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P. *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* **1**, 121-131 (2005).
- 171 Gelissen, I. C., Harris, M., Rye, K. A., Quinn, C., Brown, A. J. *et al.* ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 534-540 (2006).
- 172 Vaughan, A. M. & Oram, J. F. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res* **47**, 2433-2443 (2006).
- 173 Out, R., Hoekstra, M., Habets, K., Meurs, I., de Waard, V. *et al.* Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 258-264 (2008).
- 174 Lorkowski, S., Kratz, M., Wenner, C., Schmidt, R., Weitkamp, B. *et al.* Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 821-830 (2001).
- 175 Terasaka, N., Wang, N., Yvan-Charvet, L. & Tall, A. R. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15093-15098 (2007).
- 176 Mahley, R. W. & Rall, S. C., Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**, 507-537 (2000).
- 177 Bellosta, S., Mahley, R. W., Sanan, D. A., Murata, J., Newland, D. L. *et al.* Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces

- atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *J Clin Invest* **96**, 2170-2179 (1995).
- 178 Langer, C., Huang, Y., Cullen, P., Wiesenhutter, B., Mahley, R. W. *et al.* Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *J Mol Med (Berl)* **78**, 217-227 (2000).
- 179 Von Eckardstein, A., Langer, C., Engel, T., Schaukal, I., Cignarella, A. *et al.* ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J* **15**, 1555-1561 (2001).
- 180 Basu, S. K., Ho, Y. K., Brown, M. S., Bilheimer, D. W., Anderson, R. G. *et al.* Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem* **257**, 9788-9795 (1982).
- 181 Bjorkhem, I. Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? *J Lipid Res* **50 Suppl**, S213-218 (2009).
- 182 Westman, J., Kallin, B., Bjorkhem, I., Nilsson, J. & Diczfalusy, U. Sterol 27-hydroxylase- and apoAI/phospholipid-mediated efflux of cholesterol from cholesterol-laden macrophages: evidence for an inverse relation between the two mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 554-561 (1998).
- 183 Lund, E., Andersson, O., Zhang, J., Babiker, A., Ahlborg, G. *et al.* Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of intracellular cholesterol in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 208-212 (1996).
- 184 Dzeletovic, S., Breuer, O., Lund, E. & Diczfalusy, U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem* **225**, 73-80 (1995).
- 185 Bjorkhem, I. & Gustafsson, J. Mitochondrial omega-hydroxylation of cholesterol side chain. *J Biol Chem* **249**, 2528-2535 (1974).
- 186 Brown, A. J. & Jessup, W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **142**, 1-28 (1999).

- 187 Escher, G., Krozowski, Z., Croft, K. D. & Sviridov, D. Expression of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) enhances cholesterol efflux. *J Biol Chem* **278**, 11015-11019 (2003).
- 188 Babiker, A., Andersson, O., Lund, E., Xiu, R. J., Deeb, S. *et al.* Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* **272**, 26253-26261 (1997).
- 189 Fu, X., Menke, J. G., Chen, Y., Zhou, G., MacNaul, K. L. *et al.* 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* **276**, 38378-38387 (2001).
- 190 Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728-731 (1996).
- 191 Ouimet, M., Wang, M. D., Cadotte, N., Ho, K. & Marcel, Y. L. Epoxycholesterol impairs cholesteryl ester hydrolysis in macrophage foam cells, resulting in decreased cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1144-1150 (2008).
- 192 An, S., Jang, Y. S., Park, J. S., Kwon, B. M., Paik, Y. K. *et al.* Inhibition of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase stimulates cholesterol efflux from macrophages and stimulates farnesoid X receptor in hepatocytes. *Exp Mol Med* **40**, 407-417 (2008).
- 193 Rodriguez, A., Bachorik, P. S. & Wee, S. B. Novel effects of the acyl-coenzyme A:Cholesterol acyltransferase inhibitor 58-035 on foam cell development in primary human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2199-2206 (1999).
- 194 Sakashita, N., Chang, C. C., Lei, X., Fujiwara, Y., Takeya, M. *et al.* Cholesterol loading in macrophages stimulates formation of ER-derived vesicles with elevated ACAT1 activity. *J Lipid Res* **51**, 1263-1272 (2010).
- 195 Zhao, B., Song, J., Chow, W. N., St Clair, R. W., Rudel, L. L. *et al.* Macrophage-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase

- significantly reduces atherosclerosis and lesion necrosis in Ldlr mice. *J Clin Invest* **117**, 2983-2992 (2007).
- 196 Crow, J. A., Middleton, B. L., Borazjani, A., Hatfield, M. J., Potter, P. M. *et al.* Inhibition of carboxylesterase 1 is associated with cholesteryl ester retention in human THP-1 monocyte/macrophages. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 643-654 (2008).
- 197 Ghosh, S. Macrophage cholesterol homeostasis and metabolic diseases: critical role of cholesteryl ester mobilization. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **9**, 329-340 (2011).
- 198 Oram, J. F., Lawn, R. M., Garvin, M. R. & Wade, D. P. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* **275**, 34508-34511 (2000).
- 199 Bortnick, A. E., Rothblat, G. H., Stoudt, G., Hoppe, K. L., Royer, L. J. *et al.* The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* **275**, 28634-28640 (2000).
- 200 Le Goff, W., Zheng, P., Brubaker, G. & Smith, J. D. Identification of the cAMP-responsive enhancer of the murine ABCA1 gene: requirement for CREB1 and STAT3/4 elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 527-533 (2006).
- 201 Padovani, A. M., Molina, M. F. & Mann, K. K. Inhibition of liver x receptor/retinoid X receptor-mediated transcription contributes to the proatherogenic effects of arsenic in macrophages in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1228-1236 (2010).
- 202 Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 459-481 (2000).
- 203 Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A. *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* **9**, 1033-1045 (1995).

- 204 Laffitte, B. A., Repa, J. J., Joseph, S. B., Wilpitz, D. C., Kast, H. R. *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 507-512 (2001).
- 205 Chinetti, G., Fruchart, J. C. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol* **14**, 459-468 (2003).
- 206 Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E. *et al.* Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* **98**, 2088-2093 (1998).
- 207 Schoonjans, K., Staels, B. & Auwerx, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* **37**, 907-925 (1996).
- 208 Argmann, C. A., Sawyez, C. G., McNeil, C. J., Hegele, R. A. & Huff, M. W. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 475-482 (2003).
- 209 Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B. *et al.* PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* **7**, 53-58 (2001).
- 210 Chinetti, G., Gbaguidi, F. G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M. *et al.* CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* **101**, 2411-2417 (2000).
- 211 Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y. *et al.* A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* **7**, 161-171 (2001).
- 212 Akiyama, T. E., Sakai, S., Lambert, G., Nicol, C. J., Matsusue, K. *et al.* Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and

- apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* **22**, 2607-2619 (2002).
- 213 Vosper, H., Patel, L., Graham, T. L., Khoudoli, G. A., Hill, A. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* **276**, 44258-44265 (2001).
- 214 Javitt, N. B. Biologic role(s) of the 25(R),26-hydroxycholesterol metabolic pathway. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 136-141 (2000).
- 215 Wang, Y. & Oram, J. F. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem* **277**, 5692-5697 (2002).
- 216 Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M. *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693-704 (1998).
- 217 Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* **14**, 2831-2838 (2000).
- 218 Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M. *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* **14**, 2819-2830 (2000).
- 219 Sun, Y., Hao, M., Luo, Y., Liang, C. P., Silver, D. L. *et al.* Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol Chem* **278**, 5813-5820 (2003).
- 220 Regev, R., Assaraf, Y. G. & Eytan, G. D. Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells. *Eur J Biochem* **259**, 18-24 (1999).
- 221 O'Brien, K. D., Gordon, D., Deeb, S., Ferguson, M. & Chait, A. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **89**, 1544-1550 (1992).

