

**Université de Montréal**

Cette thèse intitulée:

**Investigation du rôle des molécules de signalisation  
cellulaire dans la lipidation de l'apolipoprotéine A-I**

présentée par:

**Bassam Haidar**

Département de Médecine  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D)  
en Sciences Biomédicales

Août 2003

© Bassam Haidar, 2003



W  
4  
U58  
2004  
v.010



**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal  
Faculté des études supérieures**

Cette thèse intitulée:

**Investigation du rôle des molécules de signalisation  
cellulaire dans la lipidation de l'apolipoprotéine A-I**

présentée par:

**Bassam Haidar**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

|       |                        |                        |
|-------|------------------------|------------------------|
| _____ | Dr Katherine Cianflone | président-rapporteur   |
| _____ | Dr Jacques Genest jr   | directeur de recherche |
| _____ | Dr Michel Bouvier      | membre du jury         |
| _____ | Dr Yves Marcel         | examineur externe      |

Thèse acceptée le: 10 Décembre 2003

## Résumé

La maladie cardiovasculaire attribuable à l'athérosclérose coronarienne est la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Un niveau abaissé de cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (C-HDL) représente un facteur de risque étroitement relié au développement de la maladie coronarienne. Récemment, nous avons démontré que le défaut génétique de la déficience familiale en HDL (FHD) et celui de la maladie de Tangier sont dus à des mutations du gène de *l'ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) situé sur le chromosome 9q31. La protéine ABCA1 a une structure composée de douze domaines transmembranaires et elle joue un rôle clé dans l'efflux de l'excès de cholestérol et des phospholipides cellulaires, ainsi que dans la lipidation des particules HDL naissantes impliquées dans la voie de retour du cholestérol.

Ce projet de thèse vise à examiner, par des études fonctionnelles de l'ABCA1, différents événements chimiques provoquant l'efflux de cholestérol cellulaire. Dans le modèle cellulaire de transport et d'efflux de cholestérol étudié, des particules HDL ou de l'apolipoprotéine (apo) A-I (principale protéine des HDL) se fixent à la membrane plasmique, activent des voies de signalisation provoquant l'hydrolyse de phospholipides menant à l'activation des protéines kinases A et C (PKA et PKC) et stimulent l'efflux de cholestérol cellulaire.

Dans la présente étude, nous démontrons que l'ABCA1 est une phosphoprotéine induite par l'AMPc. Cette phosphorylation, dépendante de la PKA, est en corrélation avec une augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire, laquelle est provoquée par la liaison de l'apoA-I à la protéine ABCA1. Par des études fonctionnelles de l'ABCA1 dans les fibroblastes des sujets de la maladie de Tangier, nous démontrons aussi que l'efflux de cholestérol nécessite à la fois la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1, l'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire ainsi que la phosphorylation de l'ABCA1. Nos données suggèrent que le mécanisme de la phosphorylation de l'ABCA1 par la PKA soit couplé à des protéines-G nécessaires à l'activation de l'adenylate cyclase et à l'augmentation de l'AMPc intracellulaire. Enfin, nous démontrons qu'un efflux déficient de cholestérol retrouvé dans la FHD et la maladie de Tangier pourrait être corrigé par la présence exogène ou endogène des activateurs de la protéine kinase C (PKC) ou de produits d'hydrolyse des phospholipides impliqués dans la voie de signalisation cellulaire.

L'élucidation du rôle des messagers chimiques retrouvés dans la voie d'efflux de cholestérol ouvre ainsi des perspectives d'approches thérapeutiques visant à augmenter les niveaux plasmiqes de C-HDL pour ainsi réduire les risques d'athérosclérose.

**Mots clés :**

ABCA1, Apolipoprotéine AI, cAMP, efflux de cholestérol, HDL, phospholipides, phosphorylation de l'ABCA1, PKA, PKC, protéines-G.

**Abstract**

Atherosclerosis is the major cause of death in industrialized societies. A low level of High Density Lipoprotein-Cholesterol (HDL-C) is an important cardiovascular risk factor. HDL and HDL apolipoproteins protect against the development of atherosclerosis, probably primarily by stimulating the efflux of cholesterol from macrophages foam cells. We have recently shown that familial HDL deficiency (FHD) and Tangier disease are caused by mutations in the ATP binding cassette A1 (ABCA1) on the chromosome 9q31. ABCA1 is a large membrane protein with twelve transmembrane domains, needed to promote the efflux of excess of cholesterol and phospholipid from cells, and also to generate nascent HDL particles in the reverse cholesterol transport pathway.

HDL or apoA-I (major HDL protein)-mediated cholesterol transport appears to involve signal transduction processes such as the degradation of phospholipides, the activation of phospholipases and the activation of protein kinase A (PKA) and C (PKC). The goal of the present study is to investigate the role of a panel of signaling molecules in the modulation of cellular cholesterol efflux in control, FHD and Tangier subjects in relation to ABCA1.

In this research project, we demonstrate that ABCA1 is a phosphoprotein inducible by cAMP and this regulates ABCA1 functional activity. The phosphorylation mechanism is mediated by PKA and correlated to the intracellular cAMP level. By using Tangier fibroblasts (ABCA1 defective), our results indicate that: 1) apoA-I activates ABCA1 phosphorylation via the cAMP/PKA-dependent pathway; 2) apoA-I-mediated cAMP production requires high-level expression of the functional ABCA1 protein; and 3) ABCA1-dependent phospholipid efflux is modulated by phospholipases. These findings suggest that apoA-I activates cAMP signaling through the G-protein-coupled ABCA1 receptor. Furthermore, we demonstrate that defective cellular cholesterol efflux seen in FHD and Tangier cells can be modulated by PKC activation and phospholipid-derived signaling molecules.

Further study of the role of apoA-I in mediating cellular signaling and its interaction with the ABCA1 protein may provide new insights into the mechanism of reverse cholesterol transport, plasma factors affecting HDL metabolism, and the therapeutic potential of ABCA1 in preventing or treating atherosclerotic vascular disease.

**Keywords:** ABCA1, Apolipoprotein AI, cAMP, cholesterol efflux, HDL, phospholipides, ABCA1 phosphorylation, PKA, PKC, G-proteins.



## Table des matières

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| Résumé.....                 | i    |
| Abstract.....               | iii  |
| Liste des tableaux .....    | viii |
| Liste des figures.....      | ix   |
| Liste des abréviations..... | xi   |
| Remerciements .....         | xiii |

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| <b>Introduction .....</b> | <b>1</b> |
|---------------------------|----------|

### Première partie: revue de la littérature

#### **Chapitre 1: Aspects physiologiques, cellulaires et moléculaires des lipides**

|  |    |
|--|----|
| 1.1 Introduction .....   | 6  |
| 1.2 Métabolisme des lipides plasmatiques                               |    |
| 1.2.1 Généralités .....  | 7  |
| 1.2.2 La voie exogène .....  | 8  |
| 1.2.3 La voie endogène .....   | 10 |
| 1.2.4 La voie de retour du cholestérol.....                            | 10 |
| 1.3 Homéostasie du cholestérol plasmatique                             |    |
| 1.3.1 HDL et LDL: deux sources importantes de cholestérol.....         | 11 |
| 1.3.2 Les différentes voies d'efflux de cholestérol.....               | 13 |
| 1.4 Désordre des lipoprotéines des Hautes densités                     |    |
| 1.4.1 Hypoalphalipoprotéïnémie .....                                   | 15 |
| 1.4.2 Maladie de Tangier.....  | 16 |
| 1.4.3 Déficience familiale en HDL.....                                 | 17 |
| 1.4.4 Les variantes de l'apoA-I .....                                  | 17 |
| 1.5 Événements biochimiques de l'homéostasie cellulaire du cholestérol |    |
| 1.5.1 Liaisons des HDL aux récepteurs .....                            | 18 |
| 1.5.2 Transduction de signaux cellulaires .....                        | 19 |
| 1.6 Rôle des transporteurs ABC   |    |
| 1.6.1 Description des transporteurs ABC.....                           | 25 |
| 1.6.2 Rôle de l'ABCA1 dans le transport inverse du cholestérol .....   | 25 |
| 1.6.3 Régulation de l'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol.....         | 29 |
| 1.7 Conclusion .....   | 33 |

## **Deuxième partie: contribution originale**

### **Chapitre 2: Énoncé du projet**

|   |    |
|---|----|
| 2.1 Introduction .....                              | 34 |
| 2.2 Objectifs de l'étude .....                      | 35 |
| 2.3 Sélection du modèle et des sujets étudiés ..... | 36 |

### **Chapitre 3: Article I**

#### **Cellular Cholesterol Efflux is Modulated by Phospholipid-Derived Signaling Molecules in Familial HDL Deficiency / Tangier Disease Fibroblasts**

|                        |    |
|------------------------|----|
| 3.1 Abstract .....     | 40 |
| 3.2 Introduction ..... | 41 |
| 3.3 Methods .....      | 43 |
| 3.4 Results .....      | 47 |
| 3.5 Discussion .....   | 55 |
| 3.6 References .....   | 58 |

### **Chapitre 4: Article II**

#### **Cyclic AMP Induces ABCA1 Phosphorylation Activity and Promotes Cholesterol Efflux from Fibroblasts**

|                        |    |
|------------------------|----|
| 4.1 Abstract .....     | 66 |
| 4.2 Introduction ..... | 68 |
| 4.3 Methods .....      | 70 |
| 4.4 Results .....      | 74 |
| 4.4 Discussion .....   | 83 |
| 4.5 References .....   | 87 |

### **Chapitre 5: Article III**

#### **Apolipoprotein A-I Activates Cellular cAMP Signaling through the ABCA1 Receptor EVIDENCE FOR INTERACTIONS BETWEEN ABCA1 RECEPTOR AND G-PROTEIN\***

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| 5.1 Abstract .....                | 92  |
| 5.2 Introduction .....            | 94  |
| 5.3 Experimental Procedures ..... | 96  |
| 5.4 Results .....                 | 99  |
| 5.5 Discussion .....              | 108 |
| 5.6 References .....              | 115 |

**Chapitre 6: Discussion générale**

|  |            |
|--|------------|
| 6.1 Altération de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire.....                | 118        |
| 6.2 Modulation de l'efflux de cholestérol par les voies de transduction de signaux |            |
| 6.2.1 Voie de la phosphatidylcholine, de la sphingomyéline et de la céramide ....  | 120        |
| 6.2.2 Voie des phospholipases C et D, et de la PKC .....                           | 121        |
| 6.2.3 Rôle de l'AMPc cellulaire dans la phosphorylation de l'ABCA .....            | 123        |
| 6.3 Mécanismes de régulation de l'efflux de cholestérol par l'apoA-I.....          | 126        |
| <br>   |            |
| <b>Conclusion.....</b>   | <b>131</b> |
| <br>   |            |
| <b>Bibliographie .....</b>   | <b>xiv</b> |

**Liste des tableaux**

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 1.I   | Signalisation intracellulaire par les HDL ou l'apoA-I.....   | 20  |
| 1.II  | Principales maladie et phénotypes causés par les gènes ABC.....  | 26  |
| 1.III | Régulation de l'expression de l'ABCA1.....   | 31  |
| 2.IV  | Caractérisation moléculaire du gène de l'ABCA1 chez les sujets étudiés .....   | 38  |
| 3.I   | Lipid values of Control, FHD and Tangier Subjects.....   | 47  |
| 4.I   | Molecular characterization of ABCA1 gene in study subjects.....  | 80  |
| 5.I   | Levels of intracellular cAMP, ABCA1 phosphorylation, specific ApoA-I binding and lipid efflux in normal and ABCA1 deficient stimulated cell lines..... | 113 |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| 1.1 Métabolisme des lipoprotéines .....   | 9  |
| 1.2 Représentation schématique du contrôle du transport sanguin du cholestérol ..   | 12 |
| 1.3 ABCA1, efflux de phospholipides et maturation des HDL .....   | 15 |
| 1.4 Modèle de l'effet de l'apoA-I ou des HDL sur la signalisation cellulaire.....   | 24 |
| 1.5 Modèle de transport inverse du cholestérol contrôlé par le transporteur<br>ABCA1 .....  | 27 |
| 1.6 Représentation schématique du transporteur ABCA1.....   | 32 |
| 3.1 Phospholipid pathways.....  | 45 |
| 3.2 Effect of equimolar amounts (100 $\mu$ M) of sphingomyelin (SM),<br>phosphatidylcholine (PC), sphingosine (Sph), and $\beta$ -cyclodextrin (Cdx, 1mM)<br>on cellular cholesterol efflux .....           | 48 |
| 3.3 ApoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in the presence of equimolar<br>amounts (100 $\mu$ M) of sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC).....  | 49 |
| 3.4 Effect of DOG (0-200 $\mu$ M) on cellular cholesterol efflux .....  | 50 |
| 3.5 Effect of PMA (160 nmol/L) on apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux.....  | 50 |
| 3.6 Phosphatidic acid increased cholesterol efflux in control, FHD and Tangier<br>cells in a dose-dependent fashion (0-150 $\mu$ mol/L) .....   | 52 |
| 3.7 12 hours cholesterol efflux in control cells in the presence of apoA-I<br>(black bars) and apoA-I with DOG (gray bars) with addition of propranolol<br>(150 $\mu$ M), calphostin C (50nM) or both ..... | 53 |
| 3.8 Lysophosphatidic acid (LPA) decreased apoA-I-mediated cellular cholesterol<br>efflux significantly in control and FHD cells but increased efflux in cells from<br>TD patients.....                      | 54 |
| 4.1 Effect 8-Br-cAMP or cAMP regulator on apoA-I and cyclodextrin-mediated<br>cellular cholesterol efflux .....   | 75 |
| 4.2 Effect of 8-Br-cAMP on ABCA1 mRNA expression in normal control fibroblasts<br>and J774 cells .....  | 76 |
| 4.3 Effect of 8-Br-cAMP on cholesteryl ester (CE) hydrolysis .....  | 77 |
| 4.4 Time-dependent phosphorylation of ABCA1 in presence or absence of<br>8-Br-cAMP .....  | 78 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.5 Effect of H-89 PKA-inhibitor on apoA-I-mediated cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation .....  | 81  |
| 4.6 Specific naturally occurring mutations of ABCA1 affect its cellular cholesterol efflux and phosphorylation activities .....               | 82  |
| 5.1 Detection of ABCA1 receptor phosphorylation using a more sensitive method ..  | 99  |
| 5.2 Concentration-dependence of apoA-I-mediated phosphorylation of ABCA1 and the effect of cell stimulation on ABCA1 phosphorylation .....    | 101 |
| 5.3 Time-dependence of apoA-I-mediated cAMP production in stimulated normal cells .....   | 102 |
| 5.4 Concentration and time-dependence of apoA-I-mediated cAMP production in stimulated and unstimulated normal cells .....                    | 103 |
| 5.5 Effect of H89 protein kinase A (PKA) inhibitor on apoA-I-mediated ABCA1 Phosphorylation.....  | 104 |
| 5.6 ABCA1 receptor from normal and TD cell lines is phosphorylated by PKA catalytic subunit <i>in vitro</i> .....                             | 106 |
| 5.7 Effect of pertussis toxin (PTx) on apoA-I-mediated phospholipid efflux in stimulated normal fibroblasts .....                             | 107 |
| 5.8 A proposed model of ABCA1 receptor coupling to G $\alpha_s$ -mediated-activation of adenylyl cyclase (AC) in stimulated fibroblasts ..... | 112 |

## Liste des abréviations

|                   |   |
|-------------------|---|
| ABC               | ATP binding cassette                                |
| ABCA1             | ATP binding cassette transporter A1                 |
| ACAT              | acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase       |
| ADN               | acide désoxyribonucléique                           |
| AMPc              | adénosine monophosphate cyclique                    |
| apoA-I            | apolipoprotéine A-I                                 |
| apoA-II           | apolipoprotéine A-II                                |
| ARF               | facteur de ribosylation d'ADP                       |
| Arg               | arginine  |
| ARN               | acide ribonucléique                                 |
| ARNt              | acide ribonucléique de transfert                    |
| Asp               | acide aspartique                                    |
| ATP               | adénosine triphosphate                              |
| BSA               | albumine sérique de bovin                           |
| CL                | cholestérol libre                                   |
| CAD               | maladie coronarienne athéroscléreuse                |
| CE                | cholestérol estérifié                               |
| CETP              | protéine de transfert du cholestérol estérifié      |
| CFTR              | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| CoA               | coenzyme A  |
| 9-CRA             | 9-cis-acide rétinoïque                              |
| Cys               | cystéine  |
| Da                | daltons   |
| DMEM              | Dulbecco's modified Eagle's medium                  |
| DNA               | acide désoxyribonucléique                           |
| DAG               | diacylglycérol                                      |
| DOG               | dioctanoylglycérol                                  |
| ERK               | extracellular signal-regulated kinase               |
| FH                | hypercholestérolémie familiale                      |
| FHD               | déficience familiale en HDL                         |
| g                 | gramme  |
| Gln               | glutamine   |
| Glu               | acide glutamique                                    |
| Gly               | glycine   |
| GPCR              | protéine-G couplées à des récepteurs                |
| HBP               | protéine qui lie les HDL                            |
| HDL               | lipoprotéine de haute densité                       |
| HDL-C             | cholestérol lié à la HDL                            |
| HDL-R             | récepteur HDL                                       |
| His               | histidine   |
| HMG-CoA réductase | 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase     |
| NCEH              | hydrolase neutre d'esters de cholestérol            |
| IBMX              | 3-isobutyl-1-méthylxanthine                         |
| IDL               | lipoprotéine de densité intermédiaire               |
| INHB              | inhibiteur  |
| LCAT              | lécithine : cholestérol-acyl-transférase            |
| LDL               | lipoprotéine de faible densité                      |
| LDL-C             | cholestérol lié à la LDL                            |

|        |   |
|--------|---|
| LDL-R  | récepteur aux particules LDL                        |
| Leu    | leucine   |
| LH     | lipase hépatique                                    |
| Lp(a)  | lipoprotéine petit "a"                              |
| LpE    | lipoprotéine contenant l'apolipoprotéine E          |
| LRP    | LDL-receptor-related protein                        |
| LPL    | lipoprotéine lipase                                 |
| LYS    | lysosome  |
| LXR    | nuclear hormone receptor liver X receptor           |
| MAP    | protéine à activité mitogène                        |
| mg     | milligramme   |
| mmol   | millimole   |
| mRNA   | acide ribonucléique messenger                       |
| NBF    | nucleotide binding fold                             |
| NCEH   | hydrolase neutre du cholestérol estérifié           |
| NO     | oxyde nitrique                                      |
| NPC    | Niemann-Pick type C                                 |
| OA     | acide okadaïque                                     |
| 22-OH  | 22, R-hydroxycholestérol                            |
| PA     | acide phosphatidique                                |
| PAGE   | électrophorèse sur gel de polyacrylamide            |
| PAGGE  | électrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide   |
| PBS    | tampon phosphate salin                              |
| PC     | phosphatidylcholine                                 |
| PCR    | réaction en chaîne à la polymérase                  |
| PC-PLC | phospholipase C spécifique aux phosphatidylcholines |
| PC-PLD | phospholipase D spécifique aux phosphatidylcholines |
| PI-PLC | phospholipase C spécifique aux phosphoinositols     |
| PKA    | protéine kinase A                                   |
| PKC    | protéine kinase C                                   |
| PL     | phospholipides                                      |
| PMA    | phorbol myristate acétate                           |
| Pro    | proline   |
| PTx    | toxine de pertussis                                 |
| REL    | réticulum endoplasmique lisse                       |
| RER    | réticulum endoplasmique rugueux                     |
| RNA    | acide ribonucléique                                 |
| RXR    | nuclear hormone receptor retinoid X receptor        |
| Ser    | sérine  |
| SR-BI  | récepteur <i>scavenger</i> de classe B, type I      |
| SREBP  | sterol regulatory element binding protein           |
| TG     | triglycérides                                       |
| Thr    | thréonine   |
| TLC    | chromatographie sur couche mince                    |
| Tyr    | tyrosine  |
| Val    | valine  |
| VLDL   | lipoprotéine de très faible densité                 |
| VLDL-C | cholestérol lié à la VLDL                           |
| μCi    | microcurie  |
| μg     | microgramme   |
| μM     | micromolaire  |



## Remerciements

Ce fut un grand plaisir de réaliser ce projet de doctorat au laboratoire de génétique cardiovasculaire du Dr Jacques Genest. Au cours de ces années de recherches, j'ai pu acquérir une multitude de connaissances dans le domaine des lipides et des maladies cardiovasculaires grâce à l'enseignement fructueux et à l'enthousiasme de mon directeur de recherche. Je tiens à remercier sincèrement Dr Genest pour m'avoir accueilli si chaleureusement dans son laboratoire et avoir fait en sorte que son cher pays, le Canada, devienne mon pays d'adoption.

Mon projet de recherches ne serait pas ce qu'il est sans la supervision du Dr Michel Marcil et de M. Larbi kimbou qui, tout au long de ces années, m'ont appris la rigueur dans la recherche. Je les remercie aussi d'avoir pris le temps de lire cette thèse et d'y avoir apporté des informations scientifiques considérables.

Je tiens également à remercier mon collègue Maxime Denis pour sa contribution technique et intellectuelle. Je remercie aussi nos techniciennes de laboratoire Betsie Boucher et Shiona Dempster pour leur support technique dans le laboratoire tout le long de ces travaux. Je voudrais aussi souligner l'effort de Colette Rondeau, infirmière de recherche, dans l'aspect clinique de ces travaux.

J'aimerais finalement remercier tout particulièrement l'aimable Émilie Thivierge pour son support moral et pour sa contribution dans la correction de cette thèse.

L'ensemble de mes travaux de doctorat ont été réalisés à l'institut de recherches cliniques de Montréal et au centre hospitalier de l'Université de McGill.

## Introduction

Les dyslipidémies athérogènes sont responsables de la plupart des accidents cardiovasculaires, lesquels demeurent une des causes principales de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. L'anomalie lipidique la plus fréquemment associée à l'augmentation du risque de la maladie coronarienne est l'augmentation du taux de cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (C-LDL) ainsi que la diminution du taux de cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (C-HDL).

Le cholestérol est un élément nutritif et essentiel à de nombreux processus impliquant la membrane plasmique. En effet, la concentration en cholestérol circulant résulte de plusieurs paramètres : des apports exogènes via l'alimentation, de la capacité des cellules périphériques à utiliser le cholestérol circulant ainsi que de l'élimination du cholestérol circulant par la voie biliaire.

Le cholestérol est véhiculé dans la circulation sanguine par deux lipoprotéines majeures: les lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoprotein, LDL) et les lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoprotein, HDL). Ces lipoprotéines ont deux rôles métaboliques opposés. Ainsi, les LDL apportent le cholestérol aux différentes cellules de l'organisme, alors que les HDL y prélèvent le cholestérol en excès et le ramène au foie, seul organe capable de le dégrader. L'élévation des LDL favorise donc le développement de l'athérosclérose, alors que les HDL empêchent l'accumulation de cholestérol cellulaire dans la paroi des artères.