- 222 Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M. *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* **277**, 1705-1711 (2002).
- 223 Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M. *et al.* Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* **17**, 1240-1254 (2003).
- 224 Shridas, P., Bailey, W. M., Gizard, F., Oslund, R. C., Gelb, M. H. *et al.* Group X secretory phospholipase A2 negatively regulates ABCA1 and ABCG1 expression and cholesterol efflux in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2014-2021 (2010).
- 225 Beynen, A. C. Mode of hypocholesterolemic action of probucol in animals and man. *Artery* **14**, 113-126 (1987).
- 226 Parthasarathy, S., Young, S. G., Witztum, J. L., Pittman, R. C. & Steinberg, D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest* **77**, 641-644 (1986).
- 227 Favari, E., Zanotti, I., Zimetti, F., Ronda, N., Bernini, F. *et al.* Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 2345-2350 (2004).
- 228 Wu, C. A., Tsujita, M., Hayashi, M. & Yokoyama, S. Probucol inactivates ABCA1 in the plasma membrane with respect to its mediation of apolipoprotein binding and high density lipoprotein assembly and to its proteolytic degradation. *J Biol Chem* **279**, 30168-30174 (2004).
- 229 Duong, M., Collins, H. L., Jin, W., Zanotti, I., Favari, E. *et al.* Relative contributions of ABCA1 and SR-BI to cholesterol efflux to serum from fibroblasts and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 541-547 (2006).

- 230 Nieland, T. J., Penman, M., Dori, L., Krieger, M. & Kirchhausen, T. Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15422-15427 (2002).
- 231 Nieland, T. J., Chroni, A., Fitzgerald, M. L., Maliga, Z., Zannis, V. I. *et al.* Cross-inhibition of SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol transport by the small molecules BLT-4 and glyburide. *J Lipid Res* **45**, 1256-1265 (2004).
- 232 Yu, L., Cao, G., Repa, J. & Stangl, H. Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages. *J Lipid Res* **45**, 889-899 (2004).
- 233 Havel, R. J., Kane, J. P. & Kashyap, M. L. Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. *J Clin Invest* **52**, 32-38 (1973).
- 234 Hui, D. Y., Labonte, E. D. & Howles, P. N. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G839-843 (2008).
- 235 van Greevenbroek, M. M. & de Bruin, T. W. Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* **141 Suppl 1**, S9-16 (1998).
- 236 Lee, M. H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S. *et al.* Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* **27**, 79-83 (2001).
- 237 Yu, L., Bharadwaj, S., Brown, J. M., Ma, Y., Du, W. *et al.* Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem* **281**, 6616-6624 (2006).
- 238 Attie, A. D. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci* **32**, 172-179 (2007).
- 239 Mansbach, C. M., 2nd & Gorelick, F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of

- chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G645-650 (2007).
- 240 Kane, J. P. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu Rev Physiol* **45**, 637-650 (1983).
- 241 Smith, H. C., Kuo, S. R., Backus, J. W., Harris, S. G., Sparks, C. E. *et al.* In vitro apolipoprotein B mRNA editing: identification of a 27S editing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1489-1493 (1991).
- 242 Gibbons, G. F. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J* **268**, 1-13 (1990).
- 243 Harris, S. G., Sabio, I., Mayer, E., Steinberg, M. F., Backus, J. W. *et al.* Extract-specific heterogeneity in high-order complexes containing apolipoprotein B mRNA editing activity and RNA-binding proteins. *J Biol Chem* **268**, 7382-7392 (1993).
- 244 Hussain, M. M. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* **148**, 1-15 (2000).
- 245 Segrest, J. P., Jones, M. K., Mishra, V. K., Anantharamaiah, G. M. & Garber, D. W. apoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE. *Arterioscler Thromb* **14**, 1674-1685 (1994).
- 246 Rava, P., Ojakian, G. K., Shelness, G. S. & Hussain, M. M. Phospholipid transfer activity of microsomal triacylglycerol transfer protein is sufficient for the assembly and secretion of apolipoprotein B lipoproteins. *J Biol Chem* **281**, 11019-11027 (2006).
- 247 Hussain, M. M., Shi, J. & Dreizen, P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* **44**, 22-32 (2003).
- 248 Stahl, A., Gimeno, R. E., Tartaglia, L. A. & Lodish, H. F. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 266-273 (2001).
- 249 Siddiqi, S. A., Gorelick, F. S., Mahan, J. T. & Mansbach, C. M., 2nd. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum

- budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* **116**, 415-427 (2003).
- 250 Black, D. D. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G519-524 (2007).
- 251 Innerarity, T. L. & Mahley, R. W. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* **17**, 1440-1447 (1978).
- 252 LaRosa, J. C., Levy, R. I., Herbert, P., Lux, S. E. & Fredrickson, D. S. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* **41**, 57-62 (1970).
- 253 Goldberg, I. J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* **37**, 693-707 (1996).
- 254 Dugi, K. A., Dichek, H. L., Talley, G. D., Brewer, H. B., Jr. & Santamarina-Fojo, S. Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J Biol Chem* **267**, 25086-25091 (1992).
- 255 Redgrave, T. G. Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *J Clin Invest* **49**, 465-471 (1970).
- 256 Cooper, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* **38**, 2173-2192 (1997).
- 257 Carrella, M. & Cooper, A. D. High affinity binding of chylomicron remnants to rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 338-342 (1979).
- 258 Hamilton, R. L., Wong, J. S., Guo, L. S., Krisans, S. & Havel, R. J. Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryothin sections. *J Lipid Res* **31**, 1589-1603 (1990).
- 259 Mahley, R. W. & Ji, Z. S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* **40**, 1-16 (1999).

- 260 Robinson, D. S. Plasma triglyceride metabolism. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* **5**, 5-10 (1973).
- 261 Shelness, G. S., Ingram, M. F., Huang, X. F. & DeLozier, J. A. Apolipoprotein B in the rough endoplasmic reticulum: translation, translocation and the initiation of lipoprotein assembly. *J Nutr* **129**, 456S-462S (1999).
- 262 Borchardt, R. A. & Davis, R. A. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. *J Biol Chem* **262**, 16394-16402 (1987).
- 263 Heimberg, M. & Weinstein, I. A mechanism for the induction by carbon tetrachloride of fatty liver in the rat. *Biochem Pharmacol* **11**, 163-165 (1962).
- 264 Chappell, D. A., Fry, G. L., Waknitz, M. A., Muhonen, L. E. & Pladet, M. W. Low density lipoprotein receptors bind and mediate cellular catabolism of normal very low density lipoproteins in vitro. *J Biol Chem* **268**, 25487-25493 (1993).
- 265 Duong, M., Psaltis, M., Rader, D. J., Marchadier, D., Barter, P. J. *et al.* Evidence that hepatic lipase and endothelial lipase have different substrate specificities for high-density lipoprotein phospholipids. *Biochemistry* **42**, 13778-13785 (2003).
- 266 Connelly, P. W. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* **286**, 243-255 (1999).
- 267 Yazdanyar, A., Yeang, C. & Jiang, X. C. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* **13**, 242-248 (2011).
- 268 van Tol, A. Phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* **13**, 135-139 (2002).
- 269 Chajek, T. & Fielding, C. J. Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3445-3449 (1978).

- 270 Pittman, R. C. & Steinberg, D. Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoproteins. *J Lipid Res* **25**, 1577-1585 (1984).
- 271 Liu, B., Xie, C., Richardson, J. A., Turley, S. D. & Dietschy, J. M. Receptor-mediated and bulk-phase endocytosis cause macrophage and cholesterol accumulation in Niemann-Pick C disease. *J Lipid Res* **48**, 1710-1723 (2007).
- 272 Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4431-4435 (1994).
- 273 Liou, H. L., Dixit, S. S., Xu, S., Tint, G. S., Stock, A. M. *et al.* NPC2, the protein deficient in Niemann-Pick C2 disease, consists of multiple glycoforms that bind a variety of sterols. *J Biol Chem* **281**, 36710-36723 (2006).
- 274 Walkley, S. U. & Suzuki, K. Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim Biophys Acta* **1685**, 48-62 (2004).
- 275 Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986).
- 276 Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem* **249**, 7306-7314 (1974).
- 277 Saucier, S. E., Kandutsch, A. A., Gayen, A. K., Swahn, D. K. & Spencer, T. A. Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. Effect of dietary cholesterol. *J Biol Chem* **264**, 6863-6869 (1989).
- 278 Goldstein, J. L., Dana, S. E. & Brown, M. S. Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4288-4292 (1974).
- 279 Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11041-11048 (1999).

- 280 Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A. *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* **48**, 646-654 (2008).
- 281 Horton, J. D., Cohen, J. C. & Hobbs, H. H. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S172-177 (2009).
- 282 Maxwell, K. N. & Breslow, J. L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7100-7105 (2004).
- 283 Qian, Y. W., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Chu, S., Lin, A. *et al.* Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res* **48**, 1488-1498 (2007).
- 284 Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L. *et al.* Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 413-419 (2007).
- 285 Khera, A. V. & Rader, D. J. Future therapeutic directions in reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* **12**, 73-81 (2010).
- 286 Santos-Gallego, C. G., Giannarelli, C. & Badimon, J. J. Experimental models for the investigation of high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux. *Curr Atheroscler Rep* **13**, 266-276 (2011).
- 287 Yokoyama, S. Assembly of high-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 20-27 (2006).
- 288 Lewis, G. F. & Rader, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* **96**, 1221-1232 (2005).
- 289 Lund-Katz, S., Liu, L., Thuahnai, S. T. & Phillips, M. C. High density lipoprotein structure. *Front Biosci* **8**, d1044-1054 (2003).
- 290 Castro, G. R. & Fielding, C. J. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* **27**, 25-29 (1988).

- 291 Kunitake, S. T., La Sala, K. J. & Kane, J. P. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *J Lipid Res* **26**, 549-555 (1985).
- 292 Davidson, W. S., Sparks, D. L., Lund-Katz, S. & Phillips, M. C. The molecular basis for the difference in charge between pre-beta- and alpha-migrating high density lipoproteins. *J Biol Chem* **269**, 8959-8965 (1994).
- 293 Fielding, C. J. & Fielding, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* **36**, 211-228 (1995).
- 294 Raffai, R. L., Hasty, A. H., Wang, Y., Mettler, S. E., Sanan, D. A. *et al.* Hepatocyte-derived ApoE is more effective than non-hepatocyte-derived ApoE in remnant lipoprotein clearance. *J Biol Chem* **278**, 11670-11675 (2003).
- 295 Vedhachalam, C., Narayanaswami, V., Neto, N., Forte, T. M., Phillips, M. C. *et al.* The C-terminal lipid-binding domain of apolipoprotein E is a highly efficient mediator of ABCA1-dependent cholesterol efflux that promotes the assembly of high-density lipoproteins. *Biochemistry* **46**, 2583-2593 (2007).
- 296 Getz, G. S. & Reardon, C. A. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S156-161 (2009).
- 297 Rousset, X., Shamburek, R., Vaisman, B., Amar, M. & Remaley, A. T. Lecithin cholesterol acyltransferase: an anti- or pro-atherogenic factor? *Curr Atheroscler Rep* **13**, 249-256 (2011).
- 298 Czarnecka, H. & Yokoyama, S. Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J Biol Chem* **271**, 2023-2028 (1996).
- 299 Rousset, X., Vaisman, B., Amar, M., Sethi, A. A. & Remaley, A. T. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **16**, 163-171 (2009).
- 300 Applebaum-Bowden, D. Lipases and lecithin: cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* **6**, 130-135 (1995).

- 301 Matsuura, F., Wang, N., Chen, W., Jiang, X. C. & Tall, A. R. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J Clin Invest* **116**, 1435-1442 (2006).
- 302 Jonas, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 245-256 (2000).
- 303 Dobiasova, M. & Frohlich, J. Understanding the mechanism of LCAT reaction may help to explain the high predictive value of LDL/HDL cholesterol ratio. *Physiol Res* **47**, 387-397 (1998).
- 304 Cheung, M. C. & Albers, J. J. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* **259**, 12201-12209 (1984).
- 305 Sethi, A. A., Sampson, M., Warnick, R., Muniz, N., Vaisman, B. *et al.* High pre-beta1 HDL concentrations and low lecithin: cholesterol acyltransferase activities are strong positive risk markers for ischemic heart disease and independent of HDL-cholesterol. *Clin Chem* **56**, 1128-1137 (2010).
- 306 Santamarina-Fojo, S., Gonzalez-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E. & Nong, Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1750-1754 (2004).
- 307 Annema, W. & Tietge, U. J. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* **13**, 257-265 (2011).
- 308 Ruel, I. L., Couture, P., Cohn, J. S., Bensadoun, A., Marcil, M. *et al.* Evidence that hepatic lipase deficiency in humans is not associated with proatherogenic changes in HDL composition and metabolism. *J Lipid Res* **45**, 1528-1537 (2004).
- 309 Rader, D. J. Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. *Am J Cardiol* **92**, 42J-49J (2003).
- 310 McCoy, M. G., Sun, G. S., Marchadier, D., Maugeais, C., Glick, J. M. *et al.* Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res* **43**, 921-929 (2002).

- 311 Yasuda, T., Ishida, T. & Rader, D. J. Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J* **74**, 2263-2270 (2010).
- 312 Maugeais, C., Tietge, U. J., Broedl, U. C., Marchadier, D., Cain, W. *et al.* Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation* **108**, 2121-2126 (2003).
- 313 Pattnaik, N. M., Montes, A., Hughes, L. B. & Zilversmit, D. B. Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization. *Biochim Biophys Acta* **530**, 428-438 (1978).
- 314 Lagrost, L., Gambert, P., Dangremont, V., Athias, A. & Lallemant, C. Role of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in the HDL conversion process as evidenced by using anti-CETP monoclonal antibodies. *J Lipid Res* **31**, 1569-1575 (1990).
- 315 Kunitake, S. T., Mendel, C. M. & Hennessy, L. K. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J Lipid Res* **33**, 1807-1816 (1992).
- 316 Pattnaik, N. M. & Zilversmit, D. B. Interaction of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **254**, 2782-2786 (1979).
- 317 Hesler, C. B., Swenson, T. L. & Tall, A. R. Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Biol Chem* **262**, 2275-2282 (1987).
- 318 Swenson, T. L., Brocia, R. W. & Tall, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein has binding sites for neutral lipids and phospholipids. *J Biol Chem* **263**, 5150-5157 (1988).
- 319 Tall, A. R., Abreu, E. & Shuman, J. Separation of a plasma phospholipid transfer protein from cholesterol ester/phospholipid exchange protein. *J Biol Chem* **258**, 2174-2180 (1983).
- 320 Sammett, D. & Tall, A. R. Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. *J Biol Chem* **260**, 6687-6697 (1985).

- 321 Clay, M. A., Rye, K. A. & Barter, P. J. Evidence in vitro that hepatic lipase reduces the concentration of apolipoprotein A-I in rabbit high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1044**, 50-56 (1990).
- 322 Tall, A. R. Plasma lipid transfer proteins. *J Lipid Res* **27**, 361-367 (1986).
- 323 Son, Y. S. & Zilversmit, D. B. Purification and characterization of human plasma proteins that inhibit lipid transfer activities. *Biochim Biophys Acta* **795**, 473-480 (1984).
- 324 Groener, J. E., van Gent, T. & van Tol, A. Effect of lipid transfer protein on plasma lipids, apolipoproteins and metabolism of high-density lipoprotein cholesteryl ester in the rat. *Biochim Biophys Acta* **1002**, 93-100 (1989).
- 325 Granot, E., Tabas, I. & Tall, A. R. Human plasma cholesteryl ester transfer protein enhances the transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins into cultured HepG2 cells. *J Biol Chem* **262**, 3482-3487 (1987).
- 326 Rinninger, F. & Pittman, R. C. Mechanism of the cholesteryl ester transfer protein-mediated uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by Hep G2 cells. *J Biol Chem* **264**, 6111-6118 (1989).
- 327 Koizumi, J., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Michishita, I., Takeda, M. *et al.* Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis* **58**, 175-186 (1985).
- 328 Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J. *et al.* Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* **323**, 1234-1238 (1990).
- 329 Miwa, K., Inazu, A., Kawashiri, M., Nohara, A., Higashikata, T. *et al.* Cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells to serum is preserved in CETP-deficient patients. *Clin Chim Acta* **402**, 19-24 (2009).
- 330 Asztalos, B. F., Horvath, K. V., Kajinami, K., Nartsupha, C., Cox, C. E. *et al.* Apolipoprotein composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Lipid Res* **45**, 448-455 (2004).