Par définition, il ne saurait y avoir d'athérosclérose sans cholestérol. L'athérosclérose est une maladie chronique, lentement évolutive, qui affecte la morphologie et la fonction des artères au niveau de zones bien précises, en particulier les bifurcations où l'écoulement sanguin est irrégulier. C'est une pathologie résultant d'étiologies multiples où interviennent des facteurs environnementaux, des anomalies plasmatiques et génétiques, ainsi que des dysfonctionnements cellulaires. Aussi, une succession d'événements (infiltrations, puis oxydations des LDL, pénétration par des cellules immunitaires, formation des macrophages spumeux suivie d'une apoptose, augmentation du volume du cœur lipidique, etc.) conduisent à la formation du thrombus au niveau de la paroi, laquelle mène à l'obstruction du vaisseau (1).

L'athérosclérose dépend de plusieurs facteurs de risque, dont l'hypoalphalipoprotéïnémie, l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'hypertriglycéridémie,

l'hypertension artérielle, le diabète, l'hyperinsulinémie, l'obésité abdominale, la lipoprotéine (a) et les facteurs thrombogéniques et fibrinolytiques.

Des niveaux plasmatiques de cholestérol-LDL anormalement élevés (2-4) et de cholestérol-HDL anormalement bas (5,6) ont depuis longtemps été associés à une augmentation du risque de développement de la maladie coronarienne. L'hypoalphalipoprotéïnémie ou un taux bas de cholestérol-HDL, est habituellement accompagnée d'une augmentation des triglycérides et constitue l'anomalie la plus fréquemment rencontrée chez les patients atteints d'une maladie coronarienne précoce (7).

Sur le plan épidémiologique, un taux élevé de cholestérol-HDL a un effet protecteur contre la maladie coronarienne (8). En effet, une augmentation de 1% du cholestérol-HDL diminue d'environ 2% à 3% le risque de développer une maladie coronarienne (9). Les taux de cholestérol-HDL sont influencés par des facteurs génétiques, tel que l'activité de la lipase hépatique (LH) (10) ou celle de la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) (11), ainsi que par des facteurs liés à l'environnement. Le métabolisme des HDL est toutefois complexe et les mécanismes par lesquels ces lipoprotéines protègent contre l'athérosclérose demeurent, en grande partie, toujours inconnus. Cependant, nous savons déjà que les HDL participent au transport inverse du cholestérol (des tissus périphériques vers le foie), et qu'elles possèdent des propriétés antioxydantes et antiathérogéniques.

La partie protéique des lipoprotéines a largement été étudiée, et de nombreux travaux ont déjà fait valoir la meilleure signification clinique des apolipoprotéines (apo) par rapport aux lipides. C'est ainsi que les chercheurs ont pu montrer que l'apoA-I, l'apolipoprotéine majeure des HDL, est un meilleur marqueur de protection cardiovasculaire que les lipides, notamment chez les patients normolipidémiques (12). L'effet protecteur de l'apoA-I est lié à l'augmentation de l'efflux de cholestérol cellulaire (transport inverse du cholestérol) et, par conséquent, à la protection contre l'athérosclérose (13). Une altération de l'efflux de cholestérol cellulaire et du niveau d'HDL plasmatique a été observée chez plusieurs sujets atteints d'une déficience familiale en HDL (FHD) ou de la maladie de Tangier (14-17). Chez ces sujets affectés, l'apoA-I et les HDL subissent un hypercatabolisme dû au défaut d'efflux de cholestérol cellulaire (18). Les récentes avancées dans la physiopathologie de la maladie de Tangier ont aussi permis la découverte de l'*ATP binding cassette transporter A1* (ABCA1) (17,19,20), responsable du transport du cholestérol du milieu intracellulaire vers le milieu

extracellulaire. En ce sens, la forme homozygote de la mutation de l'ABCA1 est associée à la maladie de Tangier, tandis que l'hétérozygote est représentée dans les FHD.

La protéine ABCA1 a une structure composée de douze domaines transmembranaires contenant des motifs de fixation de l'ATP (21) pour la production d'énergie nécessaire à sa fonction de transporteur actif du cholestérol cellulaire en excès. L'ABCA1 joue ainsi un rôle dans la lipidation des particules naissantes impliquées dans la voie de retour du cholestérol (22).

La concentration intracellulaire du cholestérol est strictement régulée par 4 voies principales : 1) l'apport du cholestérol exogène par l'endocytose des particules LDL via la voie du récepteur LDL; 2) la synthèse endogène du cholestérol dans le réticulum endoplasmique lisse (REL) impliquant l'enzyme HMG-CoA réductase; 3) l'estérification intracellulaire du cholestérol par l'enzyme acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase (ACAT); 4) l'efflux du cholestérol intracellulaire vers la membrane plasmique, puis vers des molécules acceptrices de cholestérol (apoA-I ou HDL) (23).

Il a été rapporté que les HDL ou l'apoA-I contrôlent la modulation des voies de transductions des signaux cellulaires. Ceux-ci peuvent inclure l'activation des phospholipases C et D spécifiques aux phosphatidylcholines (PC-PLC, PC-PLD) (24,25), de la phospholipase C spécifique aux phosphoinositol (PI-PLC) (24,26) et de la protéine kinase C (PKC) (27). L'équipe de Walter et ses collaborateurs ont observé, dans les fibroblastes des sujets de la maladie de Tangier, un défaut d'activation de la PC-PLC et de la PC-PLD associé à une déficience de l'efflux de cholestérol cellulaire (25). À la lumière de ces connaissances, nous proposons un modèle cellulaire de transport et d'efflux de cholestérol cellulaire. Dans ce dernier, des particules HDL ou apoA-I se fixent à la membrane plasmique, activent des voies de signalisation cellulaires provoquant l'hydrolyse des phospholipides menant à l'activation des protéines kinases A et C, et stimulent l'efflux de cholestérol cellulaire.

Afin d'apporter de nouvelles connaissances au transport intracellulaire du cholestérol et au métabolisme des HDL, ce projet de thèse abordera spécifiquement le sujet des voies de transduction de signaux en relation avec la protéine ABCA1 ainsi qu'avec la translocation et l'efflux de cholestérol cellulaire dans les cellules périphériques. Par des études de biochimie et de biologie cellulaire, nous tenterons aussi de préciser les anomalies moléculaires retrouvées dans les cellules FHD et celles de la maladie de

Tangier, afin de mieux comprendre certains mécanismes impliquant l'homéostasie du cholestérol intracellulaire et la maturation des particules HDL.

Le premier volet de cette thèse portera sur une étude de la modulation de l'efflux de cholestérol par des molécules de signalisation cellulaire dans le but de corriger le défaut de l'efflux de cholestérol cellulaire rencontré chez les sujets FHD et chez ceux atteints de la maladie de Tangier. Nous examinerons alors le rôle des molécules dérivées de l'hydrolyse des PC-PLC et des PC-PLD, soit le diacylglycérol (DAG) et l'acide phosphatidique (PA). De plus, nous étudierons la modulation de l'activité de la PKC dans l'efflux de cholestérol cellulaire contrôlé par l'apoA-I. Enfin, nous examinerons le rôle des molécules ayant une grande affinité pour le cholestérol et plus particulièrement leur rôle dans la désorption du cholestérol membranaire (efflux passif) et dans l'efflux de cholestérol cellulaire vers l'accepteur apoA-I (efflux actif).

Nous verrons alors comment les données de cette étude ont démontré que l'altération de l'efflux de cholestérol rencontrée dans les fibroblastes de FHD et de la maladie de Tangier peut être corrigée par des messagers chimiques associés aux voies de la PC-PLC, de la PC-PLD et de la PKC. Ces résultats portent donc à croire que l'altération des voies de transduction de signaux dans la maladie de Tangier réside au niveau d'un effecteur, probablement lié à des protéines-G, en amont des voies de la PLC et de la PLD.

Il a été rapporté que le traitement des macrophages avec l'AMPc augmente à la fois la transcription de l'ABCA1, la liaison de l'ApoA-I à l'ABCA1 et l'efflux de cholestérol (28,29). Cependant, cet effet transcriptionnel de l'AMPc est apparemment spécifique aux macrophages, et il n'a pas été vu dans d'autres types cellulaires (30). Ainsi, le deuxième volet de cette thèse portera sur une étude de l'AMPc intracellulaire dans l'expression de l'ABCA1 et de la modulation de l'efflux de cholestérol dans les fibroblastes humains. Nous avons trouvé, dans cette étude, que l'ABCA1 est une phosphoprotéine induite par l'AMPc cellulaire. La protéine kinase A (PKA) est capable de phosphoryler l'ABCA1 et d'augmenter sa fonction (efflux de cholestérol) en présence de l'AMPc. De plus, nous avons corrélé le défaut de stimulation de l'efflux de cholestérol au défaut de phosphorylation de l'ABCA1 chez les sujets atteints de la maladie de Tangier. Les données de cette étude permettront de dégager un nouveau mécanisme post-transcriptionnel régulant l'activité de l'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol cellulaire.

Le troisième volet de cette thèse portera sur une étude des mécanismes de phosphorylation de l'ABCA1 par l'apoA-I. L'expression de l'ABCA1 cellulaire est contrôlée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (31). Dans ce modèle de régulation, des équipes démontrent que l'apoA-I augmente l'ABCA1 à la surface de la cellule ainsi que stabilise la protéine ABCA1 en empêchant sa dégradation (32,33). De notre côté, nous proposerons un mécanisme de régulation post-transcriptionnel de l'ABCA1 par phosphorylation. Pour se faire, nous examinerons, dans les cellules des sujets contrôles de FHD et dans les cellules de la maladie de Tangier, l'effet de la liaison de l'apoA-I sur l'ABCA1, la génération de l'AMPc, la phosphorylation de l'ABCA1 et l'efflux de lipides cellulaires induits par la stimulation de l'apoA-I. Les données de cette étude nous ont démontré que l'apoA-I, en se liant à l'ABCA1, provoque la phosphorylation du transporteur ABCA1. Ce mécanisme est régi par les niveaux d'AMPc cellulaire et par l'activation de la PKA. Un niveau seuil de la protéine ABCA1 est nécessaire à la génération de l'AMPc stimulée par l'apoA-I dans les fibroblastes des sujets contrôles. Par ailleurs, un ABCA1 non fonctionnel (cellules de Tangier), ne permet pas la liaison à l'apoA-I, la phosphorylation de l'ABCA1, la génération de l'AMPc et la stimulation de l'efflux de lipides. Enfin, nous avons pu mettre en évidence la séquence des trois événements biochimiques de la liaison de l'apoA-I sur des fibroblastes humains en culture; 1) la génération de l'AMPc cellulaire qui reflète l'activation de l'adénylate cyclase et l'implication des protéines  $G_{\alpha s}$ ; 2) la phosphorylation de l'ABCA1 par la PKA dépendante de l'AMPc; 3) la stimulation de l'efflux de cholestérol et des phospholipides vers l'accepteur final, l'apoA-I.

## **Chapitre 1: Aspects physiologiques, cellulaires et moléculaires des lipides**

### **1.1 Introduction**

La coronaropathie athéromateuse est la cause principale de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. Le coût économique de cette pathologie est extrêmement élevé si l'on tient compte du nombre de patients, de leur âge et de la sévérité de la maladie.

Les facteurs de risques les plus importants associés à l'athérosclérose coronarienne sont l'hypercholestérolémie et les diverses dyslipoprotéïnémies. Aussi, les résultats de l'étude Framingham (34) ont montré que l'augmentation de la cholestérolémie accroît le risque de développer une pathologie cardiovasculaire.

Le cholestérol est véhiculé dans la circulation par deux lipoprotéines majeures: les LDL et les HDL. Ces lipoprotéines ont deux rôles métaboliques opposés. En effet, les LDL apportent le cholestérol aux différentes cellules de l'organisme, alors que les HDL y prélèvent le cholestérol en excès et le ramène au foie, le seul organe capable de le dégrader (transport inverse du cholestérol). Les LDL favorisent donc le développement de l'athérosclérose, alors que les HDL empêchent l'accumulation de cholestérol cellulaire dans la paroi des artères.

La diminution de la concentration plasmatique du cholestérol-HDL constitue l'anomalie la plus fréquente du bilan lipidique du coronarien (39 % des cas) (35). Ces dernières années, un nombre considérable de données cliniques et épidémiologiques (8,36,37) se sont accumulées et suggèrent que les HDL et leur constituant protéique majeur (l'apoA-I) jouent un rôle directement protecteur contre le développement de l'athérosclérose. Cet effet protecteur serait dû au mécanisme du "transport inverse du cholestérol". En ce sens, une stratégie thérapeutique consisterait donc à essayer d'accroître l'efficacité de cette voie métabolique en augmentant les concentrations circulantes de cholestérol-HDL.

La prévalence d'un taux plasmatique de cholestérol-HDL bas isolé (sans autre anomalie des lipoprotéines) au sein de différentes populations exemptes de pathologie cardiovasculaire est d'environ 4%. En revanche, chez les patients coronariens, la prévalence de ce taux est plus élevée, étant comprise entre 15% et 40% (38,39). De plus, des études transversales (Framingham, Multiple Risk Factor Intervention Trial) (8,40) ont clairement montré une relation proportionnelle entre l'augmentation du cholestérol-HDL et la diminution du risque coronarien. Cependant, un taux abaissé de

cholestérol-HDL (inférieur à 0.9 mmol/L) est souvent associé à un taux élevé de cholestérol total et de triglycérides, et constitue une triade lipidique athérogène fréquente, notamment chez le patient diabétique (41). Cette association est caractéristique d'une hyperlipidémie mixte, dont la prévalence parmi les patients coronariens est particulièrement importante (41).

Sur le plan du choix thérapeutique, il faut noter que la plupart des consensus actuels de traitement des dyslipidémies ont comme cible le taux plasmatique de cholestérol-LDL. Dans ce cas, la thérapie prescrite ainsi que l'objectif à atteindre sous traitement sont modulés par le nombre de facteurs de risques individuels à chaque patient. Par ailleurs, un taux abaissé de cholestérol-HDL (inférieur à 0.9 mmol/L chez l'homme et à 1.16 mmol/L chez la femme avant la ménopause) est actuellement considéré comme un facteur de risque additionnel, incitant à être plus vigilant quant au traitement de la dyslipidémie. En ce sens, avant de déterminer le traitement médical d'un taux abaissé de cholestérol-HDL, il est nécessaire de chercher une cause secondaire à ce facteur de risque (tabagisme, désordre aigu à l'origine d'une hypolipidémie, maladie ou médicaments entraînant une hypertriglycéridémie), d'évaluer la pratique d'exercice physique (favorable à l'élévation du taux de cholestérol-HDL) et enfin d'estimer l'apport quotidien en graisses alimentaires saturées et insaturées, ainsi qu'en alcool (42).

## **1.2 Métabolisme des lipides plasmatiques**

### **1.2.1 Généralités**

Le problème de la diminution de la concentration de cholestérol sanguin est de plus en plus fréquent dans nos sociétés, où l'hypercholestérolémie touche plus d'un individu sur vingt. Aussi, l'amélioration de ce problème de santé publique augure assez mal, vu l'augmentation continue, au cours des dernières années, de la prévalence de l'obésité à laquelle l'hypercholestérolémie est souvent associée. Compte tenu de cette situation, des recherches actives sont en cours afin de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent l'homéostasie du cholestérol cellulaire, élément vital pour le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et de ses capacités de signalisation.

Le cholestérol est utilisé par l'organisme pour synthétiser les acides biliaires, les stéroïdes et pour fabriquer les membranes cellulaires. Il provient des apports exogènes via l'alimentation, de la synthèse endogène par le foie et de la réabsorption du cholestérol biliaire. Qu'ils soient d'origines alimentaire ou endogène, les triglycérides servent de source d'énergie aux tissus adipeux et aux muscles. Les lipides n'étant pas



solubles dans l'eau, leur transport est assuré par des structures protéiques, et le complexe qui en résulte est une lipoprotéine.

Toutes les particules des lipoprotéines sont formées de lipides et de protéines, et possèdent la même structure de base. Elles sont sphériques et constituées de deux parties: la surface et le noyau. Les lipides polaires hydrophiles (les phospholipides et le cholestérol libre) de même que la fraction protéique, c'est-à-dire les apolipoprotéines, se trouvent à la surface. Quant au noyau, il contient les lipides apolaires ou hydrophobes, c'est-à-dire les triglycérides et le cholestérol estérifié. Cette structure rend possible le transport de substances insolubles, soient les lipides dans le sang.

Les lipoprotéines se distinguent les unes des autres par leur teneur et leur composition en apolipoprotéines et en lipides; elles peuvent être séparées selon leurs propriétés physiques et chimiques : taux de flottaison, taille, migration électrophorétique et composition. On parvient ainsi à distinguer six classes de lipoprotéines: les chylomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL, les HDL et la lipoprotéine (a) [Lp(a)].

Les lipoprotéines circulant dans le sang empruntent deux voies métaboliques : la voie endogène et la voie exogène. Le métabolisme des lipoprotéines dépend de l'interaction entre les apolipoprotéines, les enzymes et les récepteurs (figure 1).

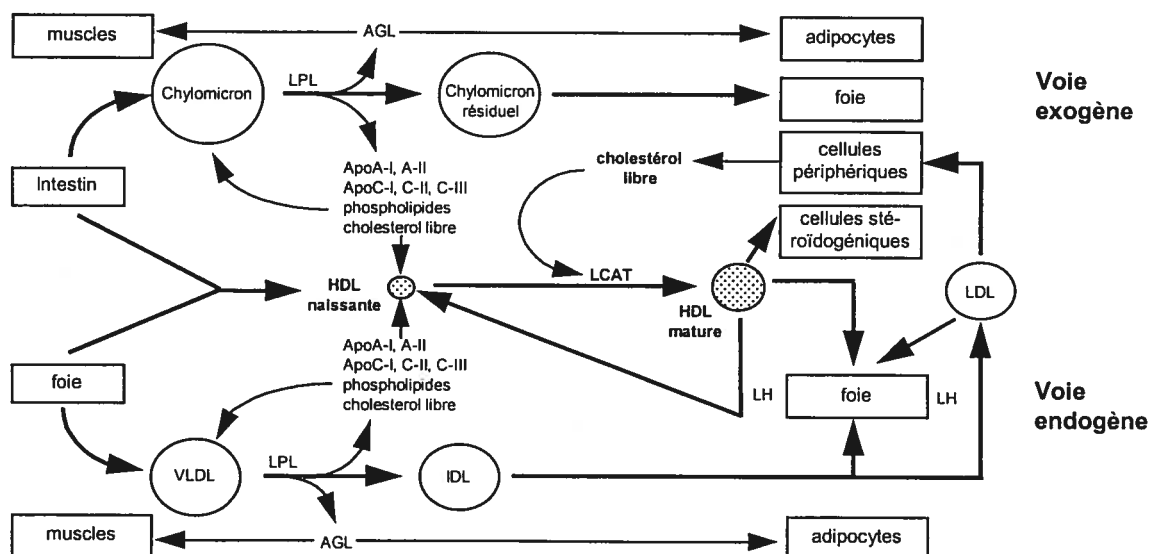
### 1.2.2 La voie exogène

L'organisme absorbe quotidiennement environ 100 g de triglycérides et de 0.2g à 0.5g de cholestérol. Ces lipides alimentaires sont d'abord hydrolysés et absorbés par la muqueuse intestinale, puis réestérifiés et mis en circulation sous forme de chylomicrons. Les chylomicrons transportent donc surtout des triglycérides, et leurs apolipoprotéines sont l'apoB-48 ainsi que les apolipoprotéines A-I et A-II. En circulant, les apolipoprotéines C-II, C-III et E sont transférées aux chylomicrons à partir des HDL (revue détaillée dans (43)).

Les triglycérides des chylomicrons sont hydrolysés par une enzyme située sur l'endothélium capillaire, la lipase lipoprotéique (LPL), dont le cofacteur est l'apoC-II. Plusieurs variables (alimentation, hormones, médicaments, facteurs génétiques) modulent l'activité de la LPL. Les acides gras libérés par l'hydrolyse des chylomicrons sont captés par les cellules adipeuses où ils sont ensuite reconstitués en triglycérides (graisse de réserve); les muscles peuvent ainsi les utiliser comme source d'énergie [revue détaillée dans (44)].

Après cette lipolyse, les constituants en surplus à la surface des chylomicrons (phospholipides, cholestérol libre, apoA-I, apoC) sont transférés aux HDL. La lipoprotéine résiduelle contient alors moins de triglycérides et proportionnellement moins de cholestérol estérifié. Ces résidus de chylomicrons sont captés par un récepteur spécifique de la cellule hépatique apparenté à celui des LDL, nommé LRP (*LDL-receptor-related protein*) (45,46). Ils sont ensuite dégradés par des enzymes lysosomiales. Les chylomicrons n'ont pas de potentiel athérogénique reconnu, alors que les résidus de chylomicrons, eux, sont considérés comme athérogéniques (47). On constate que les individus qui bénéficient d'un catabolisme efficace des lipoprotéines riches en triglycérides présentent généralement des taux de HDL élevés. Une alimentation riche en cholestérol a pour effet de réduire la synthèse des récepteurs LDL, ce qui peut contribuer à augmenter la cholestérolémie.

La LPL favorise la formation des réserves de graisse ainsi que la distribution d'énergie et de cholestérol à divers tissus; elle contribue au transfert des lipides et des apolipoprotéines entre les fractions lipoprotéiques (44).



**Figure 1. Métabolisme des lipoprotéines.** Vue générale du métabolisme des lipoprotéines. La voie exogène (lipides d'origine diététique) est démontrée dans la partie supérieure du diagramme et la voie endogène (lipides d'origine hépatique), dans la partie inférieure. AGL, acides gras libres; LPL, lipoprotéine lipase; LCAT, lécithine-cholestérol-acyl transférase; LH, lipase hépatique.

### 1.2.3 La voie endogène.

À partir du glycérol et des acides gras libérés par le tissu adipeux, le foie fabrique des triglycérides mis en circulation sous forme de VLDL qui contiennent aussi du cholestérol. Le rapport triglycérides/cholestérol (poids/poids) des VLDL est d'environ 4 et chacune des particules est dotée d'une molécule d'apolipoprotéine B-100. D'autres apolipoprotéines, les apolipoprotéines C et E, s'ajoutent en circulation.

Comme les triglycérides des chylomicrons, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés par la *LPL*. Les acides gras ainsi libérés sont distribués aux tissus. Le résidu de VLDL, une lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL), se retrouve relativement enrichi en cholestérol estérifié. Les VLDL, dans certaines conditions, peuvent être athérogéniques. Quant au potentiel athérogénique des IDL, il paraît indiscutable (48).

Une partie des VLDL et des IDL est catabolisée par le récepteur des VLDL, surtout présent dans les muscles et le tissu adipeux. Le rôle de ce récepteur serait de livrer les triglycérides endogènes aux sites du métabolisme des acides gras (49).

Une certaine proportion des IDL est éliminée de la circulation et métabolisée dans le foie par le biais d'un récepteur spécifique (50,51). Une enzyme, la lipase hépatique (LH), hydrolyse alors les triglycérides des IDL qui restent en circulation. La diminution du contenu en triglycérides conduit à la formation des lipoprotéines de densité faible ou LDL. Celles-ci, dont le cholestérol constitue environ 70% de la cholestérolémie totale, sont spécifiquement reconnues par les récepteurs cellulaires aux apolipoprotéines B ou E (52).

### 1.2.4 La voie de retour du cholestérol

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) constituent l'une des quatre classes lipoprotéiques majeures du plasma humain où leur concentration est d'environ 3 g/L. Les HDL comprennent 50% de protéines, 25% de phospholipides, 20% de cholestérol (essentiellement estérifié) et 5% de triglycérides. Leur diamètre varie entre 5 et 17 nm et leur migration électrophorétique est de type  $\alpha$  (53). La partie protéique des HDL est essentiellement représentée quantitativement par l'apoA-I et l'apoA-II. D'autres protéines dont le rôle peut être important, comme les apolipoprotéines A-IV, C, E, D, la lécithine-cholestérol-acyl-transférase (LCAT) et les protéines de transfert des lipides, sont également présentes dans les HDL. Celles-ci sont directement produites par le foie et l'intestin sous forme naissante, elles captent ensuite l'excès du cholestérol libre et des phospholipides des tissus périphériques et mûrent en HDL sphériques nommées HDL<sub>3</sub>.

(54). De plus, les HDL naissantes contribuent indirectement à leur propre formation en redistribuant les éléments de surface des lipoprotéines riches en triglycérides après action de la LPL. Les HDL<sub>3</sub> deviennent des HDL<sub>2</sub> plus denses et enrichies des esters de cholestérol grâce à l'action de la LCAT. Ces HDL<sub>2</sub> vont subir une hydrolyse des fractions lipidiques, principalement dans le foie et dans les glandes surrénales (site de synthèse des hormones stéroïdiennes).

### 1.3 Homéostasie du cholestérol plasmatique

#### 1.3.1 HDL et LDL: deux sources importantes du cholestérol

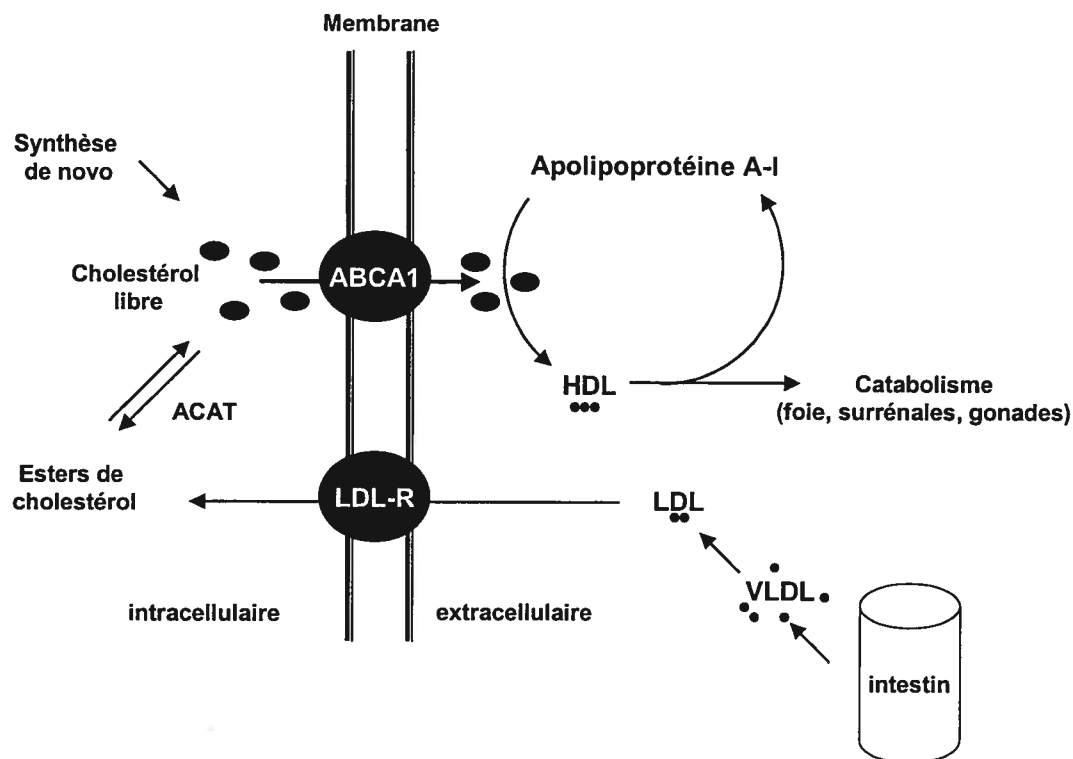
La régulation du cholestérol circulant résulte d'un équilibre entre l'absorption du cholestérol intestinal et son transport par les lipoprotéines plasmatiques, soient les LDL, les HDL et les efflux cellulaires (figure 2). Schématiquement, les HDL sont responsables du transport inverse du cholestérol vers les voies d'élimination hépatique (par l'intermédiaire du récepteur SR-B1) (55), alors que les LDL favorisent l'entrée du cholestérol dans les cellules. Cette absorption cellulaire du cholestérol est contrôlée par le récepteur des LDL ainsi que par d'autres molécules comme le récepteur Scavenger, responsable de l'absorption non régulée du cholestérol à partir des LDL oxydées. Le surplus de cholestérol ne s'accumule pas au niveau de la membrane plasmique, mais est estérifié et stocké dans des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. Ces gouttelettes sont ensuite orientées vers d'autres compartiments subcellulaires après intervention de la protéine NPC-1, protéine dont les anomalies sont responsables de la maladie de Niemann-Pick de type 1 [dégénérescence neurovégétative avec accumulation cytoplasmique de cholestérol (56,57)]. Enfin, ces lipides sont transférés vers les HDL, puis véhiculés éventuellement vers le foie où ils sont éliminés.

L'homéostasie du cholestérol peut schématiquement être régulée selon trois niveaux : 1) le transport, l'absorption intracellulaire et l'estérification (lipoprotéines, transporteurs membranaires ABC1 et enzymes de conversion), 2) la biosynthèse endogène (anabolisme et catabolisme, par le SREBPs), et 3) la conversion métabolique en acides biliaires et en hormones stéroïdiennes.

Les cellules périphériques obtiennent leur cholestérol, d'une part par synthèse endogène et d'autre part grâce aux particules LDL circulantes via un récepteur spécifique à la surface des cellules. En 1970, M. Goldstein et Brown (52) ont été les

premiers à démontrer la présence d'un récepteur spécifique des LDL (LDL-R) dans des cellules normales. Cependant, la fonction de ce récepteur est absente des cellules homozygotes chez les sujets atteints d'hypercholestérolémie familiale.

Les LDL se lient à ce récepteur par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine B. L'endocytose permet alors au complexe récepteur-LDL de pénétrer dans la cellule, où il est dissocié. Par la suite, le récepteur est recyclé à la surface pendant que l'apolipoprotéine B et les esters de cholestérol sont hydrolysés dans les lysosomes. Enfin, c'est dans le cytoplasme qu'une enzyme nommée acyl-cholestérol-acyl-transférase (ACAT) réestérifie le cholestérol. La présence du cholestérol dans la cellule entraîne : A) une diminution de la synthèse du récepteur, b) une inhibition de l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol soit l'hydroxy-méthyl-glutarul-CoA-réductase (HMG CoA réductase) et c) l'activation de l'ACAT ( revue dans (58)). Des mutations dans le gène du LDL-R affectent donc l'habilité de la cellule à absorber le cholestérol-LDL, à synthétiser le LDL-R et à lier les particules LDL, et ces mutations contreviennent aussi au processus de localisation subcellulaire (52).



**Figure 2. Représentation schématique du contrôle du transport sanguin du cholestérol : rôle des lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL) du transporteur ABCA1, des récepteurs LDL régulant le niveau du cholestérol dans différents tissus •, cholestérol libre**

À l'échelle de la cellule, le manque de cholestérol est détecté par un système qui conduit à l'activation des facteurs de transcription SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*). Les SREBP contrôlent à la fois l'expression des enzymes responsables de la biosynthèse endogène du cholestérol et son captage exogène, permettant ainsi à la cellule d'avoir un apport continu et adapté en cholestérol (59). La protéine SREBP est fabriquée sous forme d'un précurseur associé à la membrane du noyau et du réticulum endoplasmique. Lorsque la concentration intracellulaire des stérols diminue, le précurseur inactif lié à la membrane subit un clivage protéolytique en deux étapes, provoquant ainsi la libération d'un segment amino-terminal de 68 KD soluble et actif (59). Ce segment se dirige ensuite vers le noyau où il peut déclencher l'expression de gènes de réponse aux stérols.

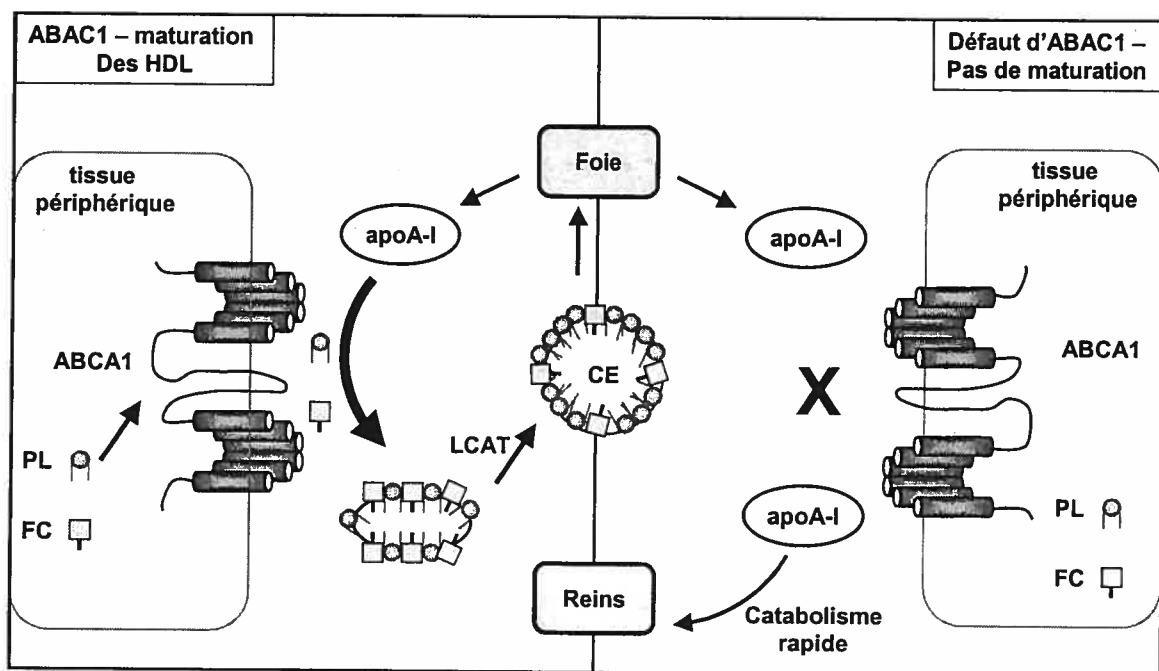
Les HDL sont aussi une source importante de cholestérol pour le foie et les tissus stéroïdogéniques. Les premiers sites de liaisons aux particules HDL ont été découverts il y a 20 ans (60,61). Toutefois, à cause de leur hétérogénéité, la nature de ces sites de liaison demeure encore un sujet débattu. L'une de ces protéines membranaires appelée le SR-BI " Scavenger receptor" ou le récepteur éboueur, permet la fixation des HDL sur les membranes plasmiques des cellules, puis le transfert des esters de cholestérol de ces lipoprotéines vers l'intérieur de la cellule (62). Le SR-BI est abondant dans le foie et dans les glandes capables de synthétiser des hormones stéroïdes (corticosurrénales, gonades). En assurant la capture des esters de cholestérol des HDL par le foie, le SR-BI joue un rôle primordial dans le retour du cholestérol (transport inverse) des tissus périphériques vers le foie, ainsi que dans son élimination de l'organisme (63).

### 1.3.2 Les différentes voies d'efflux de cholestérol.

L'efflux de cholestérol cellulaire est un processus complexe impliquant plusieurs mécanismes qui dépend à la fois de la nature des types cellulaires, des différents pools de cholestérol ainsi que de la nature des particules acceptrices. Un de ces mécanismes simples est la diffusion passive du cholestérol, où des molécules de cholestérol localisées sur la membrane plasmique diffusent vers des particules acceptrices riches en phospholipides (64). Certains microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques (lipid rafts) comme les cavéoles, sont tapissés de protéines spécifiques, les cavéolines, lesquelles sont capables de transporter le cholestérol de son lieu de synthèse, le réticulum endoplasmique, vers la membrane plasmique, provoquant ainsi l'efflux de cholestérol (65).

Un second mécanisme de l'efflux cellulaire de cholestérol implique le récepteur des particules HDL, le SR-BI. En plus de son rôle de transporteur des esters de cholestérol à l'intérieur de la cellule, le SR-BI est exprimé dans les macrophages et participe aussi à la sortie du cholestérol cellulaire libre en excès (66,67). Il favoriserait donc l'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL, ce qui constitue l'étape initiale du transport inverse du cholestérol.

Le troisième mécanisme de l'efflux cellulaire de cholestérol nécessite d'abord la synthèse et la translocation du cholestérol intracellulaire et des lipides à la membrane plasmique, lesquels sont ensuite acheminés vers des particules acceptrices d'apolipoprotéines, plus spécifiquement l'apolipoprotéine A-I (apoA-I). L'efflux de lipides est la première étape de la biogenèse des HDL, où des pré- $\beta$ -HDL sont générées. L'estérification du cholestérol libre (FC) par la *lécithine-cholestérol acyl transférase* (LCAT) et la composition en phospholipides permettent la formation des particules matures sphériques  $\alpha$ -HDL (figure 3). Ce sont ces mêmes particules qui fournissent des esters de cholestérol (CE) aux tissus stéroïdogéniques et au foie. Le SR-BI n'est pas le seul récepteur membranaire impliqué dans le processus inverse du cholestérol. En effet, le déficit génétique de la maladie de Tangier a récemment pu être identifié. En fait, cette maladie est caractérisée à la fois par une accumulation d'esters de cholestérol dans le tissu réticulo-endothélial, par un défaut d'efflux de lipides vers l'apoA-I, ainsi que par un effondrement du cholestérol-HDL plasmatique (68). L'origine génétique de cette maladie résulte d'un déficit d'une protéine membranaire nommée ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter1*) (17,19,20) responsable de l'efflux de cholestérol et des phospholipides cellulaires. Puisque que l'apoA-I est incapable de séquestrer le cholestérol et les phospholipides pour ainsi régénérer les particules discoïdales pré- $\beta$ -HDL, elle est rapidement dégradée par les reins (Figure 3).



**Figure 3. ABCA1, efflux de phospholipides et maturation des HDL.** L'ABCA1 est essentielle pour l'efflux de phospholipides et la maturation des HDL. Ces HDL sont enrichies de phospholipides et d'esters de cholestérol sous l'influence de la LCAT. Les HDL aboutissent finalement au foie où elles sont internalisées par le SR-BI. Dans la maladie de Tangier, la mutation de l'ABCA1 est incapable de lipider l'apoA-I, provoquant sa dégradation rapide par les reins et une chute des particules HDL plasmatiques. PL : Phospholipides, FC : Cholestérol libre, CE : Esters de cholestérol, LCAT : la lécithine cholestérol acyl transférase. (Adaptation d'après Owen JS. 2002) (69)

## 1.4 Désordre des lipoprotéines de hautes densités

### 1.4.1 Hypoalphalipoprotéinémie

Un taux de cholestérol-HDL bas, aussi appelé hypoalphalipoprotéinémie est associé à un risque accru de développement de la maladie coronarienne (8,36,37). De plus, l'hypoalphalipoprotéinémie est souvent associée à une hypertriglycémie et ces formes familiales se retrouvent chez 5% à 10% des patients présentant une maladie coronarienne prématurée (7).

L'hypoalphalipoprotéinémie n'est pas associée à des troubles neurologiques, de xanthomes, d'anomalies oculaires ou d'hépatosplénomégalie. En fait, l'analyse du complexe génique des apolipoprotéines A-I, C-III et A-IV semble démontrer l'existence d'un marqueur génétique dans l'expression d'un petit nombre de cas d'hypoalphalipoprotéinémie familiale (35). Cette forme familiale d'hypoalphalipoprotéinémie est souvent associée à un catabolisme fractionnel accru



(FCR ou Fractional Catabolic Rate) de l'apoA-I dans le plasma (70) qui, par conséquent, fait chuter le nombre de particules HDL plasmatiques.

D'autres dyslipidémies associées aux HDL peuvent aussi survenir, bien qu'elles soient excessivement rares: le déficit familial en LCAT (71) en est un exemple. Nous savons que l'apoA-I sert de cofacteur dans l'activation de la LCAT. Or, chez les patients atteints de ce déficit enzymatique, la LCAT n'est pas présente en quantité décelable dans le plasma. Par ailleurs, ces patients présentent une hypoalphalipoprotéïnémie souvent associée à la présence de particules LDL anormales, riches en cholestérol libre et en phospholipides, que l'on désigne par le nom de lipoprotéines x (Lp-x). Cette maladie, héréditaire, est transmise selon un mode autosomique récessif. Sa forme homozygote est caractérisée par une opacification cornéenne marquée, par la présence d'un arc lipoïdique, ainsi que par une athérosclérose précoce.

Bien entendu, il existe encore d'autres anomalies rares reliées au catabolisme des HDL: la "*fish eye disease*" qui se caractérise par une opacification cornéenne diffuse, un déficit en HDL et une hypertriglycéridémie (72). Au niveau moléculaire, certaines mutations de la LCAT provoquent cette maladie (73).

#### 1.4.2 Maladie de Tangier

Certaines maladies rares (hypoalphalipoprotéïnémies familiales) permettent de mieux comprendre le métabolisme complexe des HDL. C'est le cas de la maladie de Tangier. Cette affection est associée à un taux de HDL très bas, et les sujets atteints de la forme homozygote de la maladie présentent, outre une coronaropathie précoce, une coloration orangée des amygdales, une hépatosplénomégalie, des opacités cornéennes, et une neuropathie périphérique. L'ensemble de ces anomalies est dû à une accumulation des esters de cholestérol dans les macrophages (74). L'équipe de M. Oram J.F a démontré que les fibroblastes des patients atteints de cette maladie subissent une diminution nette de leurs efflux de cholestérol vers les particules HDL (17). Trois autres équipes (17,19,20) ont pu démontrer que l'anomalie moléculaire responsable de la maladie de Tangier était liée à des mutations d'un gène appelé ABCA1, qui code pour une protéine responsable de l'efflux de cholestérol cellulaire. Ce cholestérol est, chez le sujet normal, transféré vers des particules HDL natives riches en ApoA-I, lesquelles sont transformées en HDL matures par un enrichissement en phospholipides, et en esters de cholestérol grâce à l'action de la LCAT.

### 1.4.3 La déficience familiale en HDL

Au-delà de l'exemple démonstratif de la maladie de Tangier, il a été prouvé, par Marcil et al. (75) que d'autres mutations du gène de l'ABCA1 étaient impliquées dans l'hypoalphalipoprotéinémie familiale, telle que la déficience familiale en HDL. Dans les études où quelques cas de cette maladie ont été décrits (14-16), les sujets affectés présentaient de très bas niveaux de cholestérol-HDL plasmatique, soient inférieurs au 5<sup>e</sup> percentile de la population selon l'âge et le sexe, un niveau d'apoA-I de 20% à 50% de la normale, et une absence de signes cliniques de la maladie de Tangier. Ces patients ne présentaient pas non plus de diabète et d'hypertriglycéridémie sévère. En fait, la déficience familiale en HDL apparaît comme transmise selon un mode autosomique dominant ou codominant de type mendélien. Des études métaboliques sur la cinétique *in vivo* des apolipoprotéines-HDL radiomarquées au (D,D,D) leucine ont démontré chez les sujets affectés un hypercatabolisme marqué de l'apoA-I et des particules HDL (18) tel que rencontré dans plusieurs cas d'hypoalphalipoprotéinémie (70,76).

### 1.4.4 Les variantes de l'apoA-I

Un certain nombre de mutations affectant la structure et le point isoélectrique de l'apoA-I ont été décrites dans plusieurs populations américaines et européennes. Jusqu'à présent, au moins 11 mutations différentes ont été identifiées, et 2 isomorphes, l'apoA-I<sub>Milano</sub> et l'apoA-I<sub>Iowa</sub>, ont été associés à de faibles taux de cholestérol-HDL. L'apoA-I<sub>Iowa</sub> résulte de la substitution d'un acide aminé, l'arginine, par la cystéine sur le résidu 173 (ARG<sup>173</sup>→CYS) (77). Ces mutations présentent un hypercatabolisme de l'apoA-I. D'autres mutations ponctuelles du gène de l'apoA-I ont également été rapportées (78). Ces mutations entraînent une réduction marquée des niveaux de cholestérol-HDL et d'apoA-I, et pourraient affecter le transport intracellulaire du cholestérol.

## 1.5 Événements biochimiques de l'homéostasie cellulaire du cholestérol

### 1.5.1 Liaisons des HDL aux récepteurs

Un des mécanismes importants de génération des particules HDL plasmatiques est l'interaction entre les apolipoprotéines libres et les cellules (79). Au moins deux processus biochimiques peuvent répondre aux HDL (ou probablement à l'apoA-I), le premier processus étant la mobilisation du cholestérol intracellulaire et le second étant relié aux propriétés des particules HDL à induire plusieurs effets mitogéniques (80,81). La recherche d'un récepteur spécifique des HDL a suscité un grand intérêt au cours des dix dernières années. Plusieurs études ont identifié des récepteurs putatifs d'HDL ayant une masse moléculaire variant de 58 à 120 kDa (82,83) et, dans la plupart des cellules humaines, de 100 à 120 kDa. L'une de ces protéines appelée HDL-binding protein (HBP) (84,85) a été reconnue plus tard comme étant la vigiline, une protéine riche en valine-glycine-leucine, liant l'ARN (86,87) et étant régulée par le cholestérol intracellulaire dans les fibroblastes (88,89). Des études de *cross-linking* ont récemment montré que l'ABCA1 peut fixer l'apoA-I pauvre en lipides (pre $\beta$ -HDL) (90). L'efficacité de la liaison est déterminée par les différentes classes des HDL. En effet, les HDL<sub>3</sub> ont une capacité moindre à se lier à l'ABCA1 comparées aux particules pre $\beta$ -HDL, et elles ne se lient pas aux grosses particules HDL<sub>2</sub> (91). L'ABCA1 peut donc promouvoir un efflux cellulaire rapide vers les particules pre $\beta$ -HDL, lesquelles représentent une fraction minoritaire des HDL plasmatiques. Les pre $\beta$ -HDL sont métaboliquement efficaces, comprenant des apoA-I ainsi qu'un nombre faible de molécules de cholestérol et de phospholipides (64). La lipidation de l'apoA-I par l'ABCA1 augmente la taille des HDL qui se transforment en HDL matures par acquisition des esters de cholestérol, grâce à l'action de la LCAT.