- 331 Settasatian, N., Duong, M., Curtiss, L. K., Ehnholm, C., Jauhiainen, M. *et al.* The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* **276**, 26898-26905 (2001).
- 332 Rye, K. A. & Barter, P. J. Changes in the size and density of human high-density lipoproteins promoted by a plasma-conversion factor. *Biochim Biophys Acta* **875**, 429-438 (1986).
- 333 Dusserre, E., Moulin, P. & Vidal, H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* **1500**, 88-96 (2000).
- 334 Oka, T., Kujiraoka, T., Ito, M., Egashira, T., Takahashi, S. *et al.* Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive. *J Lipid Res* **41**, 1651-1657 (2000).
- 335 Murdoch, S. J., Wolfbauer, G., Kennedy, H., Marcovina, S. M., Carr, M. C. *et al.* Differences in reactivity of antibodies to active versus inactive PLTP significantly impacts PLTP measurement. *J Lipid Res* **43**, 281-289 (2002).
- 336 Vikstedt, R., Metso, J., Hakala, J., Olkkonen, V. M., Ehnholm, C. *et al.* Cholesterol efflux from macrophage foam cells is enhanced by active phospholipid transfer protein through generation of two types of acceptor particles. *Biochemistry* **46**, 11979-11986 (2007).
- 337 Pussinen, P. J., Jauhiainen, M. & Ehnholm, C. ApoA-II/apoA-I molar ratio in the HDL particle influences phospholipid transfer protein-mediated HDL interconversion. *J Lipid Res* **38**, 12-21 (1997).
- 338 Rye, K. A., Jauhiainen, M., Barter, P. J. & Ehnholm, C. Triglyceride-enrichment of high density lipoproteins enhances their remodelling by phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* **39**, 613-622 (1998).
- 339 Huuskonen, J., Olkkonen, V. M., Ehnholm, C., Metso, J., Julkunen, I. *et al.* Phospholipid transfer is a prerequisite for PLTP-mediated HDL conversion. *Biochemistry* **39**, 16092-16098 (2000).

- 340 Cheung, M. C. & Albers, J. J. Active plasma phospholipid transfer protein is associated with apoA-I- but not apoE-containing lipoproteins. *J Lipid Res* **47**, 1315-1321 (2006).
- 341 Massey, J. B., Hickson, D., She, H. S., Sparrow, J. T., Via, D. P. *et al.* Measurement and prediction of the rates of spontaneous transfer of phospholipids between plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **794**, 274-280 (1984).
- 342 Huuskonen, J., Olkkonen, V. M., Jauhiainen, M. & Ehnholm, C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* **155**, 269-281 (2001).
- 343 von Eckardstein, A., Jauhiainen, M., Huang, Y., Metso, J., Langer, C. *et al.* Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim Biophys Acta* **1301**, 255-262 (1996).
- 344 Lusa, S., Jauhiainen, M., Metso, J., Somerharju, P. & Ehnholm, C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem J* **313** (Pt 1), 275-282 (1996).
- 345 Settasatian, N., Barter, P. J. & Rye, K. A. Remodeling of apolipoprotein E-containing spherical reconstituted high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* **49**, 115-126 (2008).
- 346 Rao, R., Albers, J. J., Wolfbauer, G. & Pownall, H. J. Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry* **36**, 3645-3653 (1997).
- 347 Rhinds, D. & Brissette, L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 39-77 (2004).
- 348 Vinals, M., Xu, S., Vasile, E. & Krieger, M. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem* **278**, 5325-5332 (2003).

- 349 Connelly, M. A. & Williams, D. L. Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol* **15**, 287-295 (2004).
- 350 Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R. *et al.* Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* **387**, 414-417 (1997).
- 351 Harder, C. J., Meng, A., Rippstein, P., McBride, H. M. & McPherson, R. SR-BI undergoes cholesterol-stimulated transcytosis to the bile canaliculus in polarized WIF-B cells. *J Biol Chem* **282**, 1445-1455 (2007).
- 352 Rodriguez, W. V., Thuahnai, S. T., Temel, R. E., Lund-Katz, S., Phillips, M. C. *et al.* Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J Biol Chem* **274**, 20344-20350 (1999).
- 353 Gu, X., Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J. *et al.* The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J Biol Chem* **273**, 26338-26348 (1998).
- 354 Temel, R. E., Walzem, R. L., Banka, C. L. & Williams, D. L. Apolipoprotein A-I is necessary for the in vivo formation of high density lipoprotein competent for scavenger receptor BI-mediated cholesteryl ester-selective uptake. *J Biol Chem* **277**, 26565-26572 (2002).
- 355 Williams, D. L., de La Llera-Moya, M., Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Connelly, M. A. *et al.* Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic alpha-helix as a recognition motif. *J Biol Chem* **275**, 18897-18904 (2000).
- 356 Liadaki, K. N., Liu, T., Xu, S., Ishida, B. Y., Duchateaux, P. N. *et al.* Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association

- and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem* **275**, 21262-21271 (2000).
- 357 Silver, D. L., Wang, N. & Tall, A. R. Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. *J Clin Invest* **105**, 151-159 (2000).
- 358 Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M. A., Lund-Katz, S., Phillips, M. C. *et al.* Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol Biol Cell* **15**, 384-396 (2004).
- 359 Williams, D. L., Wong, J. S. & Hamilton, R. L. SR-BI is required for microvillar channel formation and the localization of HDL particles to the surface of adrenocortical cells in vivo. *J Lipid Res* **43**, 544-549 (2002).
- 360 Cristobal, S., Ochoa, B. & Fresnedo, O. Purification and properties of a cholesteryl ester hydrolase from rat liver microsomes. *J Lipid Res* **40**, 715-725 (1999).
- 361 Connelly, M. A., Kellner-Weibel, G., Rothblat, G. H. & Williams, D. L. SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res* **44**, 331-341 (2003).
- 362 Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. L. *et al.* Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* **272**, 20982-20985 (1997).
- 363 Ji, Y., Wang, N., Ramakrishnan, R., Sehayek, E., Huszar, D. *et al.* Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* **274**, 33398-33402 (1999).
- 364 Swarnakar, S., Temel, R. E., Connelly, M. A., Azhar, S. & Williams, D. L. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem* **274**, 29733-29739 (1999).
- 365 Webb, N. R., de Beer, M. C., Yu, J., Kindy, M. S., Daugherty, A. *et al.* Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-

- I, but not apoB, in human apoB transgenic mice. *J Lipid Res* **43**, 1421-1428 (2002).
- 366 Jin, W., Marchadier, D. & Rader, D. J. Lipases and HDL metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 174-178 (2002).
- 367 Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Kuipers, F. & Tietge, U. J. Hepatic SR-BI, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. *J Lipid Res* **50**, 1571-1580 (2009).
- 368 Tietge, U. J., Nijstad, N., Havinga, R., Baller, J. F., van der Sluijs, F. H. *et al.* Secretory phospholipase A2 increases SR-BI-mediated selective uptake from HDL but not biliary cholesterol secretion. *J Lipid Res* **49**, 563-571 (2008).
- 369 Nijstad, N., Wiersma, H., Gautier, T., van der Giet, M., Maugeais, C. *et al.* Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem* **284**, 6093-6100 (2009).
- 370 Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J. *et al.* Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6538-6543 (2000).
- 371 Silver, D. L., Wang, N. & Vogel, S. Identification of small PDZK1-associated protein, DD96/MAP17, as a regulator of PDZK1 and plasma high density lipoprotein levels. *J Biol Chem* **278**, 28528-28532 (2003).
- 372 Fu, T., Kozarsky, K. F. & Borensztajn, J. Overexpression of SR-BI by adenoviral vector reverses the fibrate-induced hypercholesterolemia of apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem* **278**, 52559-52563 (2003).
- 373 Ueda, Y., Royer, L., Gong, E., Zhang, J., Cooper, P. N. *et al.* 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**, 7165-7171 (1999).
- 374 Brundert, M., Ewert, A., Heeren, J., Behrendt, B., Ramakrishnan, R. *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* **25**, 143-148 (2005).