Ce phénomène de lipidation nécessite un ligand ainsi qu'un récepteur fonctionnel. En effet, des études récentes ont montré que les macrophages de souris J774 transfectés avec les mutants d'apoA-I (delta (185-243)) abolissent presque complètement l'efflux de cholestérol modulé par l'AMPc (92). Ces études suggèrent aussi que l'hélice centrale de l'apoA-I, et particulièrement les résidus d'acides aminés (220-231), soient nécessaires lors de la liaison avec l'ABCA1 afin d'effluer le cholestérol et former des HDL. De plus, d'autres études ont démontré que les délétions de résidus d'acides aminés (221-243) (hélice 10) bloquent complètement l'efflux de cholestérol et la liaison avec l'ABCA1 dans

des macrophages de souris RAW stimulés avec l'AMPc (93). Enfin, en ce qui a trait au récepteur, une étude a montré que chez quatre patients atteints de la maladie de Tangier, les différentes mutations naturelles dans le domaine extracellulaire de la protéine ABCA1 n'affectent pas son expression à la membrane plasmique, mais altèrent la liaison à l'apoA-I ainsi que l'efflux de cholestérol (94). Ces données suggèrent donc que la liaison de l'ApoA-I au récepteur ABCA1 nécessite une interaction physique directe entre ces deux protéines pour permettre un efflux efficace de cholestérol ainsi qu'une maturation des particules HDL.

### 1.5.2 Transduction des signaux cellulaires

Les particules HDL exercent leurs fonctions anti-athérogènes (revue détaillée (95)) à partir de réponses contrôlées par les voies de transductions des signaux cellulaires (Tableau 1). Les HDL peuvent induire l'activation de la phospholipase C spécifique au phosphoinositol (PI-PLC) (24,26), des phospholipases C et D spécifiques à la phosphatidylcholine (PC-PLC, PC-PLD) (24,25) et de la protéine kinase C (27), de la même façon qu'ils peuvent induire la libération du calcium intracellulaire (26,96) (97). L'équipe de Garver *et al.* a montré que les HDL sont capables de mener la phosphorylation de deux protéines, soient la Raf-1 et la MEK-1, dépendantes des protéines G-trimériques (sensibles au traitement de la pertussis toxin), et appartenant à la famille des protéines kinases à activité mitogène (MAP kinases ou *mitogen-Activated protein Kinase*) (98). Certaines de ces réponses cellulaires sont mimées par l'apoA-I. L'effet mitogénique des HDL alors observé, répond à des concentrations hautes en HDL, allant de 300 à 500 µg/mL dans les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses. En ce qui nous concerne, nous nous en tiendrons seulement aux événements de signalisation cellulaire en relation avec l'efflux de cholestérol qui répondent probablement à des concentrations faibles en HDL (ou apoA-I).

À l'heure actuelle, bien des choses demeurent inconnues aux sujets de la relation entre la liaison de l'apoA-I à la surface de la cellule, des voies de signalisation cellulaire, de la protéine ABCA1 et de l'efflux de cholestérol.

**Tableau I. Signalisation intracellulaire par les HDL ou l'apoA-I**

| Type de signalisation                          | Type cellulaire   | Mime l'apoA-I | Références         |
|--|---|---------------|--------------------|
| PI-PLC   | Fibroblastes, cellules musculaire lisses, cellules endothéliales  | Non           | (24,26,96,99)      |
| PC-PLC   | Fibroblastes, thrombocyte   | Oui           | (24,25,100,101)    |
| PC-PLD   | Fibroblastes, thrombocyte   | Oui           | (24,102)           |
| PKC  | Fibroblastes, thrombocyte, Trophoblastes                          | Oui           | (26,27,103,104)    |
| MAPK   | Fibroblastes  | Non           | (98,105)           |
| AMPc   | Trophoblastes   | Oui           | (106)              |
| Oxide Nitrique (NO)                            | Cellules musculaires lisses, thrombocyte                          | Non           | (107-110)          |
| Tyrosine Kinase                                | Cellules mésangiales  | Oui           | (111)              |
| Libération de Ca <sup>2+</sup> intracellulaire | Fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales | Non           | (26,96,97,112)     |
| Protéines G-trimériques                        | Thrombocyte   | Oui           | (25,26,96,101,105) |

PI-PLC représente la phospholipase C spécifique au phosphatidyl-inositol; PC-PLC, la phospholipase C spécifique à la phosphatidyl-choline; PC-PLD, la Phospholipase D spécifique à la Phosphatidyl-choline; MAPK, mitogen-activated protein Kinase. Adaptation d'après Nofer JR. et al. 2002 (113)d}

### *Voies des phospholipases*

Les phospholipases jouent un rôle important dans l'efflux de cholestérol cellulaire. Dans les fibroblastes de sujets présentant la maladie de Tangier, certaines voies des transductions de signaux sont altérées. En ce sens, on a observé une forte diminution de l'activité de la PI-PLC (26), de la PC-PLC et de la PC-PLD en réponse à une stimulation des fibroblastes par des HDL<sub>3</sub> et de l'apoA-I (25). Les produits cellulaires générés suite à l'activation de la PLC et de la PLD sont respectivement le diacylglycérol (DAG) et l'acide phosphatidique (PA). Le DAG est l'activateur physiologique de la protéine kinase C (PKC). La stimulation de la PKC par un agent pharmacologique conduit à normaliser l'efflux de cholestérol dans les cellules de Tangier (114). De même, le traitement des macrophages normaux des souris avec le phorbol ester, un activateur de la PKC qui imite le DAG, stimule fortement l'efflux de cholestérol par l'apoA-I (115).

Quant à la PLD et son produit (PA), ils sont souvent associés au transport vésiculaire dans l'appareil de Golgi, puisque la PLD se lie aux protéines G monomériques *Arf* (ADP-ribosylation factor), reconnues comme des cofacteurs efficaces pour l'activité de la PLD (116,117).

D'un point de vue physiologique, la protéine kinase C serait activée par la fixation des HDL à la membrane plasmique. En fait, cette activation se traduirait par la translocation de la PKC du cytosol vers la membrane plasmique (27), impliquant possiblement l'activation de la PC-PLC et de la PC-PLD ainsi que l'interaction de molécules couplées à la protéine G (25,26). La liaison des particules HDL à un récepteur potentiel à la membrane plasmique des fibroblastes stimule la phosphorylation de plusieurs protéines de différents poids moléculaires. Ces protéines sont notamment les ERK-1 et les ERK-2, appartenant à la famille des protéines kinases à activité mitogène (MAP kinases). Cette phosphorylation serait partiellement contrôlée par la PKC (118). Les isomorphes de la PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$  sont présents dans les fibroblastes, alors que les formes  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$  et  $\eta$   $\gamma$  sont absentes ou très faiblement exprimées (119). Dans ce modèle, l'activation de la PKC est nécessaire à la translocation des pools de cholestérol cellulaire vers la membrane plasmique contrôlée par des apolipoprotéines (115).

#### *Transport vésiculaire et protéines-G*

Un certain nombre d'évidences démontrent que la liaison d'une apolipoprotéine à la cellule induit un transport vésiculaire et une exocytose de molécules de cholestérol et de phospholipides. De plus, une altération de l'appareil de Golgi par la brefaldine A inhibe l'efflux de cholestérol cellulaire (120,121). Des études en microscopie électronique montrent que les apoA-I et les apoE stimulent le transport vésiculaire et favorisent l'exocytose des lipides. Ce mécanisme impliquerait possiblement des radeaux lipidiques riches en cholestérol et en phospholipides (Domaines *Rafts*) (122). Les apolipoprotéines peuvent recruter des vésicules  $\beta$ -COP, et les colocaliser avec des lipides dans des vésicules d'exocytose à la surface de la cellule (123). Les protéines  $\beta$ -COP appartiennent à la famille des vésicules COPI, lesquelles sont constituées de sept sous unités de COP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\xi$ -COP) et un facteur de ribosylation ADP (*ARF*), et sont détectées dans les endosomes et les lysosomes (124). De même, il a été démontré que le récepteur ABCA1 pouvait aussi être localisé dans les endosomes et les lysosomes riches en cholestérol (125,126). L'ensemble de ces données suggère donc que l'ABCA1 puisse se localiser avec des vésicules de transport nécessaires à

l'acheminement du cholestérol des endosomes vers la membrane plasmique, puis vers l'accepteur final : l'apoA-I (transport par navette).

D'autres vésicules de transport sont impliquées dans le transport des lipides, dont les petites protéines-G, qui lient le GTP. L'équipe de M. Walter et al. a démontré qu'une accumulation des protéines G (RhoA, RhoB, RhoG et Rac-1) dans des fibroblastes de Tangier (127), pourrait potentiellement être impliquée dans le phénotype de la maladie et dans la régulation du transport intracellulaire du cholestérol. D'autres familles de petites protéines G seraient aussi impliquées dans l'efflux de cholestérol. En effet, Hirano et al. ont relevé, dans des fibroblastes et des macrophages de Tangier, une diminution sévère des protéines Cdc42, appartenant à la famille des rho GTPase et étant impliquées dans les réarrangements des filaments d'actine (128). Par transfection des cellules normales avec le dominant négatif de la protéine Cdc42, l'efflux de cholestérol est réduit significativement. Une réponse similairement altérée est recréée dans des fibroblastes de sujets normaux par un prétraitement des cellules avec la toxine de pertussis, laquelle affecte l'activité de la protéine G, suggérant son implication dans la maladie de Tangier (25).

#### *L'AMP cyclique intracellulaire*

L'étude de l'AMP cyclique (AMPc) et de l'efflux de cholestérol cellulaire suscite encore un grand intérêt. L'équipe de Smith et al. ont rapporté que l'AMPc induit un récepteur relié à l'apolipoprotéine, en même temps qu'il augmente l'efflux de cholestérol (129). Plus tard, le même groupe a montré que la modulation de l'AMPc est associée à une liaison à la membrane plasmique, à une endocytose, et à une resécration de l'apoA-I dans des cellules de macrophages de souris (130). De plus, l'augmentation de l'efflux de cholestérol qui suit cette modulation de l'AMPc a aussi été observée pendant la période de resécration de l'apoA-I.

Le niveau d'AMPc intracellulaire est déterminé par l'équilibre des activités entre l'adénylate cyclase (libère l'AMPc) et les différents types de phosphodiésterases (dégrade l'AMPc). En utilisant le (<sup>3</sup>H)-mevalonolactone, un précurseur marqué de cholestérol, on constate que l'efflux de cholestérol est augmenté par la présence d'un activateur de l'adénylate cyclase (Forskolin) ou d'un inhibiteur de la phosphodiésterase (IBMX) dans les fibroblastes humains et les cellules aortiques endothéliales (131). L'aspect énigmatique de l'effet de l'AMPc sur un récepteur contrôlant l'efflux de cholestérol est en partie élucidé grâce à la découverte de l'ABCA1. En effet, il a

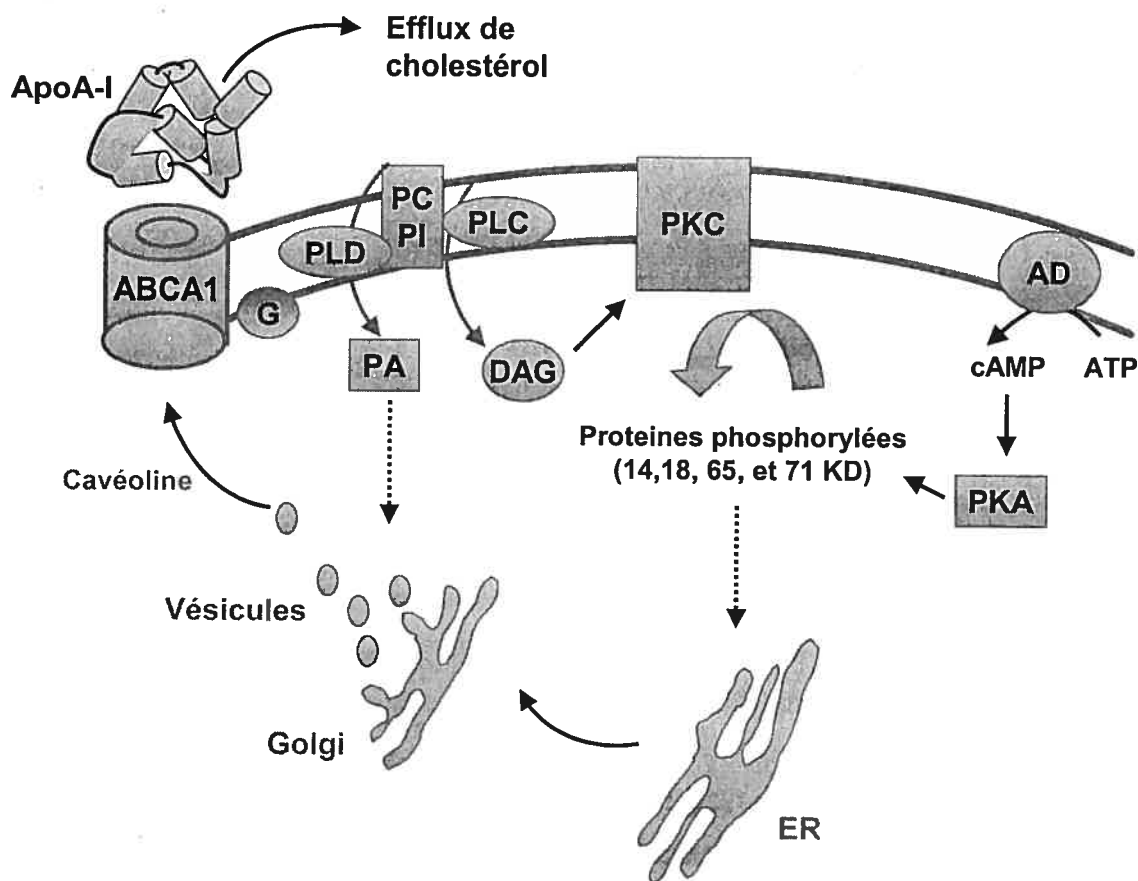
récemment été démontré que l'AMPc est à la fois impliquée dans l'augmentation de la liaison de l'apoA-I à la surface de la cellule, dans l'augmentation de l'expression génique de l'ABCA1 et, enfin, dans l'augmentation de l'efflux de cholestérol dans les macrophages (28). L'effet transcriptionnel de l'AMPc sur l'ABCA1 a seulement été identifié dans les macrophages (30). L'AMPc est considérée comme étant le seul médiateur de l'activité de la protéine kinase A (PKA). De ce fait, le niveau d'AMPc intracellulaire et l'activation de la PKA peuvent jouer un rôle considérable dans la modulation de l'efflux de cholestérol cellulaire.

### *Les caveolæ*

Le cholestérol est essentiel à l'intégrité structurale et à la fonction des *caveolæ* (132). Plusieurs observations supportent l'idée de l'implication des *caveolæ* dans le maintien de l'équilibre du cholestérol (133). Les *caveolæ*, connues depuis plus de 50 ans, sont des structures uniformes qui forment des invaginations à la membrane plasmique. Enrichies de cholestérol et de sphingolipides, les *caveolæ* forment un sous-groupe des domaines *Rafts*. La cavéoline est la protéine principale dans les *caveolæ* et elle joue un rôle multifonctionnel, incluant l'endocytose, la transcytose, l'homéostasie et le transport du cholestérol. Les *caveolæ* semblent être des sites très importants pour le transport du cholestérol des organes intracellulaires vers les accepteurs extracellulaires de cholestérol (HDL). En ce sens, une régulation négative de la cavéoline abolit complètement l'efflux de cholestérol dans les fibroblastes humains. À l'inverse, une surexpression de la cavéoline augmente l'efflux de cholestérol et la quantité du cholestérol cavéolaire (133). Le transport du cholestérol des organes intracellulaires vers les *caveolæ* est un processus apparemment régulé par des apolipoprotéines. En effet, une courte incubation de l'apoA-I sur des fibroblastes stimule la translocation du cholestérol intracellulaire vers les *caveolæ*, alors qu'une longue incubation de l'apoA-I augmente l'expression de la cavéoline (134). Grâce à son action d'ancrage, la cavéoline se lie à une variété de protéines de signalisation, comme la  $G\alpha_q$  /  $G\alpha_o$  /  $G\alpha_s$  (135), l'adenylate cyclase / PLC $\beta$ 2 (136), la PLD / PKC $\alpha$  (137), la PKA (138) et la PKC $\epsilon$  (139). Des récepteurs possédant des pouvoirs de signalisation sont aussi présents dans les *caveolæ*, comme le récepteur à l'insuline (140,141), le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) (142) et le SR-BI, un récepteur des HDL (65). Ces données supportent l'hypothèse que le mécanisme de translocation cellulaire du cholestérol implique principalement des voies de transduction de signaux incluant: 1) la



régulation des phospholipases dépendantes de la protéine G (qui fixe probablement un récepteur à douze domaines transmembranaires); 2) L'activation des protéines kinases A et C; 3) la phosphorylation de protéines clés impliquées dans l'efflux de cholestérol. Des structures spécifiques comme les *caveolæ* peuvent colocaliser ces voies de signalisation avec le transport de cholestérol (figure 4). Un défaut moléculaire au niveau d'un effecteur en amont des voies de signalisation altérerait donc le transport vésiculaire ainsi que l'efflux de cholestérol.



**Figure 4. Modèle de l'effet de l'apoA-I ou des HDL sur la signalisation cellulaire.** La liaison de l'apoA-I à la surface de la cellule induit l'activation des phospholipases PC-PLC, PC-PLD et PI-PLC qui génèrent le DAG et le PA. Ces voies pourraient impliquer des protéines-G nécessaires au transport du cholestérol. L'activation de la PKC stimule la phosphorylation des protéines de poids moléculaire de 14, 18, 65 et 71 Kda, possiblement impliquées dans l'efflux de cholestérol cellulaire. L'activation de l'adenylate cyclase (AD) augmente l'AMPc cellulaire qui est un médiateur important de la PKA, une kinase qui est probablement impliquée dans la régulation du cholestérol. L'apoA-I peut induire un transport vésiculaire et une exocytose de molécules de cholestérol et de phospholipides via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les cavéolines peuvent faciliter le mouvement du cholestérol à la membrane plasmique où finalement l'ABCA1 peut induire un efflux de lipides vers l'apoA-I.

## 1.6 Rôle des transporteurs ABC

### 1.6.1 Description des transporteurs ABC

L'ABCA1 appartient à la grande famille des gènes d'ATP-binding-cassette (ABC) codant pour des protéines transmembranaires. Les protéines ABC sont des transporteurs qui présentent deux domaines intracellulaires de liaison de l'ATP. Ils utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter diverses molécules (ions, acides aminés et protéines, sucres, phospholipides et variété de drogues) à travers la membrane biologique ainsi qu'à travers les membranes intracellulaires du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (143). Des mutations dans les transporteurs ABC sont à l'origine de différentes maladies génétiques (tableau II). Chaque membre de la famille ABC contient un ou deux domaines de six segments transmembranaires et un ou deux domaines cytosoliques nommés *Nucleotid Binding Fold* (NBF). Les NBF comportent deux motifs peptidiques (*walker A et Walker B*) et une séquence très conservée d'acides aminés entre les deux motifs (21). Les transporteurs ABC qui contiennent un domaine cytosolique et un domaine transmembranaire sont appelés des "demi-transporteurs" et peuvent être assemblés en homo ou en hétéro-dimers afin de former un transporteur fonctionnel (144). Quant à l'ABCA1, il est formé de deux "demi-transporteurs" liés par un segment hydrophobe, apparemment important pour la translocation des lipides (Figure 6).

### 1.6.2 Rôle de l'ABCA1 dans le transport inverse du cholestérol.

Le transport inverse du cholestérol est un important mécanisme d'élimination de l'excès de cholestérol des tissus périphériques vers le foie (145,146). Le phénotype des macrophages de Tangier suggère que l'ABCA1 joue un rôle primordial dans le transport inverse du cholestérol. L'apoA-I serait le précurseur principal de ce mécanisme, étant synthétisée et sécrétée essentiellement par le foie et les intestins ou régénérée par les particules matures des HDL. L'apoA-I, ne circulant pas librement, elle acquière le cholestérol libre ainsi que les phospholipides des tissus périphériques par un mécanisme dépendant de l'ABCA1 (figure 5).

Les particules HDL<sub>3</sub> puis HDL<sub>2</sub> matures ainsi formées, délivrent leurs esters de cholestérol dans le foie, pour être ensuite éliminer dans la bile.

**Tableau II. Principales maladie et phénotypes causés par les gènes ABC**

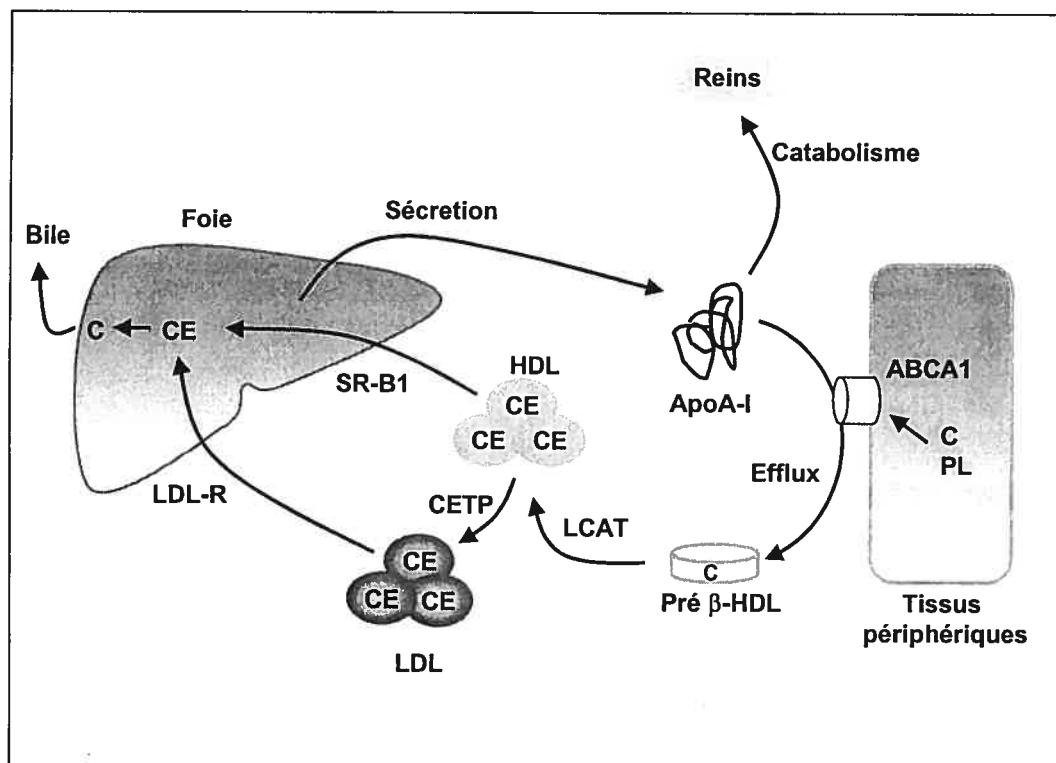
| Gène   | Désordre Mendellien           | Localisation chromosomique | Fonction                     |
|--------|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| ABCA1  | Maladie de Tangier, FHD       | 9q32.1                     | Efflux de phospholipides     |
| ABCA4  | Stargardt                     | 1p21.3                     | Efflux de N-Rétinylidène     |
| ABCB1  | Susceptibilité à l'Ivermectin | 7q21.12                    | Résistance aux drogues       |
| ABCB2  | Déficiences immunitaire       | 6p21.3                     | Transport de peptides        |
| ABCB3  | Déficiences Immunitaire       | 6p21.3                     | Transport de peptides        |
| ABCB4  | PFIC3                         | 7q21.12                    | Transport de PC              |
| ABCB7  | XLSA/A                        | Xq21-q22                   | Transport du cluster Fe/S    |
| ABCB11 | PFIC2                         | 2q24.3                     | Transport du sel biliaire    |
| ABCC2  | Syndrome de Dubin-Johnson     | 10q24.2                    | Efflux des anions organiques |
| ABCC7  | Fibrose kystique              | 7q31.31                    | Transport des ions chlorides |
| ABCG5  | Sistostérolémie               | 2p21                       | Transport des stérols        |
| ABCG8  | Sistostérolémie               | 2p21                       | Transport des stérols        |

FHD, Hypoalphalipoprotéïnémie familiale; AMD, dégénérescence maculaire liée à l'âge; PFIC, choléstasie intrahépatique familiale progressive; ICP, choléstasie intrahépatique de grossesse; PC, phosphatidylcholine; XLSA/A, anémie et sideroblastose associé au chromosome X. Adaptation d'après Dean M. et al. 2002 (143).

Il est possible de se demander si l'ABCA1 est la principale protéine contribuant au transport inverse du cholestérol afin d'augmenter les niveaux d'HDL plasmatiques et ainsi protéger contre l'athérosclérose.

Il est vrai que des variations génétiques à l'intérieur même de la protéine ABCA1 sont associées à un risque de développement de l'athérosclérose dans la population générale [Revue dans (147)]. Par ailleurs, des expériences sur des souris transgéniques ont donné des résultats contradictoires. En effet, deux équipes ont démontré que la surexpression de l'ABCA1 humaine augmente à la fois les niveaux des HDL et de l'apoA-I, et stimule l'efflux de cholestérol dans différents types cellulaires (148,149). Dans le foie de la souris, cette surexpression est accompagnée d'une augmentation des sécrétions de cholestérol et de phospholipides dans la bile (148). Chez les poulets WHAM (Wisconsin hypoalpha mutant), un modèle animal comparable aux patients atteints de la maladie de Tangier ayant une mutation dans le gène de l'ABCA1, on a décelé une accumulation de cholestérol dans le foie due à la diminution de la sécrétion dans la bile (150). Ces résultats démontrent donc que l'ABCA1 contribue majoritairement

au mécanisme de transport inverse du cholestérol dans les tissus périphériques, ainsi qu'au métabolisme du cholestérol dans le foie (Figure 5). Cependant, d'autres études à partir de souris transgéniques montrent que la surexpression de l'ABCA1 n'augmenterait pas les HDL plasmatiques, et ce, malgré l'augmentation de l'efflux de cholestérol dans les macrophages (151). De même, dans une autre étude, des souris déficientes en ABCA1 (knockout) ne présentent pas d'altération dans la sécrétion de cholestérol et de phospholipides dans la bile (152). Cela suggère donc l'implication d'autres mécanismes ou transporteurs dans le métabolisme du cholestérol et des phospholipides dans le foie. En utilisant des souris déficientes en ABCA1, l'équipe de Marcel et al. a renforcé cette hypothèse en démontrant que le foie est toujours capable de générer des particules HDL (153).



**Figure 5. Modèle de transport inverse du cholestérol contrôlé par le transporteur ABCA1.** L'apoA-I, sécrétée essentiellement du foie, acquiert le cholestérol (C) et les phospholipides (PL) des cellules périphériques, comme les macrophages et les fibroblastes, et forme des particules HDL discoïdales. Ces disques mûrissent en HDL à travers l'action de la LCAT. Les esters de cholestérol (CE) sont transportés directement dans le foie grâce au récepteur Scavenger (SR-B1) et dans les cellules stéroïdégéniques (non présenté ici). Après action de la CETP, les LDL s'internalisent dans les hépatocytes grâce au récepteur des LDL (LDL-R). L'excès du cholestérol est sécrété dans la bile et l'apoA-I est ensuite recyclée dans le plasma. Si l'apoA-I n'est pas lipidée, elle est catabolisée dans les reins.

La voie du transport inverse du cholestérol implique l'interaction de plusieurs gènes (154). La compréhension de la participation de l'ABCA1 dans le métabolisme du cholestérol à l'échelle de l'organisme entier, nécessite des études supplémentaires à l'aide d'un modèle animal bien défini.

À l'échelle de la cellule, le mécanisme moléculaire de l'efflux de lipides contrôlé par l'ABCA1 n'est pas encore tout à fait élucidé, mais plusieurs modèles ont été mis de l'avant. Certaines études proposent que l'ABCA1 soit localisé dans les domaines *Rafts* et qu'il permette l'efflux de cholestérol (122). Par ailleurs, d'autres études suggèrent le contraire (155), que selon les types cellulaires, les domaines *rafts* et d'autres domaines puissent aussi participer à l'efflux de cholestérol contrôlé par l'ABCA1 (156). Malheureusement, les études n'ont pas encore réussi à localiser l'ABCA1 dans les *caveolæ* (122) source importante de cholestérol. Ceci vient donc confirmer les observations faites à partir des cellules de Tangier (ABCA1 défectueux) selon lesquelles un défaut de l'efflux de cholestérol vers l'apoA-I n'est pas associé à un défaut quantitatif de cholestérol cavéolaire (64,133).

Les efflux de cholestérol et de phospholipides contrôlés par l'ABCA1 peuvent se dissocier (91,157). Selon ce modèle, l'apoA-I se lipiderait en deux étapes. L'étape initiale serait contrôlée par l'interaction physique entre l'apoA-I et l'ABCA1 (28,158), afin qu'il ait formation d'un complexe ApoA-I/phospholipides. La deuxième étape permettrait la désorption du cholestérol des domaines membranaires vers ce même complexe par un mécanisme indépendant de l'ABCA1 (91,159). Par ailleurs, nous avons démontré dans notre laboratoire une corrélation significative entre l'efflux de cholestérol et l'efflux des phospholipides dans les fibroblastes des soixante-quatre patients qui présentaient une déficience au niveau des HDL plasmatiques (22). Ceci suggère que l'ABCA1 libère simultanément un efflux de phospholipides et de cholestérol. D'autres transporteurs ABC sont impliqués dans l'exo-transport des lipides, comme le transporteur ABCB4 qui est localisé dans les membranes canaliculaires des hépatocytes et qui joue un rôle important dans la sécrétion des molécules de phosphatidylcholine dans la bile (160). Ces transporteurs sont spécifiques à un seul substrat, contrairement à l'ABCA1 qui transporte deux substrats (le cholestérol et les phospholipides). Une explication possible de ce phénomène est que l'accumulation de cholestérol par les cellules cause la mort cellulaire et que le ratio cholestérol/phospholipides protège de la nécrose cellulaire. Des études ont montré que le chargement des macrophages en cholestérol augmente la synthèse des molécules de phospholipides (161), créant ainsi une réponse protectrice

contre l'accumulation toxique du cholestérol libre. Dans ce modèle, l'expression de l'ABCA1 est augmentée, aidant ainsi les macrophages à se débarrasser de leur accumulation excessive de cholestérol et de phospholipides.

Donc, l'ABCA1 serait un transporteur aussi bien spécifique pour les molécules du cholestérol que pour celles des phospholipides, agissant sur des cellules accumulant ces deux types de substrats.

### 1.6.3 Régulation de l'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol

Ces dernières années, la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression de l'ABCA1 et d'autres types de transporteurs ABC, a beaucoup progressé. Étant donné que l'ABCA1 est le récepteur débarrassant les cellules de leur excès de cholestérol, il est logique que le chargement des macrophages en cholestérol augmente à la fois sa transcription et son efflux de cholestérol (162,163). L'efflux de cholestérol et des phospholipides est contrôlé par les hétérodimères que forment les récepteurs nucléaires *liver X receptor* (LXR) et *retinoid X receptor* (RXR). Les facteurs de transcription LXR et RXR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et ils stimulent l'expression de l'ABCA1 en présence des oxystérols et des acides rétinoïques respectivement (164,165). Le traitement des cellules avec l'un de ces agonistes augmente la transcription, mais leur effet combiné est beaucoup plus marquant (164,165). LXR et RXR forment un hétérodimère et se fixent sur le premier intron du promoteur de l'ABCA1 (149,164,165). Le cholestérol pris par les cellules doit être converti en 22-hydroxycholestérol (22-OH), 24-hydroxycholestérol, 27-hydroxycholestérol et en 24,25-époxycholestérol, lesquels peuvent être les ligands physiologiques de LXR (166)208). L'incubation des macrophages de souris avec le 22-OH ou le T0901317, un agoniste sélectif de LXR, cause une augmentation de trois fois l'ARNm de l'ABCA1 (167). Par ailleurs, dans une autre étude, cette induction était absente des macrophages isolés des souris déficientes en facteurs de transcription LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . D'autres travaux démontrent que le traitement en oxystérols des fibroblastes NIH 3T3 ou des macrophages RAW264 augmente l'expression de l'ABCA1 (168). Dans ces mêmes travaux, l'expression rétrovirale de LXR $\alpha$  dans ces cellules augmente de 7 à 30 fois l'expression de l'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol. On peut aussi souligner que l'expression d'un autre transporteur de la même famille, l'ABCG1, lequel semble impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire dans les macrophages (169), est également contrôlée par RXR/LXR. La compréhension

des mécanismes de contrôle de ces gènes par les récepteurs nucléaires RXR/LXR constitue un champ d'investigation prometteur dans la lutte contre l'athérosclérose.

L'AMPc représente aussi un aspect clé dans la modulation de l'expression de l'ABCA1. Des études démontrent que le traitement des macrophages RAW264 avec le 8-Br-cAMP (8-Bromo-AMPc) augmente en même temps l'expression de l'ABCA1, l'efflux de cholestérol et la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1, et ce, en utilisant la méthode de cross-linker (28,29). Oram et al. suggèrent que l'effet inducteur de l'AMPc se fasse via l'augmentation de la transcription du gène, plutôt que par celle de la stabilité de l'ARNm ou de la protéine de l'ABCA1 (28). L'effet de la l'AMPc sur l'expression de l'ABCA1 est apparemment spécifique aux macrophages et il n'a pas été vu dans d'autres types cellulaires (30). Seulement des fibroblastes immortalisés peuvent répondre au traitement de l'AMPc mais cet effet est souvent modeste et demande un chargement des cellules en cholestérol (162,170). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, l'efflux de cholestérol augmente en présence d'un activateur de l'adénylate cyclase (Forskolin) ou un inhibiteur de la phosphodiesterase (IBMX), et ce, dans des fibroblastes humains et des cellules aortiques endothéliales (131). Il semble donc que l'AMPc exerce une régulation différente selon le type cellulaire. Personne, à l'heure actuelle, n'a identifié les éléments moléculaires responsables de la transcription du gène de l'ABCA1 ou de l'augmentation de l'efflux cellulaire de cholestérol.

Du côté de la régulation transcriptionnelle, des études commencent à élaborer des mécanismes post-transcriptionnels de l'ABCA1 touchant, par exemple, la stabilité de la protéine. Récemment, une étude par Wang N. et al. a démontré que la liaison de l'apoA-I à son récepteur ABCA1 augmente la disponibilité de la protéine à la membrane plasmique sans affecter l'ARNm. Cet effet est dû à la présence, dans le domaine intracytoplasmique de l'ABCA1, d'une séquence PEST riche en proline (P), en glutamate (E), en serine (S) et en thréonine (T). Cette séquence régule apparemment la fonction de l'ABCA1, puisque des mutations ciblées à l'intérieur de cette séquence augmentent l'efflux de cholestérol contrôlé par l'ABCA1 et par la liaison à l'apoA-I (33). La séquence PEST a souvent été impliquée dans le *turnover* des protéines parce qu'elle augmente l'ubiquitination et la dégradation protéasomale contrôlée par les protéases calpains (171). Ces résultats suggèrent ainsi que l'apoA-I stabilise le récepteur ABCA1 en inhibant les protéases calpains contrôlées par la séquence PEST. Des études parallèles démontrent l'action de l'apoA-I a un effet positif sur l'ABCA1 en inhibant les protéases de type thiol dans les macrophages humains THP1 (32). De plus, l'ABCA1 est

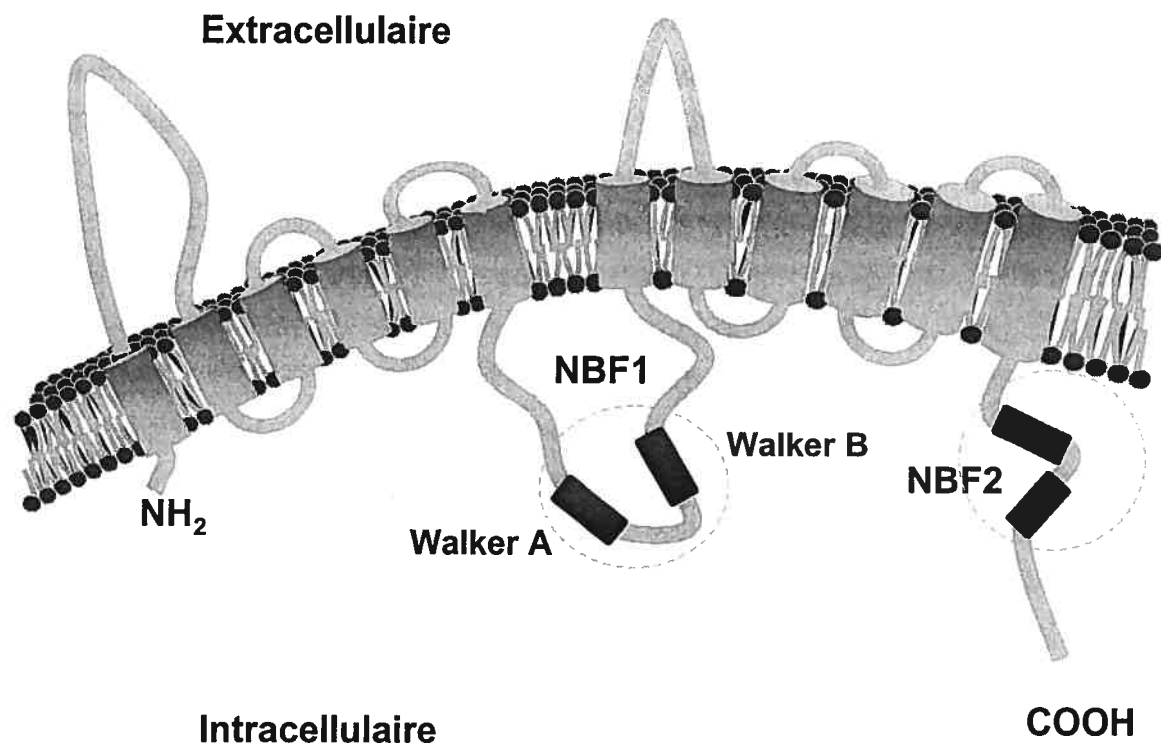
dégradé dans les macrophages chargés en cholestérol libre, et cette altération de l'ABCA1 est réversible une fois que les voies des protéasomes sont inhibées (172). Le tableau III retrace les principaux médiateurs de la régulation de l'ABCA1. Ces données appuient le concept que l'interaction entre l'apoA-I et l'ABCA1 déclenche l'efflux de cholestérol et de phospholipides en préservant l'ABCA1 à la surface de la cellule, et ce, par des mécanismes de signalisation intracellulaire. Une étude récente vient appuyer ce concept en démontrant que des mutations naturelles dans le domaine extracellulaire de l'ABCA1 (affectant la liaison à l'apoA-I) des patients atteints de la maladie de Tangier affectent la translocation de l'ABCA1 à la surface de la cellule (173).

**Tableau III. Régulation de l'expression de l'ABCA1**

| Effecteur           | Méiateur                   | ABCA1 | Mécanisme                 | Références |
|---------------------|----------------------------|-------|---------------------------|------------|
| Stérols             | LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ | +     | +ABCA1 transcription      | (164,165)  |
| Rétinoïdes          | RXR                        | +     | +ABCA1 transcription      | (164,165)  |
| Thiazolidinediones  | PPAR $\gamma$              | +     | + LXR transcription       | (174,175)  |
| GgPP                | GgPP, Rho                  | +     | + LXR transcription       | (176)      |
| ?                   | cAMP                       | +     | +ABCA1 transcription      | (28,30)    |
| ?                   | ZNF202                     | -     | -ABCA1 transcription      | (177)      |
| ?                   | SP1                        | +     | +ABCA1 transcription      | (178)      |
| ?                   | SP3                        | -     | Antagonistes SP1          | (178)      |
| ?                   | USF1/USF2/Fra2             | -     | -ABCA1 transcription      | (179)      |
| IFN $\gamma$        | ?                          | +     | +ABCA1 transcription      | (180)      |
| TGF $\beta$         | ?                          | -     | Antagonistes IFN $\gamma$ | (180)      |
| Oncostatin M        | ?                          | +     | +ABCA1 transcription      | (178)      |
| Acide gras insaturé | ?                          | -     | +ABCA1 dégradation        | (181)      |
| Cholestérol libre   | ?                          | -     | +ABCA1 dégradation        | (172)      |
| Apolipoprotéines    | ?                          | +     | -ABCA1 dégradation        | (32)       |

LXR représente le *Liver X Receptor*, RXR, *Retinoic X Receptor*, PPAR, *peroxisome-proliferator-activating nuclear receptors*; GgPP, geranylgeranyl pyrophosphate; IFN, interferon; TGF, *Transforming growth factor*, SP1, site de liaison sur un promoteur; USF, upstream stimulating factor; ZNF202, *zinc finger factor 202*. Adaptation d'après Oram JF. et al. 2003 (182).





**Figure 6: Représentation schématique du transporteur ABCA1.** L'ABCA1 est constitué de 12 domaines transmembranaires et de 2 domaines cytoplasmiques NBF (*Nucleotid binding fold*). Les NBF1 et NBF2 sont des domaines de fixation des nucléotides qui contiennent des séquences d'acides aminés très conservés : *Walker A* et *B*.

## 1.7 Conclusion

En 1999, la découverte de l'ABCA1 comme étant le gène défectueux chez les patients atteints de la maladie de Tangier, a fait rapidement progresser les recherches sur le métabolisme des HDL et de l'athérosclérose. Les HDL ont un rôle athéroprotecteur et participent au transport inverse du cholestérol. À l'heure actuelle, l'ABCA1 est considérée comme la protéine principale de formation des particules HDL, et ce, parce qu'elle élimine l'accumulation du cholestérol dans les macrophages des artères. L'ABCA1 influencerait donc à la fois la progression et la régression des maladies cardiovasculaires. Cependant, des études futures *in vivo* avec des modèles animaux bien définis seront nécessaires à la compréhension de la participation de l'ABCA1 à l'efflux de cholestérol ainsi qu'à la biogenèse des particules HDL dans les tissus spécifiques (hépatocytes et macrophages). La liaison de l'ApoA-I à l'ABCA1 permet l'efflux de cholestérol et des phospholipides d'une manière coordonnée vers l'apoA-I, et ce, afin de générer des particules HDL. L'expression de l'ABCA1 est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. En effet, l'interaction de l'apoA-I avec l'ABCA1 régule ces deux niveaux de transcription. Les facteurs de transcription LXR et RXR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et ils stimulent l'expression de l'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol en présence d'oxystérols et d'acides rétinoïques. La liaison des HDL ou de l'apoA-I à la surface de la cellule permet l'activation des voies de transductions cellulaires incluant l'activation des phospholipases C et D, qui lient probablement des protéines-G, l'activation de la PKC, la génération de l'AMPc ainsi que la phosphorylation des protéines clés dans l'efflux de cholestérol. Des structures spécifiques comme les *caveolæ* peuvent colocaliser ces voies de signalisation avec le transport de cholestérol. De plus, l'interaction physique entre l'apoA-I et l'ABCA1 stabilise l'ABCA1 et augmente l'efflux de cholestérol en empêchant sa dégradation par les protéases protéosomales. Ainsi, la régulation post-transcriptionnelle de l'ABCA1, possiblement par des molécules de signalisation, peut constituer une cible potentielle de développement d'un traitement de l'athérosclérose.