- 375 Rigotti, A., Trigatti, B., Babitt, J., Penman, M., Xu, S. *et al.* Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* **8**, 181-188 (1997).
- 376 Schwartz, C. C., VandenBroek, J. M. & Cooper, P. S. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *J Lipid Res* **45**, 1594-1607 (2004).
- 377 Ouguerram, K., Krempf, M., Maugeais, C., Maugere, P., Darmaun, D. *et al.* A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism* **51**, 5-11 (2002).
- 378 Zhang, L. H., Kamanna, V. S., Zhang, M. C. & Kashyap, M. L. Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *J Lipid Res* **49**, 1195-1201 (2008).
- 379 Leyva, J. A., Bianchet, M. A. & Amzel, L. M. Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review). *Mol Membr Biol* **20**, 27-33 (2003).
- 380 Lobau, S., Weber, J. & Senior, A. E. Nucleotide occupancy of F1-ATPase catalytic sites under crystallization conditions. *FEBS Lett* **404**, 15-18 (1997).
- 381 Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezon, E. *et al.* Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* **421**, 75-79 (2003).
- 382 Grundy, S. M., Mok, H. Y., Zech, L. & Berman, M. Influence of nicotinic acid on metabolism of cholesterol and triglycerides in man. *J Lipid Res* **22**, 24-36 (1981).
- 383 Shepherd, J., Packard, C. J., Patsch, J. R., Gotto, A. M., Jr. & Taunton, O. D. Effects of nicotinic acid therapy on plasma high density lipoprotein subfraction distribution and composition and on apolipoprotein A metabolism. *J Clin Invest* **63**, 858-867 (1979).
- 384 Fabre, A. C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V. *et al.* P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology* **52**, 1477-1483 (2010).

- 385 Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L. O., Sak, K., Rolland, C. *et al.* The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2508-2515 (2005).
- 386 Linsel-Nitschke, P. & Tall, A. R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 193-205 (2005).
- 387 Ginsberg, H. N. & Fisher, E. A. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S162-166 (2009).
- 388 Russell, D. W. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* **6**, 103-110 (1992).
- 389 Russell, D. W. & Setchell, K. D. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* **31**, 4737-4749 (1992).
- 390 Myant, N. B. & Mitropoulos, K. A. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *J Lipid Res* **18**, 135-153 (1977).
- 391 Chiang, J. Y. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* **23**, 443-463 (2002).
- 392 Lewis, G. F. Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* **21**, 345-352 (2006).
- 393 Turley, S. D. & Whiting, M. J. Regulation of bile acid pool size and plasma lipid levels in the SHR/N-corpulent rat: influence of the level of caloric intake. *Metabolism* **37**, 22-27 (1988).
- 394 Botham, K. M. & Bravo, E. The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Prog Lipid Res* **34**, 71-97 (1995).
- 395 Bjorkhem, I., Leoni, V. & Meaney, S. Genetic connections between neurological disorders and cholesterol metabolism. *J Lipid Res* **51**, 2489-2503 (2010).
- 396 Puglielli, L., Rigotti, A., Amigo, L., Nunez, L., Greco, A. V. *et al.* Modulation of intrahepatic cholesterol trafficking: evidence by in vivo antisense treatment for the involvement of sterol carrier protein-2 in newly

- synthesized cholesterol transport into rat bile. *Biochem J* **317** (Pt 3), 681-687 (1996).
- 397 Lavigne, P., Najmanivich, R. & Lehoux, J. G. Mammalian StAR-related lipid transfer (START) domains with specificity for cholesterol: structural conservation and mechanism of reversible binding. *Subcell Biochem* **51**, 425-437 (2010).
- 398 Oude Elferink, R. P. & Groen, A. K. Mechanisms of biliary lipid secretion and their role in lipid homeostasis. *Semin Liver Dis* **20**, 293-305 (2000).
- 399 Robins, S. J. & Brunengraber, H. Origin of biliary cholesterol and lecithin in the rat: contribution of new synthesis and preformed hepatic stores. *J Lipid Res* **23**, 604-608 (1982).
- 400 Patton, G. M., Fasulo, J. M. & Robins, S. J. Evidence that hepatic triglycerides provide acylglycerides for synthesis of bile phosphatidylcholines. *Am J Physiol* **267**, G1028-1034 (1994).
- 401 Cohen, D. E., Leonard, M. R. & Carey, M. C. In vitro evidence that phospholipid secretion into bile may be coordinated intracellularly by the combined actions of bile salts and the specific phosphatidylcholine transfer protein of liver. *Biochemistry* **33**, 9975-9980 (1994).
- 402 Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A. *et al.* Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* **127**, 261-274 (2004).
- 403 Wang, R., Lam, P., Liu, L., Forrest, D., Yousef, I. M. *et al.* Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology* **38**, 1489-1499 (2003).
- 404 Hismiogullari, A. A., Bozdayi, A. M. & Rahman, K. Biliary lipid secretion. *Turk J Gastroenterol* **18**, 65-70 (2007).
- 405 Graf, G. A., Li, W. P., Gerard, R. D., Gelissen, I., White, A. *et al.* Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* **110**, 659-669 (2002).

- 406 Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R. E., Berge, K. E., Horton, J. D. *et al.* Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* **110**, 671-680 (2002).
- 407 Plosch, T., Bloks, V. W., Terasawa, Y., Berdy, S., Siegler, K. *et al.* Sitosterolemia in ABC-transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor. *Gastroenterology* **126**, 290-300 (2004).
- 408 St-Pierre, M. V., Kullak-Ublick, G. A., Hagenbuch, B. & Meier, P. J. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol* **204**, 1673-1686 (2001).
- 409 Samuel, P., Saypoi, G. M., Meilman, E., Mosbach, E. H. & Chafizadeh, M. Absorption of bile acids from the large bowel in man. *J Clin Invest* **47**, 2070-2078 (1968).
- 410 Vrins, C. L. From blood to gut: direct secretion of cholesterol via transintestinal cholesterol efflux. *World J Gastroenterol* **16**, 5953-5957 (2010).
- 411 van der Velde, A. E., Vrins, C. L., van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R. P. *et al.* Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* **133**, 967-975 (2007).
- 412 Vrins, C. L., Ottenhoff, R., van den Oever, K., de Waart, D. R., Kruij, J. K. *et al.* Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *J Lipid Res* (2012).
- 413 Fielding, P. E., Fielding, C. J., Havel, R. J., Kane, J. P. & Tun, P. Cholesterol net transport, esterification, and transfer in human hyperlipidemic plasma. *J Clin Invest* **71**, 449-460 (1983).
- 414 Fielding, C. J., Reaven, G. M. & Fielding, P. E. Human noninsulin-dependent diabetes: identification of a defect in plasma cholesterol transport normalized in vivo by insulin and in vitro by selective immunoadsorption of apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6365-6369 (1982).

- 415 de la Llera Moya, M., Atger, V., Paul, J. L., Fournier, N., Moatti, N. *et al.* A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler Thromb* **14**, 1056-1065 (1994).
- 416 Tall, A. R. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* **263**, 256-273 (2008).
- 417 Mazzone, T. & Reardon, C. Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. *J Lipid Res* **35**, 1345-1353 (1994).
- 418 Ralph, P. & Nakoinz, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* **257**, 393-394 (1975).
- 419 Lucic, D., Huang, Z. H., Gu de, S., Altenburg, M. K., Maeda, N. *et al.* Regulation of macrophage apoE secretion and sterol efflux by the LDL receptor. *J Lipid Res* **48**, 366-372 (2007).
- 420 Ralph, P., Moore, M. A. & Nilsson, K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* **143**, 1528-1533 (1976).
- 421 McCloskey, H. M., Rothblat, G. H. & Glick, J. M. Incubation of acetylated low-density lipoprotein with cholesterol-rich dispersions enhances cholesterol uptake by macrophages. *Biochim Biophys Acta* **921**, 320-332 (1987).
- 422 Kellner-Weibel, G., Jerome, W. G., Small, D. M., Warner, G. J., Stoltenborg, J. K. *et al.* Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 423-431 (1998).
- 423 Asztalos, B. F., de la Llera-Moya, M., Dallal, G. E., Horvath, K. V., Schaefer, E. J. *et al.* Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res* **46**, 2246-2253 (2005).