## Deuxième partie: contribution originale

### Chapitre 2 : Énoncé du projet

#### 2.1 Introduction

Un niveau bas de cholestérol-HDL est un important facteur de risque cardiovasculaire (183). Le transport inverse du cholestérol représente la voie principale de la biogenèse des particules HDL et du retour de l'excès de cholestérol vers le foie (184). L'ABCA1 est considérée comme une protéine anti-athérogène dans le mécanisme inverse du cholestérol (147-149). L'efflux de cholestérol cellulaire implique la liaison des particules HDL ou de l'apoA-I à la membrane plasmique, lesquelles exercent une variété de signalisations cellulaires impliquant la translocation et l'efflux de cholestérol (chapitre 1). De nombreuses études ont confirmé que l'apoA-I se lie spécifiquement à l'ABCA1 (28,158). Cette liaison a pour effet d'augmenter l'efflux de cholestérol et des phospholipides vers les particules HDL naissantes. L'expression de l'ABCA1 est régulée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. L'interaction entre l'apoA-I et l'ABCA1 permet la modulation de ces deux formes de mécanismes. En effet, il a été démontré que la liaison de l'apoA-I avec l'ABCA1 permet l'efflux de cholestérol. Cette déplétion du cholestérol cellulaire a pour effet de diminuer l'activité des facteurs transcriptionnels de LXR/RXR ce qui, par conséquent, peut diminuer l'expression de l'ABCA1 (165). De plus, l'AMPc a aussi été impliquée dans la régulation transcriptionnelle de l'ABCA1. En effet, des études démontrent que le traitement des macrophages avec l'AMPc augmente en même temps l'expression de l'ABCA1, l'efflux de cholestérol et la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1 (28,29). Mais cet effet transcriptionnel de l'AMPc est apparemment spécifique aux macrophages (30). Par ailleurs, l'apoA-I a un effet positif sur l'expression de la protéine ABCA1 (effet post-transcriptionnel). En effet, l'interaction physique entre l'apoA-I et l'ABCA1 augmente à la fois la concentration membranaire de l'ABCA1 ainsi que l'efflux de cholestérol cellulaire (33). Cet effet est dû à l'inhibition des protéases calpains dans les protéosomes et joue un rôle important dans les hépatocytes ainsi que dans les macrophages.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés selon l'hypothèse suggérant que la régulation de l'ABCA1, ainsi que la modulation de l'efflux de cholestérol, seraient contrôlées par des molécules de signalisation cellulaire impliquant probablement l'interaction entre l'apoA-I avec et son récepteur ABCA1.

## 2.2 Objectifs de l'étude

Dans les études présentées dans cette thèse, nous suggérons que la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1 module des voies de transduction de signaux nécessaires à la régulation de l'ABCA1 et à l'efflux de cholestérol cellulaire. Ces voies peuvent inclure l'activation des voies des phospholipases C et D, la libération de l'AMPc cellulaire, l'activation des protéines kinases A et C et, enfin, la phosphorylation des protéines de différents poids moléculaire, lesquelles sont importantes dans la modulation du mécanisme de l'efflux de cholestérol. Un défaut moléculaire de l'ABCA1 peut fortement altérer la liaison de l'apoA-I et la cascade de transduction des signaux cellulaires et, par conséquent, faire aboutir ces séquences d'éléments à un défaut de l'efflux de cholestérol cellulaire. Cependant, aucune équipe, à l'heure actuelle, n'a pu mettre en évidence une relation directe entre l'ABCA1 et ces voies de transductions de signaux qui peuvent constituer un autre volet important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'ABCA1 et de la modulation de l'efflux de cholestérol. C'est d'ailleurs sur ce dernier volet que se sont concentrées nos activités de recherches.

Dans cette thèse, nous avons réalisé les trois études suivantes:

1) Le transport et l'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL sont contrôlés par deux processus, le premier étant la diffusion passive du cholestérol et des phospholipides de la membrane plasmique vers l'apoA-I ou vers des vésicules de phospholipides (transport passif) et le deuxième faisant probablement appel à l'interaction entre l'apoA-I et l'ABCA1 ainsi qu'à la mobilisation du cholestérol intracellulaire via des molécules de signalisation cellulaire (transport actif). Dans cette première étude, nous avons examiné le transport actif et passif du cholestérol dans les cellules contrôles, les cellules FHD et celles de la maladie de Tangier en utilisant des molécules ayant une affinité pour le cholestérol telles que la sphingomyéline (SM), la phosphatidylcholine et la  $\beta$ -cyclodextrine. De plus, nous avons étudié le rôle des molécules dérivées de l'hydrolyse des phospholipases C et D spécifiques aux phosphatidylcholine, lesquels sont respectivement le DAG et le PA, l'acide lysophosphatidique (LPA), ainsi que les activateurs et les inhibiteurs de la PKC sur l'efflux de cholestérol cellulaire.

2) L'AMPc joue un rôle important dans la modulation de l'ABCA1 et dans l'efflux de cholestérol. Pour cette deuxième étude, nous avons examiné, dans les fibroblastes des sujets normaux, dans ceux des FHD et dans ceux des Tangier, l'effet de l'activation de

l'adénylate cyclase et de la modulation de la protéine kinase A sur l'expression et la phosphorylation de l'ABCA1, ainsi que sur l'efflux de cholestérol cellulaire.

3) À la lumière des données obtenues dans la deuxième étude, nous avons émis l'hypothèse que l'apoA-I stimule l'efflux de cholestérol cellulaire en agissant sur la liaison de l'ABCA1, sur les niveaux d'AMPc cellulaire, sur l'activation de la PKA et sur la phosphorylation de l'ABCA1, le tout permettant ainsi la lipidation de l'apoA-I. Notre hypothèse a été soutenue par des études ultérieures démontrant que, 1) l'efflux de cholestérol est stimulé par l'interaction physique entre l'apoA-I et les deux boucles extracellulaires de l'ABCA1 (94); 2) l'apoE (lie aussi bien l'ABCA1) pourrait mener la phosphorylation de la protéine kinase B dans les cellules neuronales via la voie de l'AMPc dépendante de la PKA (185); 3) les HDL ou l'apoA-I peuvent induire une augmentation de l'AMPc cellulaire dans les trophoblastes (106).

Dans cette étude, nous avons examiné les mécanismes moléculaires de la phosphorylation de l'ABCA1 et de la génération de l'AMPc cellulaire par la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1. De plus, nous avons voulu montrer l'association entre le récepteur ABCA1 et les protéines-G trimériques. Ces mécanismes ont été étudiés dans des cellules normales (ABCA1 fonctionnel) ainsi que dans les cellules de Tangier (ABCA1 défectueux).

### **2.3 Sélection du modèle et des sujets étudiés**

Comme modèle de lignée cellulaire afin d'étudier la modulation de l'efflux de cholestérol, nous avons principalement choisi les fibroblastes humains. En effet, les cellules périphériques ou extra-hépatiques (fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, etc.) synthétisent chaque jour approximativement 9 mg de cholestérol par Kg de masse corporelle (186). Ce cholestérol doit retourner vers le foie pour un catabolisme efficace. En ce sens, un défaut dans le transport inverse du cholestérol peut favoriser l'accumulation du cholestérol dans les parois des artères et ainsi développer l'athérosclérose. C'est le cas de la maladie de Tangier. Les patients atteints de cette maladie ont un niveau très bas de HDL plasmatique, dû à l'altération du mécanisme inverse du cholestérol. L'origine moléculaire de cette affection rare se situe au niveau des mutations sur le gène de l'ABCA1. Ces mutations sont classées en deux formes : homozygotes et hétérozygotes. Les formes hétérozygotes de mutations de l'ABCA1 se retrouvent chez les patients atteints d'une déficience familiale

en HDL. Ces patients, ne présentant pas les symptômes cliniques de la maladie de Tangier, ont un défaut d'efflux de cholestérol vers l'apoA-I ainsi qu'une déficience du taux de cholestérol-HDL plasmatique ( $\leq 0.7$  mmol/L). Ces défauts sont transmis selon un mode autosomique codominant. Pour nos études, nous avons caractérisé un certain nombre de sujets FHD ayant différentes mutations au niveau du gène de l'ABCA1 ainsi qu'un défaut d'efflux de cholestérol (tableau IV). Les fibroblastes des sujets normaux, ceux des FHD ainsi que ceux de la maladie de Tangier ont été obtenus par une biopsie de la peau.

Nous avons aussi travaillé sur des lignées macrophagiques J774 exprimant fortement l'ABCA1 et modulant l'efflux de cholestérol cellulaire. Ces lignées ont été utilisées dans notre protocole pour examiner l'effet de l'AMPc sur l'expression du gène ABCA1, comparé aux fibroblastes, lesquels n'augmentent pas la transcription du gène de l'ABCA1 par l'AMPc. Enfin, des cellules endothéliales humaines ont été utilisées comme contrôle négatif de l'expression de la protéine ABCA1.

**Tableau IV. Caractérisation moléculaire du gène de l'ABCA1 chez les sujets étudiés**

| Lignée | HDL-C<br>(mmol/L) | Changement de<br>nucléotide                | Altération de la protéine              |
|--------|-------------------|--|--|
| CTR1   | 1.63              | -  | -                                      |
| CTR2   | 1.20              | -  | -                                      |
| FHD1   | 0.27              | Exon 14 $\Delta$ 2017-9                    | $\Delta$ L693                          |
| FHD2   | 0.18              | Exon 18 C2665T                             | R909X                                  |
| FHD3   | 0.39              | Exon 41 $\Delta$ 5618-23                   | $\Delta$ ED1893,4                      |
| FHD4   | 0.18              | Exon 48 C6370T                             | R2144X                                 |
| FHD5   | 0.09              | Exon 36 GG5277,8C                          | fs 1628G, Q1636X                       |
| TD1    | <0.1              | Exon 30 T4369C;<br>Exon 24 splice site G→C | C1477R<br>Partie du transcrit tronquée |
| TD2    | <0.1              | Exon 13 A1730G                             | Q597R                                  |
| TD3    | <0.1              | Exon 48 $\Delta$ C6370; nd                 | 2145X; nd                              |

CTR1 et CTR2 représentent les deux sujets contrôles; FHD1-5 sont hétérozygotes pour la mutation rapportée; TD1,3 sont des hétérozygotes et TD2 est homozygote; nd, non déterminé; fs, framshift (décalage du cadre de lecture).

## Chapitre 3: Article 1

### **Cellular Cholesterol Efflux is Modulated by Phospholipid-Derived Signaling Molecules in Familial HDL Deficiency / Tangier Disease Fibroblasts**

Bassam Haidar\*<sup>1,2</sup>, Stephanie Mott\*<sup>1</sup>, Betsie Boucher<sup>1</sup>, Ching Yin Lee<sup>1</sup>, Michel Marcil<sup>1</sup>, Jacques Genest Jr<sup>1</sup>.

From the Cardiovascular Genetics Laboratory<sup>1</sup>, McGill University Health Center, Royal Victoria Hospital, Montreal, Quebec, Canada H3A 1A1. Faculty of Medicine<sup>2</sup>, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.

Both first authors (\*) contributed equally to this work. Supported by grants MT 15042 from the Medical Research Council of Canada and MRC-PMAC grant DOP 40845 from the Medical Research Council of Canada and Parke-Davis Pharmaceutical Company and by a salary award from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) (JG Jr.).

*Running title: Modulation of Cholesterol Efflux in Tangier/FHD Cells*

Publié : J Lipid Res. 2001 Feb;42(2):249-57.



## ABSTRACT

Familial HDL deficiency (FHD) is the heterozygous form of Tangier disease (TD). Mutations of the ABCA1 gene cause FHD and TD. FHD/TD cells are unable to normally efflux cholesterol onto nascent HDL particles, which are rapidly catabolized. TD fibroblasts have an abnormal pattern of phospholipase C and D (PLC, PLD) activation following cell stimulation with HDL<sub>3</sub> or apolipoprotein A-I (apoA-I). We examined cellular cholesterol efflux in FHD and TD fibroblasts by phospholipid derived-molecules, compared with that of normal cells. We used the protein kinase C (PKC) agonist 1,2-dioctanoylglycerol (DOG) and phorbol myristate (PMA) to activate PKC, calphostin C and GÖ 6976, as inhibitors of PKC, phosphatidic acid (PA), the product of PLD, lysophosphatidic acid (LPA), phosphatidylcholine, sphingomyelin, and  $\beta$ -cyclodextrin to investigate their potential effect in modulating cellular cholesterol efflux in <sup>3</sup>H-cholesterol labeled and cholesterol loaded fibroblasts. Phosphatidylcholine, sphingomyelin or  $\beta$ -cyclodextrin promoted cholesterol efflux in an identical fashion in control, FHD or TD fibroblasts. In a dose-dependent fashion, DOG (0-200  $\mu$ M) increased apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux by 40% in controls, 71% in FHD, and 242% in TD cells. PMA similarly increased cholesterol efflux to a maximum of 256% in controls, 182% in FHD and to 191% in TD cells. This effect was inhibited by calphostin C. PA (100  $\mu$ M) also increased cholesterol efflux by 25% in control, 44% in FHD and 100% in TD cells. Conversely, LPA reduced cholesterol efflux in a dose-dependent fashion in control and FHD cells (-50%, 200  $\mu$ M) but not in TD cells, where efflux was increased by 140%. Propranolol (100  $\mu$ M) significantly increased cholesterol efflux at 24-hours in all three cell lines. N-butanol partially decreased the DOG-mediated increase in cholesterol efflux. The inhibitory effect of calphostin C on DOG-stimulated cholesterol efflux could be partially overcome by propranolol, suggesting that PA is a downstream mediator of PKC-stimulated cholesterol efflux. We conclude that PLC and PLD activities are required for apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux and modulating cellular PA concentration can correct, at least partially, the cholesterol efflux defect in FHD and TD.

**Key words:** Familial HDL deficiency, Tangier disease, cellular cholesterol efflux, protein kinase C, phospholipase C and D.

## INTRODUCTION

High-density lipoproteins (HDL) are involved in cholesterol transport and contribute to a remarkably large spectrum of biological processes<sup>1,2</sup>. Epidemiological studies have consistently shown a reverse association between HDL-cholesterol (HDL-C) levels and the presence of coronary artery disease (CAD)<sup>3-10</sup>. Most cases of reduced HDL-C levels are secondary to increased secretion of apolipoprotein (apo) B-containing lipoproteins of hepatic origin<sup>11</sup>. Isolated HDL deficiency is found in approximately 4% of premature CAD subjects<sup>11</sup>. Rare causes of HDL deficiency include apoA-I abnormalities, disorders of HDL processing enzymes and familial HDL deficiency (FHD) or Tangier disease. Familial HDL deficiency is defined as a HDL-C level <5<sup>th</sup> percentile for age- and gender-matched subjects<sup>12</sup> and is caused by a defect in cellular cholesterol efflux onto nascent HDL particles. Decreased apoA-I- or HDL<sub>3</sub>-mediated cellular cholesterol efflux in skin fibroblasts is observed in FHD patients<sup>13</sup>. A similar defect has also been reported in cells from Tangier subjects<sup>14-16</sup> (although more severe) and in patients with severe HDL deficiency<sup>17</sup>. The reduced cellular cholesterol efflux results in the inability or inefficiency to provide cholesterol to nascent HDL particles leading to a marked decrease in the formation of spherical, cholesteryl ester-rich lipoproteins with  $\alpha$ -migrating properties on agarose gel electrophoresis<sup>13</sup>. Kinetic studies on HDL metabolism with endogenously labeled apoA-I containing particles show that these particles are rapidly catabolized<sup>18</sup>. We have recently shown that FHD and Tangier disease are caused by mutations in the ATP binding cassette-1 (ABCA1) gene on chromosome 9q31<sup>19,20</sup>. FHD is the heterozygous form of Tangier disease. The ABCA1 gene encodes a member of the ATP-binding transporter superfamily, which is involved in energy-dependent transport of many substrates across membranes. Other members of this superfamily are the multidrug resistant (MDR) proteins, and the p-glycoproteins that are driven by ATP hydrolysis<sup>21,22</sup>.

Studies performed on human skin fibroblasts show that cellular cholesterol transport and efflux are, in large part, mediated by HDL particles (and other acceptors) in two separate processes<sup>20, 23</sup>. First, passive diffusion of membrane-associated cholesterol and phospholipids onto apoA-I-containing lipoproteins or phospholipid vesicles and a second process by which apoA-I and apoA-I-containing lipoprotein-cell interaction promotes the hydrolysis of stored cellular cholesteryl esters and subsequent translocation of cholesterol to the plasma membrane. This process can be inhibited by brefeldin A and monensin, which disrupt the trans-Golgi network<sup>24</sup>. Although the precise

mechanisms of lipoprotein-cell interaction are unclear and, to date, a specific apoA-I or HDL receptor mediating this effect has not yet been characterized<sup>25</sup>, a model has been proposed for cellular cholesterol efflux<sup>23</sup>. ApoA-I (or HDL<sub>3</sub>) mediates the activation of phosphatidylcholine specific phospholipases C and D (PLC and PLD) and the hydrolysis of membrane phospholipids with the generation of diacylglycerol (DAG) and phosphatidic acid, respectively. This response is postulated to be mediated by a G-protein-coupled receptor and activates protein kinase C (PKC)<sup>26</sup>. By mechanisms still poorly understood, cholesterol translocation to the plasma membrane is stimulated.

In order to determine if the defective cholesterol translocation and efflux pathways could be modulated *in vitro*, the objective of the present study was to examine the effects of 1,2-dioctanoylglycerol (DOG), phorbol myristate acetate (PMA), phosphatidic acid (PA), lysophosphatidic acid (LPA), sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC),  $\beta$ -cyclodextrin and lysophosphatidylcholine (LPC) on cellular cholesterol efflux.

## METHODS

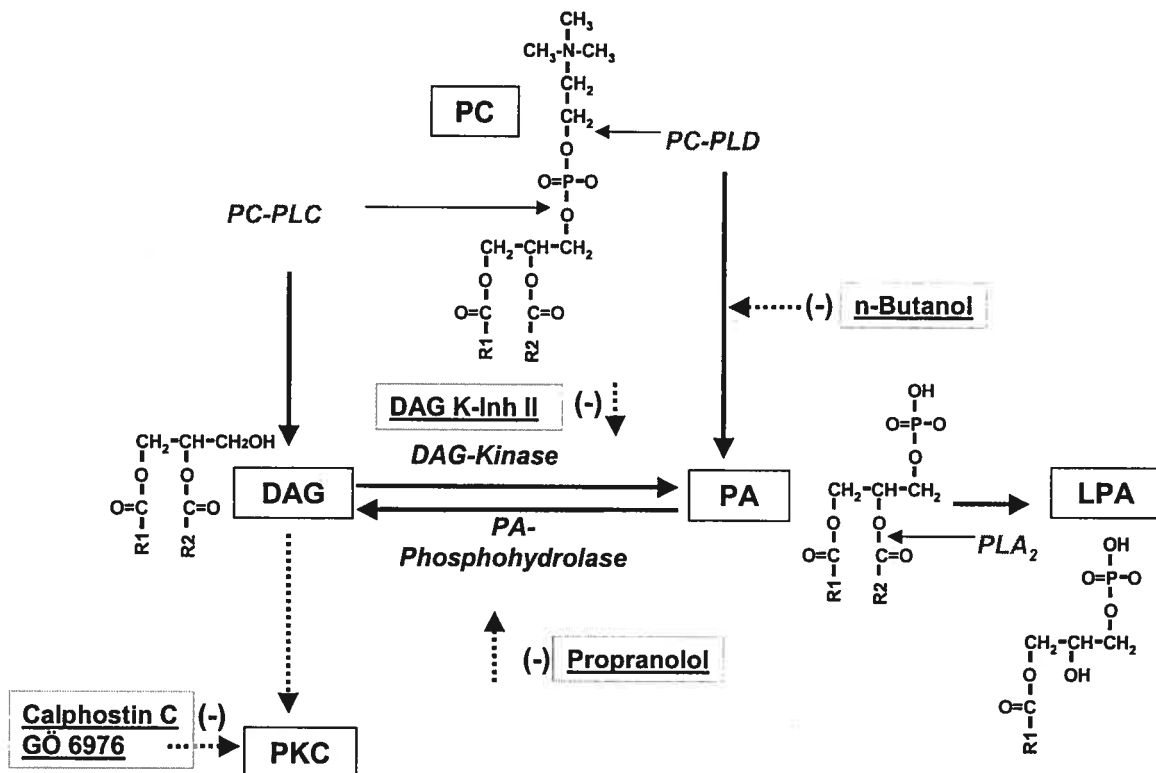
Cell culture medium, supplements and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco BRL.  $^3\text{H}$ -cholesterol was obtained from Mandel. Cholesterol, 1,2-dioctanoylglycerol, phosphatidic acid, lysophosphatidic acid, sphingomyelin, phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine,  $\beta$ -cyclodextrin, n-butanol and propranolol were purchased from Sigma, phorbol myristate acetate, calphostin C, diacylglycerol kinase Inhibitor II and GÖ 6976 from Calbiochem.

**Patient selection.** Patients with FHD were selected as previously described<sup>12,13</sup>. Five probands from four different kindred with FHD, control subjects and one patient with Tangier disease have been previously characterized<sup>20, 27</sup>. Briefly, FHD subjects are defined as having a very low HDL-C (< 5<sup>th</sup> percentile for age- and gender-matched with triglycerides <95<sup>th</sup> percentile) transmitted as an autosomal co-dominant trait associated with a marked reduction of HDL<sub>3</sub>- and apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux and the absence of the clinical signs of Tangier disease. The biochemical characteristics of these subjects are detailed elsewhere<sup>20,27</sup>. For the present study, we selected fibroblasts from one normal control subject (CTR), one patient with FHD (ABE) and one patient with Tangier disease (TD). Analysis of ABCA1 gene revealed a compound heterozygote state for the TD subject. The FHD patient has been previously referred to as 24430-301 (ABE) and the Tangier disease patient as TD1 in Mott *et al.*<sup>27</sup>.

**Cell culture.** Human skin fibroblasts were obtained from 3.0 mm punch biopsies of the forearm of patients and healthy control subjects and were cultured as described<sup>27</sup>. We seeded  $5 \times 10^4$  cells in 35 mm cell culture wells in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 0.1% nonessential amino acids, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 10% fetal bovine serum (FBS). At approximately 50% confluence, 0.2  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -cholesterol/mL was added in the cell medium. When the cells reached confluence, they were washed three times in phosphate buffered saline (PBS) containing 1 mg/mL BSA and the medium was replaced by DMEM without serum (cells in growth arrest) containing 2 mg/mL BSA and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of free non lipoprotein cholesterol for 24 hours. Cellular cholesterol pools were allowed to equilibrate for another 24 hours in DMEM containing 1 mg/mL BSA. Efflux studies (0-24 hours) were then performed in the presence and absence of specified efflux modulating signaling molecules and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of purified apoA-I. The cell culture media used in efflux studies

was DMEM without serum and 1 mg/mL BSA unless specified. All lipid products were dissolved as recommended by the manufacturer (PA, LPA, and PC were dissolved in chloroform, SM in chloroform:methanol 1:1; LPC was dissolved directly in Tris buffer, then evaporated under a stream of nitrogen and resuspended in a Tris buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.00) before being added to the efflux medium. Although the highest concentrations used in the experiments never exceeded 2%, Tris buffer showed no influence on cholesterol efflux at concentrations of up to 10% (data not shown).

**Modulation of the PKC, PLD, and PLC pathways.** Figure 1 summarizes metabolic pathways of PC hydrolysis and shows the sites of action for PLC, PLD, as well as phospholipases A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> (PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub>). Propranolol (100  $\mu$ M) was used as a specific inhibitor of PA-phosphohydrolase, we also inhibited the conversion of DAG to PA by diacylglycerol kinase inhibitor II (0.1-10  $\mu$ M); 1,2,-dioctanoyl-sn-glycerol [DOG, a diacylglycerol (DAG) analog] and phorbol myristate acetate (PMA) at a concentration of 160 nmol/L were used as stimulators of protein kinase C (PKC). Calphostin C was used as a selective inhibitor of the PKC regulatory site. The calcium-dependent PKC inhibitor GÖ 6976 was used at concentrations of 0.10-5.0  $\mu$ M for 24 H with apoA-I. Phosphatidic acid was used in concentrations from 0-150  $\mu$ M. At concentrations > 150  $\mu$ M for PA and >200  $\mu$ M DOG, cell toxicity was observed with cell death and reduced cellular protein concentration in culture wells. Cells treated with calphostin C (50 nM) were exposed to fluorescent light for 1 hour at 37°C for product activation. Since there are currently no commercially available specific PC-PLD inhibitors, formation of PA by PLD was decreased by the use of n-butanol, a substrate for PLD. Through transphosphatidylaton, n-butanol is converted to phosphobutanol and thus decreases the formation of PA. The efficiency of this pathway was estimated at 17% in normal and 33% in TD fibroblasts<sup>26</sup>. We also used lysophosphatidic acid (0-250  $\mu$ M), which has been shown to modulate cellular effects through a specific receptor<sup>28</sup>.



**Figure 1. Phospholipid pathways.** Phospholipids are composed of a backbone of glycerol, with two fatty acyl chains in positions R1 and R2. R3 is occupied by a phosphate group to which ethanolamine (phosphatidyl ethanolamine), choline (phosphatidylcholine PC), serine (phosphatidyl serine) or inositol (phosphatidyl inositol, PI) is attached. PLA<sub>1</sub> cleaves the first R1 fatty acyl chain and PLA<sub>2</sub> the second, generating a lysophospholipid. PC-PLC generates diacylglycerol (DAG) and choline phosphate and PLD generates phosphatidic acid (PA) and choline (thin arrows). DAG can be phosphorylated to PA by DAG kinase and PA can be converted to DAG by PA phosphohydrolase. This last step can be inhibited by propranolol. The formation of PA from PC through the action of PLD can be reduced by using n-butanol as a substrate for PLD, yielding phosphobutanol. The combined actions of PLA<sub>2</sub> and PLD generate lysophosphatidic acid (LPA). Calphostin C and GÖ 6976 inhibit PKC; DAG K-Inh: diacylglycerol kinase inhibitor II. Inhibitors are indicated by a (-) sign.

**Cellular cholesterol efflux determination.** ApoA-I-mediated (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) cholesterol efflux was carried out on the three cell lines; as control, we used fatty acid free bovine serum albumin (BSA-FAFA) only in the efflux medium. All experiments were performed in triplicate. Efflux was determined at the specified time points from 0 to 24 hours. At the indicated time, cells were chilled on ice and the medium was collected. The cell layer was harvested overnight in 0.1N NaOH at 4°C. Cellular protein concentration was determined according to Lowry *et al*<sup>29</sup> and one 150  $\mu\text{L}$  aliquot was reserved for scintillation counting of cellular  $^3\text{H}$ -cholesterol content. Cellular cholesterol efflux was determined as follow:  $^3\text{H}$  in medium/( $^3\text{H}$  in medium +  $^3\text{H}$  in cells); the results were expressed as % of total cholesterol. Data were also analyzed after correction for cell proteins. The efflux results are similar for both corrected and uncorrected data. In control cells, 8-12 % of total  $^3\text{H}$ -cholesterol is found in the medium after stimulation with apoA-I for 24 hours. Control experiments with DMEM + 0.1% BSA resulted in 1-2% cellular cholesterol efflux. Paired, two-tailed Student's t-tests were used to compare values of cholesterol efflux under various pharmacological manipulations between FHD, TD, and control cell lines. A  $p$  value <0.05 was considered statistically significant. The data are presented as mean  $\pm$  standard deviation unless specified.

**ApoA-I preparation.** HDL was isolated from fresh plasma of normolipidemic donors using a standard sequential ultracentrifugation with density (1.125-1.210  $\text{g}/\text{mL}$ ) adjusted with KBr. The HDL preparation was delipidated in acetone:ethanol (1:1) and total proteins were fractionated at 4°C on two Sephacryl S-200 (Pharmacia) columns (2.6 x 100 cm). Fractions contained in the apoA-I peak were extensively dialyzed in 0.01 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , then lyophilized and resuspended in PBS at concentration of 1  $\text{mg}/\text{mL}$ . Protein purity was assayed on PAGE on each apoA-I fraction and appropriate fractions were pooled, dialyzed in PBS and lyophilized before being stored at -70°C as stock<sup>13</sup>.

## RESULTS

The cholesterol efflux defect observed in FHD has been reported elsewhere<sup>13,27</sup>. For the present study, we have selected one of 5 FHD subjects from 4 families in whom a cholesterol efflux defect was identified<sup>27</sup>. Compared with skin fibroblasts from normal subjects, the mean reduction in apoA-I-mediated (10 µg/mL) cholesterol efflux from those 5 subjects was 59%. The selected proband for this study had the most severe efflux defect of the FHD probands tested, which was decreased by 55% of control values. In contrast, cells from a subject with Tangier disease had a ~90% reduction in apoA-I-mediated efflux. Each of the experiments was performed on fibroblasts from one FHD, one Tangier disease patient and one normal control. The characteristics of these three subjects are shown in Table 1. The Tangier disease patient, referred to as TD1<sup>19</sup> has a mutation in ABCA1 T4369C leading to a Cys1417Leu substitution in exon 30 and a splice site mutation in exon 24, leading to a truncated mRNA species. The patient with FHD (ABE<sup>13</sup>) has a mutation in exon 48 C6370T, resulting in a Arg2084STOP nonsense codon and a predicted loss of the terminal 118 amino acids of the ABCA1 gene product<sup>20</sup>. No other mutations of the ABCA1 gene was identified in this subject.

**Table I. Lipid values of Control, FHD and Tangier Subjects**

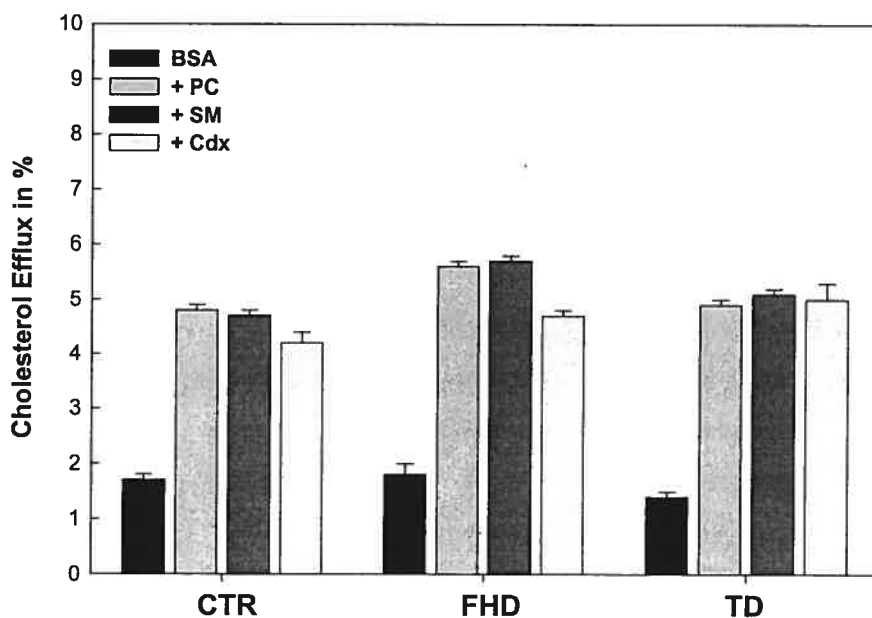
| Subjects | ID  | Age | Gender | Total C<br>mmol/L | HDL-C<br>mmol/L | ApoAI<br>mg/dL | TG<br>mmol/L | LDL-C<br>mmol/L |
|----------|-----|-----|--------|-------------------|-----------------|----------------|--------------|-----------------|
| CTR      | JGE | 40  | M      | 5.80              | 1.63            | 120            | 2.00         | 3.25            |
| FHD      | ABE | 53  | M      | 3.68              | 0.18            | 25             | 1.48         | 3.04            |
| TD       | TD  | 42  | M      | 2.30              | <0.1            | 2              | 1.96         | 1.39            |

C, cholesterol; TG, triglycerides; CTR, Control; TD, Tangier Disease

In the present study, we examined the effect of phospholipid-derived molecules on cellular cholesterol efflux (Figure 1). In order to determine whether passive diffusion of cellular cholesterol differed in control, FHD and TD cells, we examined the 24-hour cholesterol efflux onto phospholipids (phosphatidylcholine, 100 µmol/L; and sphingomyelin, 100 µmol/L) and the 12-hour efflux for β-cyclodextrin, 1 mmol/L. These experiments were performed in DMEM with appropriate concentrations of acceptor molecules and in the absence of HDL or apolipoproteins in the medium. We found that

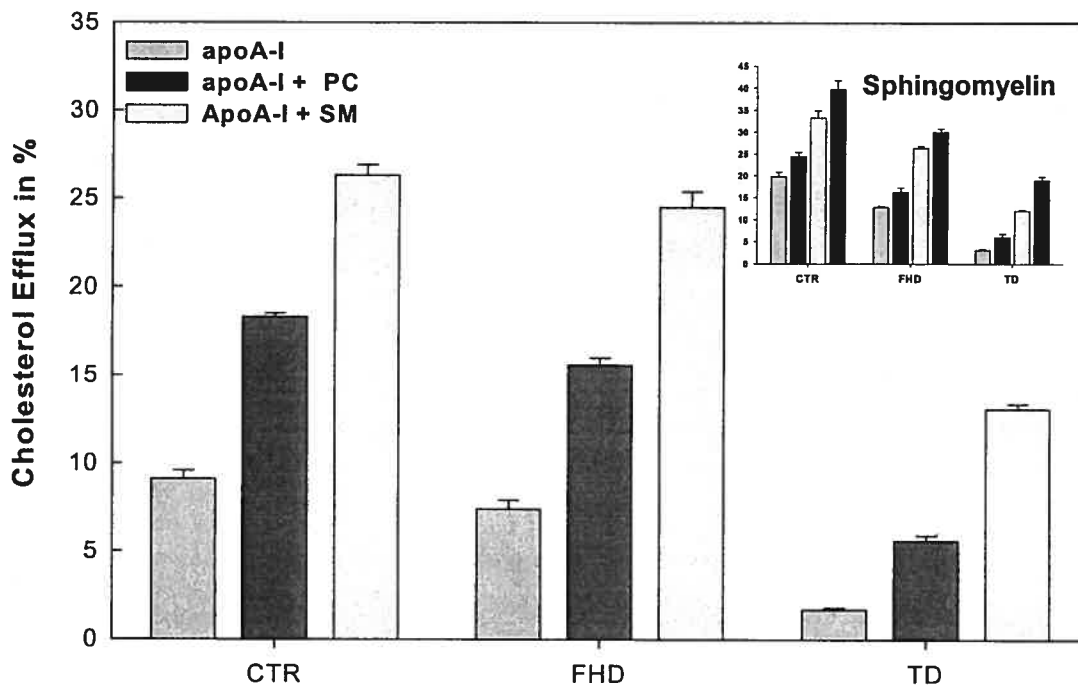


cellular cholesterol efflux in the presence of these acceptors was identical in the three cell lines (Figure 2) suggesting that passive desorption of cellular cholesterol was not affected by mutations at the ABCA1 gene locus



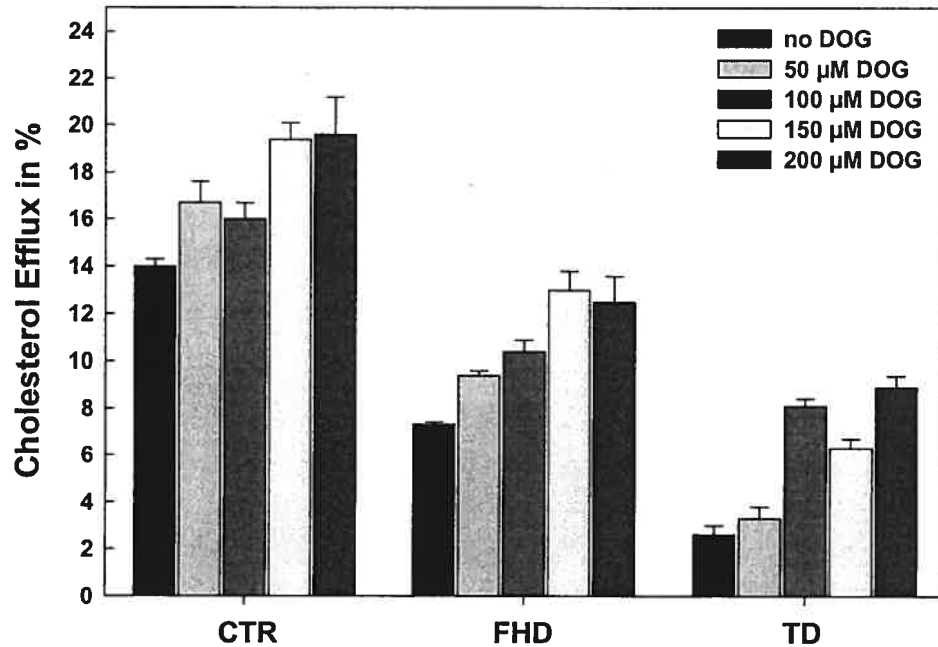
**Figure 2.** Effect of equimolar amounts (100  $\mu\text{M}$ ) of sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC), sphingosine (Sph), and  $\beta$ -cyclodextrin (Cdx, 1mM) on cellular cholesterol efflux. Cells were grown in DMEM/FBS and labeled with  $^3\text{H}$ -cholesterol (0.2  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ), then loaded with cholesterol (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in growth arrest. The efflux medium contained only BSA as cholesterol acceptor. The 24-hour efflux with PC and SM was identical for control (CTR), FHD and Tangier cells (TD), suggesting that membrane associated cholesterol desorbed normally in FHD and TD cells. Cholesterol efflux, at 3, 6 and 12-hours, for Cdx was similar for the 3 cell lines (inset).

The effect of phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM) on apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux was then tested. In the presence of apoA-I there was a significant increase in cholesterol efflux with PC [+101% in control ( $9.1 \pm 0.5\%$  vs.  $18.3 \pm 0.2\%$ ,  $p=0.001$ ); +111% in FHD ( $7.4 \pm 0.5\%$  vs.  $15.6 \pm 0.4\%$ ,  $p=0.001$ ); and +229% in TD cells ( $1.7 \pm 0.1\%$  vs.  $5.6 \pm 0.3\%$ ,  $p=0.001$ )] (Figure 3). Furthermore, there was an even more pronounced effect with sphingomyelin, in a dose-dependent fashion, at 0, 10, 50 and 100  $\mu\text{M}$  (Figure 3, inset), where cholesterol efflux was increased by 189% in control ( $9.1 \pm 0.5\%$  vs.  $26.3 \pm 0.6\%$ ,  $p=0.001$ ), 231% in FHD ( $7.4 \pm 0.5\%$  vs.  $24.5 \pm 0.9\%$ ,  $p<0.001$ ), and 670% in Tangier cells ( $1.7 \pm 0.1\%$  vs.  $13.1 \pm 0.3\%$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 3).

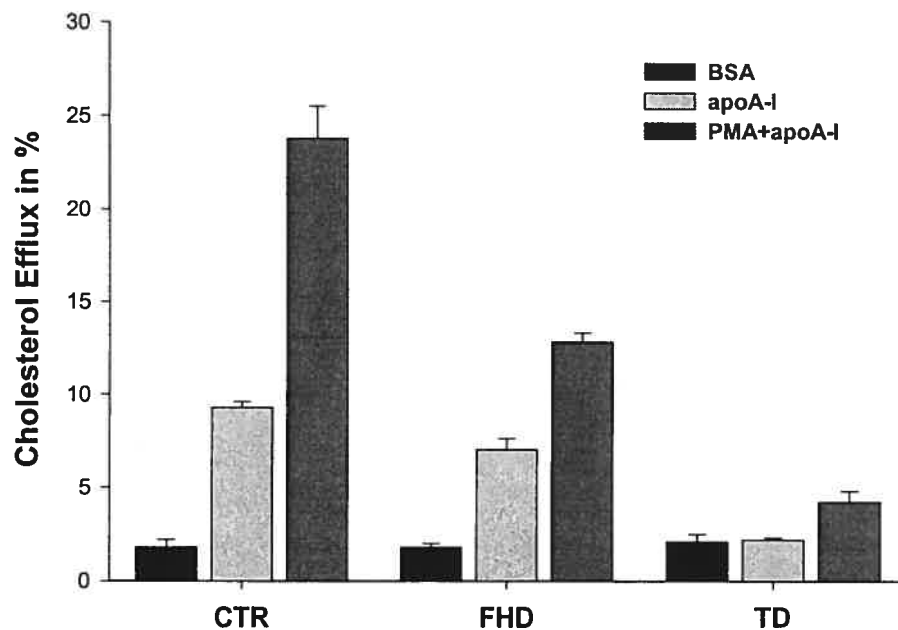


**Figure 3. ApoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in the presence of equimolar amounts (100  $\mu$ M) of sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC).** A marked increase in cholesterol efflux was noted for PC + apoA-I and for SM + apoA-I. Inset: dose-dependent increase in cholesterol efflux with SM (0, 1, 10, 100  $\mu$ mol/L) after cell stimulation with apoA-I (10  $\mu$ g/mL) for 24-hours.

The potential role of protein kinase C (PKC) in cholesterol efflux has been postulated in previous studies<sup>30,31</sup>. The effect of DOG [a PKC agonist and short chain analog of 1,2-diacylglycerol (DAG)] on cellular cholesterol efflux was examined in a dose-dependent fashion; results of normal, FHD and TD cells are shown in Figure 4. We used apoA-I, 10  $\mu$ g/mL in medium, as cholesterol acceptor because differences in efflux between the three cell lines were more pronounced compared with HDL<sub>3</sub><sup>13</sup>. At doses of 0-200  $\mu$ M of DOG, cellular cholesterol efflux at 24-hours increased in a dose-dependent fashion. At a maximal concentration of 200  $\mu$ M, cholesterol efflux increased by 40% in controls (14.0 $\pm$ 0.3% vs. 19.6 $\pm$ 1.6%,  $p$ <0.05), 71% in FHD (7.3 $\pm$ 0.07% vs. 12.5 $\pm$ 1.09%,  $p$ < 0.05) and 242% in TD cells (2.6 $\pm$ 0.4% vs. 8.9 $\pm$ 0.5%,  $p$ < 0.01). Similar results were found for the 12 hours time point (data not shown). To strengthen the concept that PKC's are involved in cellular cholesterol efflux, we used PMA (160 nmol/L; 3 hour preincubation) to activate PKC and measured <sup>3</sup>H cellular cholesterol efflux at 24 hours. As shown in figure 5, PMA significantly increased cholesterol efflux in controls (256%;  $p$ <0.001), FHD (182%;  $p$ <0.001) and TD cells (191%;  $p$ =0.005).

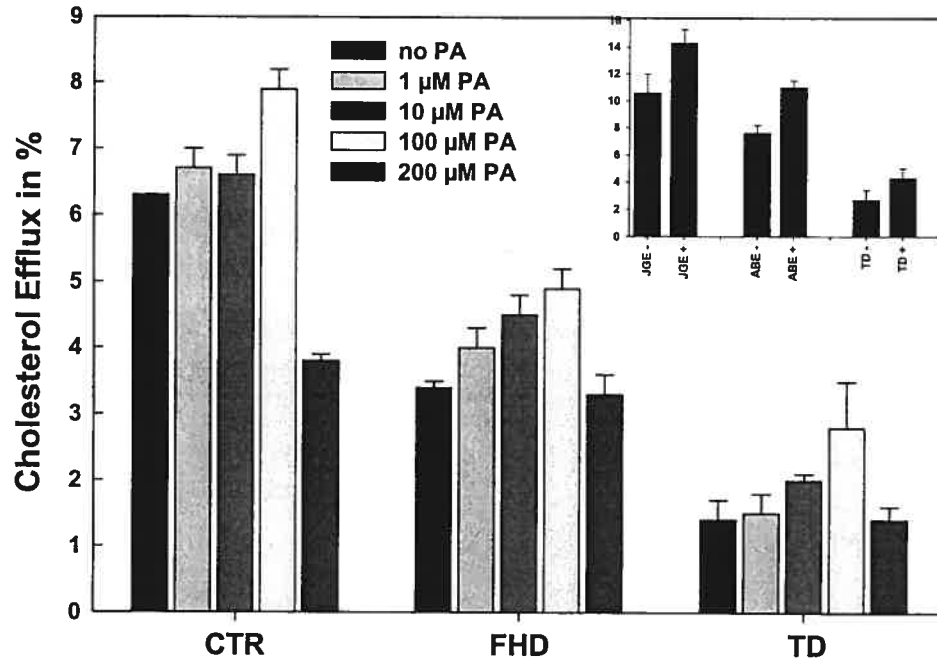


**Figure 4. Effect of DOG (0-200 μM) on cellular cholesterol efflux.** DOG was added to the culture medium and efflux was determined after 24-hours.



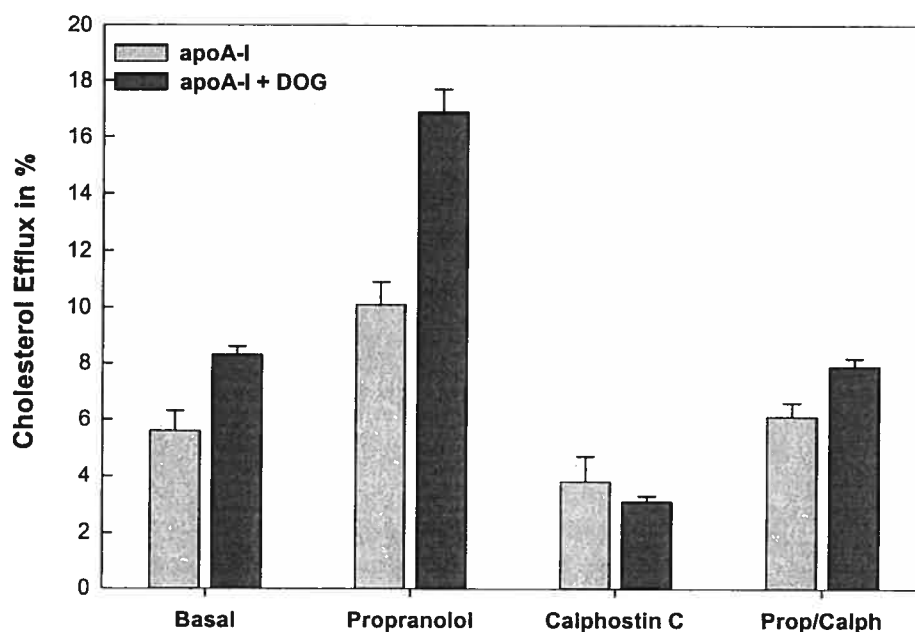
**Figure 5. Effect of PMA (160 nmol/L) on apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux.** Cells were pre-incubated with PMA for three hours and apoA-I-mediated efflux was performed at 24 hours.