- 424 Kiss, R. S., Maric, J. & Marcel, Y. L. Lipid efflux in human and mouse macrophagic cells: evidence for differential regulation of phospholipid and cholesterol efflux. *J Lipid Res* **46**, 1877-1887 (2005).
- 425 Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**, 171-176 (1980).
- 426 Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. *et al.* Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**, 7847-7851 (1982).
- 427 Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**, 22-31 (1991).
- 428 Via, D. P., Pons, L., Dennison, D. K., Fanslow, A. E. & Bernini, F. Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1. *J Lipid Res* **30**, 1515-1524 (1989).
- 429 Tajima, S., Hayashi, R., Tsuchiya, S., Miyake, Y. & Yamamoto, A. Cells of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) synthesize and secrete apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* **126**, 526-531 (1985).
- 430 Larrede, S., Quinn, C. M., Jessup, W., Frisdal, E., Olivier, M. *et al.* Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1930-1936 (2009).
- 431 Pitot, H. C., Peraino, C., Morse, P. A., Jr. & Potter, V. R. Hepatomas in Tissue Culture Compared with Adapting Liver in Vivo. *Natl Cancer Inst Monogr* **13**, 229-245 (1964).
- 432 Rothblat, G. H., Arbogast, L. Y. & Ray, E. K. Stimulation of esterified cholesterol accumulation in tissue culture cells exposed to high density lipoproteins enriched in free cholesterol. *J Lipid Res* **19**, 350-358 (1978).

- 433 Friedman, G., Wernette-Hammond, M. E., Hui, D. Y., Mahley, R. W. & Innerarity, T. L. Characterization of lipoprotein receptors on rat Fu5AH hepatoma cells. *J Lipid Res* **28**, 1482-1494 (1987).
- 434 Rothblat, G. H., Bamberger, M. & Phillips, M. C. Reverse cholesterol transport. *Methods Enzymol* **129**, 628-644 (1986).
- 435 Zimetti, F., Weibel, G. K., Duong, M. & Rothblat, G. H. Measurement of cholesterol bidirectional flux between cells and lipoproteins. *J Lipid Res* **47**, 605-613 (2006).
- 436 Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**, 615-616 (1979).
- 437 Truong, T. Q., Aubin, D., Falstraull, L., Brodeur, M. R. & Brissette, L. SR-BI, CD36, and caveolin-1 contribute positively to cholesterol efflux in hepatic cells. *Cell Biochem Funct* **28**, 480-489 (2010).
- 438 Zannis, V. I., Breslow, J. L., SanGiacomo, T. R., Aden, D. P. & Knowles, B. B. Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry* **20**, 7089-7096 (1981).
- 439 Koren, E., McConathy, W. J., Lacko, A. G. & Knowles, B. Detection of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) in a human hepatoma cell line. *Cancer Biochem Biophys* **7**, 301-307 (1985).
- 440 Javitt, N. B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J* **4**, 161-168 (1990).
- 441 Javitt, N. B., Pfeffer, R., Kok, E., Burstein, S., Cohen, B. I. *et al.* Bile acid synthesis in cell culture. *J Biol Chem* **264**, 10384-10387 (1989).
- 442 Everson, G. T. & Polokoff, M. A. HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J Biol Chem* **261**, 2197-2201 (1986).
- 443 Williams, P. T. & Feldman, D. E. Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. *Atherosclerosis* **214**, 196-202 (2011).

- 444 Asztalos, B. F., Batista, M., Horvath, K. V., Cox, C. E., Dallal, G. E. *et al.* Change in alpha1 HDL concentration predicts progression in coronary artery stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 847-852 (2003).
- 445 Asztalos, B. F., Roheim, P. S., Milani, R. L., Lefevre, M., McNamara, J. R. *et al.* Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2670-2676 (2000).
- 446 Khera, A. V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M. F. *et al.* Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* **364**, 127-135 (2011).
- 447 Batta, A. K., Salen, G., Rapole, K. R., Batta, M., Batta, P. *et al.* Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. *J Lipid Res* **40**, 1148-1154 (1999).
- 448 Iverson, S. J., Lang, S. L. & Cooper, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* **36**, 1283-1287 (2001).
- 449 Sehayek, E. & Hazen, S. L. Cholesterol absorption from the intestine is a major determinant of reverse cholesterol transport from peripheral tissue macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1296-1297 (2008).
- 450 van Eck, M., Bos, I. S., Kaminski, W. E., Orso, E., Rothe, G. *et al.* Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6298-6303 (2002).
- 451 Baldan, A., Pei, L., Lee, R., Tarr, P., Tangirala, R. K. *et al.* Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2301-2307 (2006).
- 452 Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N. *et al.* Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* **117**, 3900-3908 (2007).

- 453 Covey, S. D., Krieger, M., Wang, W., Penman, M. & Trigatti, B. L. Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1589-1594 (2003).
- 454 Zhang, W., Yancey, P. G., Su, Y. R., Babaev, V. R., Zhang, Y. *et al.* Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **108**, 2258-2263 (2003).
- 455 Zhang, Y., Da Silva, J. R., Reilly, M., Billheimer, J. T., Rothblat, G. H. *et al.* Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* **115**, 2870-2874 (2005).
- 456 Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Glick, J. M., Krieger, M. & Rader, D. J. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 721-727 (2000).
- 457 Berard, A. M., Foger, B., Remaley, A., Shamburek, R., Vaisman, B. L. *et al.* High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesterol acyltransferase. *Nat Med* **3**, 744-749 (1997).
- 458 Tanigawa, H., Billheimer, J. T., Tohyama, J., Fuki, I. V., Ng, D. S. *et al.* Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* **120**, 160-169 (2009).
- 459 Lambert, G., Sakai, N., Vaisman, B. L., Neufeld, E. B., Marteyn, B. *et al.* Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem* **276**, 15090-15098 (2001).
- 460 Furbee, J. W., Jr., Sawyer, J. K. & Parks, J. S. Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knockout mice. *J Biol Chem* **277**, 3511-3519 (2002).

- 461 Foger, B., Chase, M., Amar, M. J., Vaisman, B. L., Shamburek, R. D. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem* **274**, 36912-36920 (1999).
- 462 Tanigawa, H., Billheimer, J. T., Tohyama, J., Zhang, Y., Rothblat, G. *et al.* Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport. *Circulation* **116**, 1267-1273 (2007).
- 463 Zhang, Y., Zanotti, I., Reilly, M. P., Glick, J. M., Rothblat, G. H. *et al.* Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* **108**, 661-663 (2003).
- 464 Moore, R. E., Navab, M., Millar, J. S., Zimetti, F., Hama, S. *et al.* Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation. *Circ Res* **97**, 763-771 (2005).
- 465 Rothblat, G. H. & Phillips, M. C. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* **21**, 229-238 (2010).
- 466 Briand, F. The use of dyslipidemic hamsters to evaluate drug-induced alterations in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 289-297 (2010).
- 467 Briand, F., Treguier, M., Andre, A., Grillot, D., Issandou, M. *et al.* Liver X receptor activation promotes macrophage-to-feces reverse cholesterol transport in a dyslipidemic hamster model. *J Lipid Res* **51**, 763-770 (2010).
- 468 Kasim-Karakas, S. E., Vriend, H., Almario, R., Chow, L. C. & Goodman, M. N. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med* **128**, 208-213 (1996).
- 469 Taghibiglou, C., Carpentier, A., Van Iderstine, S. C., Chen, B., Rudy, D. *et al.* Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced

- intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem* **275**, 8416-8425 (2000).
- 470 Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Carvalheira, J. B., Velloso, L. A. & Saad, M. J. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E476-482 (2006).
- 471 Lewis, G. F., Murdoch, S., Uffelman, K., Naples, M., Szeto, L. *et al.* Hepatic lipase mRNA, protein, and plasma enzyme activity is increased in the insulin-resistant, fructose-fed Syrian golden hamster and is partially normalized by the insulin sensitizer rosiglitazone. *Diabetes* **53**, 2893-2900 (2004).
- 472 Izem, L. & Morton, R. E. Molecular cloning of hamster lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) and regulation of its expression by hyperlipidemia. *J Lipid Res* **50**, 676-684 (2009).
- 473 Amin, D., Gustafson, S. & Perrone, M. H. Lovastatin is hypertriglyceridemic in Syrian golden hamsters. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 530-534 (1988).
- 474 Doebber, T. W., Kelly, L. J., Zhou, G., Meurer, R., Biswas, C. *et al.* MK-0767, a novel dual PPARalpha/gamma agonist, displays robust antihyperglycemic and hypolipidemic activities. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 323-328 (2004).
- 475 Kothari, H. V., Poirier, K. J., Lee, W. H. & Satoh, Y. Inhibition of cholesterol ester transfer protein CGS 25159 and changes in lipoproteins in hamsters. *Atherosclerosis* **128**, 59-66 (1997).
- 476 Groot, P. H., Pearce, N. J., Yates, J. W., Stocker, C., Sauermelch, C. *et al.* Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *J Lipid Res* **46**, 2182-2191 (2005).
- 477 Pont, F., Duvillard, L., Verges, B. & Gambert, P. Development of compartmental models in stable-isotope experiments: application to lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 853-860 (1998).

- 478 Pont, F., Duvillard, L., Maugeais, C., Athias, A., Persegol, L. *et al.* Isotope ratio mass spectrometry, compared with conventional mass spectrometry in kinetic studies at low and high enrichment levels: application to lipoprotein kinetics. *Anal Biochem* **248**, 277-287 (1997).
- 479 Thompson, G. N., Pacy, P. J., Ford, G. C. & Halliday, D. Practical considerations in the use of stable isotope labelled compounds as tracers in clinical studies. *Biomed Environ Mass Spectrom* **18**, 321-327 (1989).
- 480 Smith, J. D. Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 989-996 (2010).
- 481 Parolini, C., Marchesi, M., Lorenzon, P., Castano, M., Balconi, E. *et al.* Dose-related effects of repeated ETC-216 (recombinant apolipoprotein A-I Milano/1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine complexes) administrations on rabbit lipid-rich soft plaques: in vivo assessment by intravascular ultrasound and magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* **51**, 1098-1103 (2008).
- 482 Barter, P. J., Nicholls, S., Rye, K. A., Anantharamaiah, G. M., Navab, M. *et al.* Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* **95**, 764-772 (2004).
- 483 Dimayuga, P., Zhu, J., Oguchi, S., Chyu, K. Y., Xu, X. O. *et al.* Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periadventitial cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 465-468 (1999).
- 484 Nicholls, S. J., Dusting, G. J., Cutri, B., Bao, S., Drummond, G. R. *et al.* Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* **111**, 1543-1550 (2005).
- 485 Sirtori, C. R., Calabresi, L., Franceschini, G., Baldassarre, D., Amato, M. *et al.* Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation* **103**, 1949-1954 (2001).
- 486 Ameli, S., Hultgardh-Nilsson, A., Cercek, B., Shah, P. K., Forrester, J. S. *et al.* Recombinant apolipoprotein A-I Milano reduces intimal thickening after

- balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* **90**, 1935-1941 (1994).
- 487 Shah, P. K., Yano, J., Reyes, O., Chyu, K. Y., Kaul, S. *et al.* High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation* **103**, 3047-3050 (2001).
- 488 Franceschini, G., Calabresi, L., Chiesa, G., Parolini, C., Sirtori, C. R. *et al.* Increased cholesterol efflux potential of sera from ApoA-IMilano carriers and transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1257-1262 (1999).
- 489 Wang, L., Sharifi, B. G., Pan, T., Song, L., Yukht, A. *et al.* Bone marrow transplantation shows superior atheroprotective effects of gene therapy with apolipoprotein A-I Milano compared with wild-type apolipoprotein A-I in hyperlipidemic mice. *J Am Coll Cardiol* **48**, 1459-1468 (2006).
- 490 Nissen, S. E., Tsunoda, T., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Cooper, C. J. *et al.* Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* **290**, 2292-2300 (2003).
- 491 Weibel, G. L., Alexander, E. T., Joshi, M. R., Rader, D. J., Lund-Katz, S. *et al.* Wild-type ApoA-I and the Milano variant have similar abilities to stimulate cellular lipid mobilization and efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2022-2029 (2007).
- 492 Parolini, C., Chiesa, G., Gong, E., Caligari, S., Cortese, M. M. *et al.* Apolipoprotein A-I and the molecular variant apoA-I(Milano): evaluation of the antiatherogenic effects in knock-in mouse model. *Atherosclerosis* **183**, 222-229 (2005).
- 493 Tardif, J. C., Gregoire, J., L'Allier, P. L., Ibrahim, R., Lesperance, J. *et al.* Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* **297**, 1675-1682 (2007).

- 494 Shaw, J. A., Bobik, A., Murphy, A., Kanellakis, P., Blombery, P. *et al.* Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ Res* **103**, 1084-1091 (2008).
- 495 Degoma, E. M. & Rader, D. J. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nat Rev Cardiol* **8**, 266-277 (2011).
- 496 Sacks, F. M., Rudel, L. L., Conner, A., Akeefe, H., Kostner, G. *et al.* Selective delipidation of plasma HDL enhances reverse cholesterol transport in vivo. *J Lipid Res* **50**, 894-907 (2009).
- 497 Waksman, R., Torguson, R., Kent, K. M., Pichard, A. D., Suddath, W. O. *et al.* 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. *J Am Coll Cardiol* **55**, 2727-2735 (2010).
- 498 Bailey, D., Jahagirdar, R., Gordon, A., Hafiane, A., Campbell, S. *et al.* RVX-208: a small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo. *J Am Coll Cardiol* **55**, 2580-2589 (2010).
- 499 McNeill, E. RVX-208, a stimulator of apolipoprotein AI gene expression for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 357-364 (2010).
- 500 Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Hama, S., Garber, D. W., Chaddha, M. *et al.* Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation* **105**, 290-292 (2002).
- 501 Anantharamaiah, G. M., Jones, J. L., Brouillette, C. G., Schmidt, C. F., Chung, B. H. *et al.* Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Structure of complexes with dimyristoyl phosphatidylcholine. *J Biol Chem* **260**, 10248-10255 (1985).
- 502 Getz, G. S. & Reardon, C. A. Apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: a role in atherosclerosis. *J Inflamm Res* **4**, 83-92 (2011).

- 503 Yancey, P. G., Bielicki, J. K., Johnson, W. J., Lund-Katz, S., Palgunachari, M. N. *et al.* Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. *Biochemistry* **34**, 7955-7965 (1995).
- 504 Datta, G., Chaddha, M., Hama, S., Navab, M., Fogelman, A. M. *et al.* Effects of increasing hydrophobicity on the physical-chemical and biological properties of a class A amphipathic helical peptide. *J Lipid Res* **42**, 1096-1104 (2001).
- 505 Song, X., Fischer, P., Chen, X., Burton, C. & Wang, J. An apoA-I mimetic peptide facilitates off-loading cholesterol from HDL to liver cells through scavenger receptor BI. *Int J Biol Sci* **5**, 637-646 (2009).
- 506 Van Lenten, B. J., Wagner, A. C., Jung, C. L., Ruchala, P., Waring, A. J. *et al.* Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *J Lipid Res* **49**, 2302-2311 (2008).
- 507 Buga, G. M., Navab, M., Imaizumi, S., Reddy, S. T., Yekta, B. *et al.* L-4F alters hyperlipidemic (but not healthy) mouse plasma to reduce platelet aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 283-289 (2010).
- 508 Li, X., Chyu, K. Y., Faria Neto, J. R., Yano, J., Nathwani, N. *et al.* Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* **110**, 1701-1705 (2004).
- 509 Bielicki, J. K., Zhang, H., Cortez, Y., Zheng, Y., Narayanaswami, V. *et al.* A new HDL mimetic peptide that stimulates cellular cholesterol efflux with high efficiency greatly reduces atherosclerosis in mice. *J Lipid Res* **51**, 1496-1503 (2010).
- 510 Davidson, M. H. Update on CETP inhibition. *J Clin Lipidol* **4**, 394-398 (2010).
- 511 Okamoto, H., Yonemori, F., Wakitani, K., Minowa, T., Maeda, K. *et al.* A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature* **406**, 203-207 (2000).

- 512 Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J. *et al.* Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* **357**, 2109-2122 (2007).
- 513 Barter, P. Lessons learned from the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. *Am J Cardiol* **104**, 10E-15E (2009).
- 514 Forrest, M. J., Bloomfield, D., Briscoe, R. J., Brown, P. N., Cumiskey, A. M. *et al.* Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *Br J Pharmacol* **154**, 1465-1473 (2008).
- 515 Krishna, R., Bergman, A. J., Jin, B., Fallon, M., Cote, J. *et al.* Multiple-dose pharmacodynamics and pharmacokinetics of anacetrapib, a potent cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitor, in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* **84**, 679-683 (2008).
- 516 Stein, E. A., Stroes, E. S., Steiner, G., Buckley, B. M., Capponi, A. M. *et al.* Safety and tolerability of dalcetrapib. *Am J Cardiol* **104**, 82-91 (2009).
- 517 Niesor, E. J., Magg, C., Ogawa, N., Okamoto, H., von der Mark, E. *et al.* Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-beta-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* **51**, 3443-3454 (2010).
- 518 de Grooth, G. J., Kuivenhoven, J. A., Stalenhoef, A. F., de Graaf, J., Zwinderman, A. H. *et al.* Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study. *Circulation* **105**, 2159-2165 (2002).
- 519 Kuivenhoven, J. A., de Grooth, G. J., Kawamura, H., Klerkx, A. H., Wilhelm, F. *et al.* Effectiveness of inhibition of cholesteryl ester transfer protein by JTT-705 in combination with pravastatin in type II dyslipidemia. *Am J Cardiol* **95**, 1085-1088 (2005).
- 520 Fayad, Z. A., Mani, V., Woodward, M., Kallend, D., Abt, M. *et al.* Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive

- multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *Lancet* **378**, 1547-1559 (2011).
- 521 Davidson, M. H. HDL and CETP Inhibition: Will This DEFINE the Future? *Curr Treat Options Cardiovasc Med* (2012).
- 522 Krishna, R., Anderson, M. S., Bergman, A. J., Jin, B., Fallon, M. *et al.* Effect of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor, anacetrapib, on lipoproteins in patients with dyslipidaemia and on 24-h ambulatory blood pressure in healthy individuals: two double-blind, randomised placebo-controlled phase I studies. *Lancet* **370**, 1907-1914 (2007).
- 523 Cannon, C. P., Dansky, H. M., Davidson, M., Gotto, A. M., Jr., Brinton, E. A. *et al.* Design of the DEFINE trial: determining the Efficacy and tolerability of CETP INhibition with AnacEtrapib. *Am Heart J* **158**, 513-519 e513 (2009).
- 524 Yvan-Charvet, L., Kling, J., Pagler, T., Li, H., Hubbard, B. *et al.* Cholesterol efflux potential and antiinflammatory properties of high-density lipoprotein after treatment with niacin or anacetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1430-1438 (2010).
- 525 Cannon, C. P., Shah, S., Dansky, H. M., Davidson, M., Brinton, E. A. *et al.* Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med* **363**, 2406-2415 (2010).
- 526 Chapman, M. J., Assmann, G., Fruchart, J. C., Shepherd, J., Sirtori, C. *et al.* Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin* **20**, 1253-1268 (2004).
- 527 Lamon-Fava, S., Diffenderfer, M. R., Barrett, P. H., Buchsbaum, A., Nyaku, M. *et al.* Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (Apo) A-I and ApoB-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1672-1678 (2008).
- 528 Singh, V., Sharma, R., Kumar, A. & Deedwania, P. Low high-density lipoprotein cholesterol: current status and future strategies for management. *Vasc Health Risk Manag* **6**, 979-996 (2010).

- 529 Villines, T. C., Stanek, E. J., Devine, P. J., Turco, M., Miller, M. *et al.* The ARBITER 6-HALTS Trial (Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol 6-HDL and LDL Treatment Strategies in Atherosclerosis): final results and the impact of medication adherence, dose, and treatment duration. *J Am Coll Cardiol* **55**, 2721-2726 (2010).
- 530 Investigators, A.-H., Boden, W. E., Probstfield, J. L., Anderson, T., Chaitman, B. R. *et al.* Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* **365**, 2255-2267 (2011).
- 531 Wise, A., Foord, S. M., Fraser, N. J., Barnes, A. A., Elshourbagy, N. *et al.* Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J Biol Chem* **278**, 9869-9874 (2003).
- 532 Brown, W. V. Expert commentary: the safety of fibrates in lipid-lowering therapy. *Am J Cardiol* **99**, 19C-21C (2007).
- 533 Quinet, E. M., Savio, D. A., Halpern, A. R., Chen, L., Schuster, G. U. *et al.* Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Mol Pharmacol* **70**, 1340-1349 (2006).
- 534 Naik, S. U., Wang, X., Da Silva, J. S., Jaye, M., Macphee, C. H. *et al.* Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* **113**, 90-97 (2006).
- 535 Zanotti, I., Poti, F., Pedrelli, M., Favari, E., Moleri, E. *et al.* The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *J Lipid Res* **49**, 954-960 (2008).
- 536 Yasuda, T., Grillot, D., Billheimer, J. T., Briand, F., Delerive, P. *et al.* Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 781-786 (2010).
- 537 Katz, A., Udata, C., Ott, E., Hickey, L., Burczynski, M. E. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol* **49**, 643-649 (2009).

- 538 Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* **8**, 1243-1248 (2002).
- 539 Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plosch, T., Kok, T. *et al.* Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem* **277**, 34182-34190 (2002).
- 540 Bradley, M. N., Hong, C., Chen, M., Joseph, S. B., Wilpitz, D. C. *et al.* Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE. *J Clin Invest* **117**, 2337-2346 (2007).
- 541 Lo Sasso, G., Murzilli, S., Salvatore, L., D'Errico, I., Petruzzelli, M. *et al.* Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab* **12**, 187-193 (2010).
- 542 Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**, 1345-1353 (1955).
- 543 Radding, C. M. & Steinberg, D. Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J Clin Invest* **39**, 1560-1569 (1960).
- 544 Sankaranarayanan, S., de la Llera-Moya, M., Drazul-Schrader, D., Asztalos, B. F., Weibel, G. L. *et al.* Importance of macrophage cholesterol content on the flux of cholesterol mass. *J Lipid Res* **51**, 3243-3249 (2010).
- 545 Chan, D. C., Hoang, A., Barrett, P. H., Wong, A. T., Nestel, P. J. *et al.* Apolipoprotein B-100 and ApoA-II Kinetics as Determinants of Cellular Cholesterol Efflux. *J Clin Endocrinol Metab* (2012).
- 546 Savel, J., Lafitte, M., Pucheu, Y., Pradeau, V., Tabarin, A. *et al.* Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship - a review of LCAT deficiency. *Vasc Health Risk Manag* **8**, 357-361 (2012).
- 547 Dietschy, J. M., Turley, S. D. & Spady, D. K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* **34**, 1637-1659 (1993).

- 548 Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G. *et al.* Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* **366**, 1267-1278 (2005).
- 549 Scharnagl, H., Schinker, R., Gierens, H., Nauck, M., Wieland, H. *et al.* Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* **62**, 1545-1555 (2001).
- 550 Qin, W., Infante, J., Wang, S. R. & Infante, R. Regulation of HMG-CoA reductase, apoprotein-B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **1127**, 57-66 (1992).
- 551 Bonn, V., Cheung, R. C., Chen, B., Taghibiglou, C., Van Iderstine, S. C. *et al.* Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. *Atherosclerosis* **163**, 59-68 (2002).
- 552 Mahley, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622-630 (1988).
- 553 Thrift, R. N., Forte, T. M., Cahoon, B. E. & Shore, V. G. Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J Lipid Res* **27**, 236-250 (1986).
- 554 Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-430 (1990).