The effect of PA was then investigated with doses varying from 0-150  $\mu\text{M}$ . At a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , PA, in the presence of apoA-I increased cholesterol efflux in control cells to a maximum of 125% ( $p=0.015$ ) and to 144% in FHD cells ( $p=0.018$ ), compared to apo AI alone. In Tangier cells, efflux was increased to 200% of control percentage of basal levels at 100  $\mu\text{M}$  PA ( $p<0.05$ ) (Figure 6). Similar results were observed at the 12-hours time point (data not shown). At a concentration of 200  $\mu\text{M}$ , PA decreased efflux significantly in all three cell lines. Thus, PA exerted a significant increase in cholesterol efflux in Tangier cells. The phosphatidic acid phosphohydrolase (PAPH) inhibitor propranolol (100  $\mu\text{M}$ ) was used to decrease the conversion of PA to DAG. In the presence of apoA-I for 24 hours, propranolol increased cholesterol efflux by 35% in controls ( $10.7\pm 1.44\%$  vs.  $14.3\pm 1.0\%$ ,  $p=0.08$ ), 45% in FHD ( $7.7\pm 0.6\%$  vs.  $11.0\pm 0.5\%$ ,  $p<0.05$ ) and 59% in TD cells ( $2.6\pm 0.6\%$  vs.  $4.3\pm 0.7\%$ ,  $p<0.05$ ) (Figure 6, inset). We also examined the effect of n-butanol, which is used by PLD in a transphosphorylation reaction resulting in decreased formation of PA from PC. To further investigate the hypothesis that PKC activates PLD and subsequently stimulates the production of PA, the cells were stimulated with DOG (150  $\mu\text{M}$ ) as described above with or without n-butanol. In the presence of n-butanol (0.3%), cholesterol efflux stimulated by DOG and apoA-I was reduced by 30% in controls ( $18.0\pm 0.6\%$  vs.  $12.6\pm 0.6\%$ ,  $p=0.001$ ), 39% in FHD ( $6.2\pm 0.3\%$  vs.  $3.7\pm 0.8\%$ ,  $p=0.056$  NS) and 16% in TD cells ( $5.1\pm 0.06\%$  vs.  $4.3\pm 0.15\%$ ,  $p<0.05$ ) at the 12-hours time point (data not shown). We also inhibited the conversion of DAG to PA by diacylglycerol kinase inhibitor II (0.1-10  $\mu\text{M}$ ) and did not find a significant change in cellular cholesterol efflux (data not shown). Taken together, these data strengthen the concept that DOG activated PKC, which in turn activated PC-PLD, producing PA which is required for cellular cholesterol translocation and efflux.



**Figure 6. Phosphatidic acid increased cholesterol efflux in control, FHD and Tangier cells in a dose-dependent fashion (0-150  $\mu\text{mol/L}$ ).** In order to increase PA availability, the same cells were used in the absence (-) or presence (+) of propranolol (100  $\mu\text{M}$ ), to inhibit phosphatidic acid phosphohydrolase. Propranolol increased apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in controls (JGE), FHD (ABE) and Tangier cells (TD) (inset).

We used the PKC antagonist calphostin C (50 nM) in efflux experiments mediated by apoA-I and DOG. As shown in Figure 7, calphostin C caused a marked decrease (-50%;  $p < 0.001$ ) in apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux at 12-hours and an even greater (-70%;  $p < 0.001$ ) decrease in DOG-mediated efflux at 12-hours. The calcium-dependent PKC inhibitor GÖ 6976 (5  $\mu\text{M}$ ) yielded similar results, with an inhibition in apo A-I and DOG-mediated cellular cholesterol efflux of 60% ( $p < 0.001$ ) and 57% ( $p < 0.001$ ) respectively (data not shown). This data lends support to the concept that fibroblasts PKC isoforms are involved in cellular cholesterol efflux. Subsequently, we used the PAPH inhibitor propranolol in the experiments where calphostin C and DOG was used. Cellular cholesterol efflux was partially corrected by propranolol (100  $\mu\text{M}$ ), suggesting that both DAG (an activator of PKC) and PA<sup>32</sup> are generated after apoA-I stimulation and are required for cholesterol efflux.



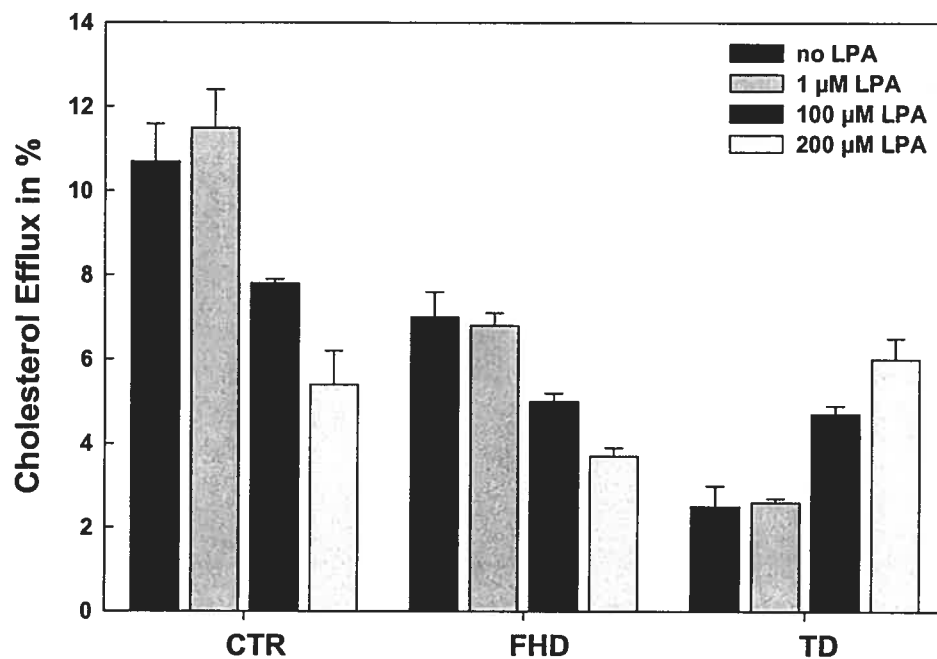
**Figure 7.** 12 hours cholesterol efflux in control cells in the presence of apoA-I (black bars) and apoA-I with DOG (gray bars) with addition of propranolol (150 $\mu$ M), calphostin C (50nM) or both. Calphostin C markedly inhibited apoA-I- and DOG-stimulated cholesterol efflux. This effect was partly reversed by propranolol, suggesting that phosphatidic acid production mediates, at least in part, the efflux pathway.

As PA can be converted in cells to lysophosphatidic acid (LPA) by phospholipase A<sub>2</sub>, or obtained from the action of PLD on lysophosphatidylcholine, the effects of this phospholipid on cellular cholesterol efflux was examined as well. At concentrations between 0 and 200  $\mu$ M LPA, in contrast to PA, showed a reduced cholesterol efflux in control and FHD cell, but not in Tangier cells where efflux was increased in a dose-dependent fashion. At a concentration of 200  $\mu$ M, LPA decreased efflux in control cells by 50% (10.7 $\pm$ 0.9% vs. 5.4 $\pm$ 0.8%,  $p$ <0.05) and in FHD cells by 47% (7.0 $\pm$ 0.6% vs. 3.7 $\pm$ 0.2%,  $p$ <0.05) but increased efflux in TD cells by 140% (2.5 $\pm$  0.5% vs. 6.0 $\pm$  0.5%,  $p$ <0.001) (Figure 8). A similar pattern was observed at the 12 hours-time point (data not shown). These experiments were performed 4 times, with similar results.

When cells were stimulated with DOG, PMA or PA, but without an acceptor particle (apoA-I or HDL<sub>3</sub>) in the culture medium (other than BSA), no significant increase in medium <sup>3</sup>H cholesterol was found.

The effects of lysophosphatidylcholine (LPC) (100  $\mu$ mol/L) was also examined. Because of its strong detergent properties<sup>33</sup>, it is cytolytic at this concentration (data not shown).

We were unable to document a physiologically effect of LPC on cholesterol efflux at the concentration used.



**Figure 8. Lysophosphatidic acid (LPA) decreased apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux significantly in control and FHD cells but increased efflux in cells from TD patients.**

## DISCUSSION

Since its original description in 1961<sup>34, 35</sup>, Tangier disease has been a fascinating lipoprotein disorder. The recent publication of the genetic defect in Tangier disease and familial HDL deficiency<sup>19,20,36-40</sup> has shown that FHD represents a heterozygous form of Tangier disease. Mutations at the ATP binding cassette-1 transporter (ABCA1) gene have been shown to be associated with Tangier disease and FHD. Although the role of ABCA1 is not completely known, it is postulated to act as a transporter of cholesterol and perhaps phospholipids to the plasma membrane, probably from the *trans* Golgi network.

In the present study, we have shown that apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux can be modulated in control, FHD and TD cells. ApoA-I has been shown to mediate PC-PLC and PC-PLD activation, which leads to increased amounts of DAG, which in turn stimulates protein kinase C<sup>26</sup>. We investigated the hypothesis that PKC then activates PLD, resulting in increased amounts of PA, which is necessary for cellular cholesterol efflux. By activating PKC with DOG, PMA or through the addition of PA to the efflux medium, cellular cholesterol efflux can be increased in a dose-dependent fashion. The potential role of PA is further strengthened by the effect of propranolol, a PAPH inhibitor that increases cellular PA concentration (by inhibiting its conversion to DAG) which increases efflux. As there is no commercially available specific inhibitor of PLD, we used n-butanol, which is transphosphatidylated to phosphobutanol (PBut) by PLD. In the presence of primary alcohols, PC-PLD catalyzes a phosphatidyl-transfer reaction, producing phosphatidylalcohols (PBut in the presence of n-butanol), which are not used as substrates for PAPH. When the cells were incubated simultaneously with DOG and n-butanol, efflux was reduced compared to stimulation with DOG only, strongly suggesting that a dual activation of both PLC and PLD occurs after apoA-I stimulation; in addition, PKC can also activate PLD<sup>54</sup>, generating PA which appears to be required for cellular cholesterol efflux. Thus, one likely series of events in the activation of the cholesterol efflux pathway is first the interaction of LpA-I (likely apoA-I-phospholipid discs) with the cell surface and the activation of G-protein-mediated activation of PLC and PLD. The generation of DAG then stimulates protein kinase C which in turn activates PLD to generate PA. Data from Walter and coworkers<sup>26</sup> reveal that pertussis toxin, a G-protein inhibitor, markedly decreases cholesterol efflux. We have shown in the present study that DOG-stimulated PKC activity could increase cholesterol efflux in the presence of propranolol (which increases PA). Conversely, n-



butanol (which decreases PA) decreases cellular cholesterol. When this pathway is inhibited by the PKC antagonist calphostin-C, a marked reduction in DOG-stimulated cellular cholesterol efflux is observed; however, a lesser degree of inhibition occurred in apoA-I-stimulated cells without DOG. Propranolol can, in part, rescue this inhibition (Figure 7). We interpret this data as suggesting that apoA-I activates both PC-PLC and PC-PLD.

In contrast to PA, LPA which is the simplest naturally occurring phospholipid, surprisingly decreased efflux in control and FHD cells, but not in TD cells where an increase in efflux was observed. LPA is known not only as a key intermediate in *de novo* lipid synthesis, but also as an intracellular phospholipid messenger with a wide range of biological activities, such as stimulation of phospholipase C and D, activation of PKC, inhibition of adenylate cyclase, activation of Ras and Rho, and potent  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing stimulation<sup>41-46</sup>. LPA acts through the activation of a specific G protein-coupled receptor<sup>28</sup> which can activate multiple LPA-dependent responses<sup>47</sup>. In the present study, we cannot rule out an intracellular effect of LPA on cellular cholesterol efflux.

The sphingomyelin and phosphatidylcholine data, as well as the cyclodextrin data (Figures 2 and 3) reveal that cholesterol efflux onto multilamellar vesicles (formed by PC and SM) or cyclodextrin is identical in control, FHD and TD cells. This suggests that membrane-associated cholesterol desorbs passively onto phospholipid vesicles and cyclodextrin in a similar fashion in control, FHD and TD cells. In contrast, apoA-I-mediated cholesterol efflux is enhanced in the presence of phospholipids in all three cell lines, correcting the defect in TD at a SM concentration of 100  $\mu\text{M}$  (please note the Y axis scale difference between Figures 2 and 3). The addition of phospholipids into the efflux medium has been shown to increase efflux, most likely by increasing the size of the cholesterol "sink" in the form of vesicles<sup>23</sup>. In fibroblasts approximately 90% of both cholesterol and sphingomyelin has been reported to be in the plasma membrane<sup>48</sup>. This co-localization has been suggested to result from the greater affinity of cholesterol for sphingomyelin compared with other phospholipids<sup>49,50</sup> and favors cholesterol efflux<sup>51,52</sup>. It is also possible that SM contributes to the signal transduction pathway through the action of sphingomyelinase (SMase), resulting in ceramides and sphingosines.

Hydrophobic amines, such as sphingamine, steryl amine and imipramine have been shown to inhibit cholesterol transfer from lysosomes to the plasma membrane<sup>52,53</sup>. Sphingosine, also a hydrophobic amine, has been shown to be a potent inhibitor of PKC in cell systems<sup>34</sup>. Thus, while it is possible that sphingosine acts by inhibiting PKC

activity, its role in increasing cellular translocation to the plasma membrane remains a mechanism to be proven.

Based on these data, we postulate that the ABCA1-mediated cholesterol efflux pathway, shown to be defective in TD and FHD, can either be modulated or bypassed after stimulation by products of phosphatidylcholine hydrolysis, DAG and PA. This raises the possibility that ABCA1 may be a proximal mediator to apoA-I cell interaction in cholesterol efflux or that other pathways of cholesterol movements to the plasma membrane can bypass the ABCA1 pathway. This opens the possibility of increasing the cholesterol efflux cellular pathways for potential therapeutic purposes in ABCA1 defects.

**REFERENCES**

1. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res.* 1984;25:1017-1058.
2. Genest J Jr, Marcil M, Denis M, Yu L: High density lipoproteins in health and in disease. *J Invest Med.* 1999;47:31-42.
3. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB: Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986;256:2835-2838.
4. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977;62:707-714.
5. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y: High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124:Suppl-20.
6. Goldbourt U, Medalie JH: High density lipoprotein cholesterol and incidence of coronary heart disease--the Israeli Ischemic Heart Disease Study. *Am J Epidemiol.* 1979;109:296-308.
7. Genest JJ, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner JL, Silberman SR, Anderson KM, Wilson PW, Salem DN, Schaefer EJ: Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I and B and lipoprotein (a) abnormalities in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:792-802.
8. Barter PJ, Rye KA: High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996;121:1-12.
9. Gaziano JM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Breslow JL, Buring JE: Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:2520-2525.

10. Weber M, McNicoll S, Marcil M, Connelly P, Lussier-Cacan S, Davignon J, Latour Y, Genest JJ: Metabolic factors clustering, lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, lipoprotein (a) and apolipoprotein E phenotypes in premature coronary artery disease in French Canadians. *Can J Cardiol.* 1997;13:253-260.
11. Genest JJ, Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Schaefer EJ: Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1728-1737.
12. Marcil M, Boucher B, Krimbou L, Solymoss BC, Davignon J, Frohlich J, Genest JJ: Severe familial HDL deficiency in French-Canadian kindreds. Clinical, biochemical, and molecular characterization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1015-1024.
13. Marcil M, Yu L, Krimbou L, Boucher B, Oram JF, Cohn JS, Genest JJ: Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:159-169.
14. Walter M. Gerdes U. Seedorf U. Assmann G. The high density lipoprotein- and apolipoprotein A-I-induced mobilization of cellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease subjects. *Biochem Biophys Res Comm* 1994;205:850-6.
15. Francis GA, Knopp RH, Oram JF: Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* 1995;96:78-87.
16. Remaley AT, Schumacher UK, Stonik JA, Farsi BD, Nazih H, Brewer HBJ: Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1813-1821.
17. Eberhart GP, Mendez AJ, Freeman MW: Decreased cholesterol efflux from fibroblasts of a patient without Tangier disease, but with markedly reduced high density lipoprotein cholesterol levels. *J ClinEndocrin Metabol* 1998;83:836-846.
18. Batal R, Tremblay M, Krimbou L, Mamer O, Davignon J, Genest JJ, Cohn JS: Familial HDL deficiency characterized by hypercatabolism of mature apoA-I but not proapoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:655-664.

19. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HOF, Loubser O, Ouelette BFF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJD, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJP, Genest J Jr, Hayden MR. Mutations in *ABC1* in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genet.* 1999;22:336-345.
20. Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee S, Roomp K, Zhang LH, Zhang LH, Collins J, Loubser O, Ouellette BFF, Sensen CW, Fichter K, Yu L, Mott S, Denis M, Martindale D, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJP, Genest J Jr., Hayden MR. Familial HDL Deficiency with defective cholesterol efflux is caused by mutations in the *ABC1* gene (*CERP*). *The Lancet* 1999, *Lancet* 1999;354:1341-46.
21. Higgins CF: The ABC of channel regulation. *Cell* 1995;82:693-696.
22. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani M-F, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter-1 (*hABC1*): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 1999;257:29-33.
23. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC: Cell cholesterol efflux. Integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res.* 1999;40:781-796.
24. Mendez AJ: Monensin and brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. Implications for intracellular cholesterol transport. *J Biol Chem.* 1995;270:5891-5900.
25. Fidge NH: High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res.* 1999;40:187-201.
26. Walter M, Reinecke H, Gerdes U, Nofer JR, Hobbel G, Seedorf U, Assmann G: Defective regulation of phosphatidylcholine-specific phospholipases C and D in a kindred with Tangier disease. Evidence for the involvement of phosphatidylcholine breakdown in HDL-mediated cholesterol efflux mechanisms. *J Clin Invest.* 1996;98:2315-2323.

27. Mott S, Yu L, Marcil M, Boucher B, Rondeau C, Genest Jr. Decreased Cellular Cholesterol Efflux is a Common Cause of Familial Hypoalphalipoproteinemia; Role of the ABC1/CERP Gene Mutations.. *Atherosclerosis*. In Press.
28. An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ: Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:619-622.
29. Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193, 265-275.
30. Mendez AJ, Oram JF, Bierman EL: Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol Chem*. 1991;266:10104-10111.
31. Mendez AJ, Oram JF, Bierman EL: Role of the protein kinase C signaling pathway in high-density lipoprotein receptor-mediated efflux of intracellular cholesterol. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1991;104:48-53.
32. Drobnik, W., Mollers, C., Resink, T., Schmitz, G., Activation of phosphatidyl-specific phospholipase C in response to HDL3 and LDL is markedly reduced in cultured fibroblasts from patients. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1369-33.
33. Chen Y, Morimoto S, Kitano S, Koh E, Fukuo K, Jiang B, Chen S, Yasuda O, Hirotsu A, Ogihara T. Lysophosphatidylcholine causes  $Ca^{++}$  influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells. *Atheroscler* 1995;112:69-76.
34. Fredrickson DS, Altrocchi PH, Avioli LV, Goodman DS, Goodman HC. Tangier disease. *Ann Intern Med* 1961;55:1016-1031.
35. Assmann G, von Eckardstein A, Brewer HB Jr. Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1995;2053-2072.

36. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Sielhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999;104 :R25-31.
37. Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffe P, Brewer HB Jr. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) : genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96 :12685-90.
38. Freeman MW. Effluxed lipids: Tangier Island's latest export. *PNAS* 1999 96: 10950-10952.
39. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JR, Deleuze JS, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier Disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genet.* 1999; 22:352-355.
40. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buckler C, Porsch-Ozcurunез M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KS, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genet.* 1999; 22:347-351.
41. Jalink K, Hordijk PL, Moolenaar WH: Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:185-196.
42. Moolenaar WH: Lysophosphatidic acid signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7:203-210.
43. Moolenaar WH: Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem.* 1995;270:12949-12952.
44. Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR, Zondag GC: Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:168-173.

45. van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH: Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 1989;59:45-54.
46. Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH: Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca<sup>2+</sup>(+)- mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem*. 1990;265:12232-12239.
47. Fukushima N, Kimura Y, Chun J: A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:6151-6156.
48. Slotte JP, Hedstrom G, Rannstrom S, Ekman S: Effects of sphingomyelin degradation on cell cholesterol oxidizability and steady-state distribution between the cell surface and the cell interior. *Biochim Biophys Acta* 1989;985:90-96.
49. Demel RA, Jansen JW, van Dijck PW, van Deenen LL: The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1977;465:1-10.
50. Lund-Katz S, Laboda HM, McLean LR, Phillips MC: Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry* 1988;27:3416-3423.
51. Zhao Y, Sparks DL, Marcel YL: Effect of the apolipoprotein A-I and surface lipid composition of reconstituted discoidal HDL on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *Biochemistry* 1996;35:16510-16518.
52. Zhao Y, Sparks DL, Marcel YL: Specific phospholipid association with apolipoprotein A-I stimulates cholesterol efflux from human fibroblasts. Studies with reconstituted sonicated lipoproteins. *J Biol Chem*. 1996;271:25145-25151.
53. Liscum L, Faust JR: The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3- beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem*. 1989;264:11796-11806.



54. Exton JH. Regulation of phospholipase D. *Biochem Biophys Acta* 1999;1439:121-133

## Chapitre 4: Article 2

### **Cyclic AMP Induces ABCA1 Phosphorylation Activity and Promotes Cholesterol Efflux from Fibroblasts**

**Bassam Haidar<sup>1,2</sup>, Maxime Denis<sup>1,2</sup>, Larbi Krimbou<sup>1</sup>, Michel Marcil<sup>1</sup>, Jacques Genest Jr.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Cardiovascular Genetics Laboratory, McGill University Health Centre, Royal Victoria Hospital, Montréal, QC H3A 1A1 and <sup>2</sup> Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

This work was supported by grants MOP 15042 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and grant DOP 40845 from the CIHR Rx&D program; with an unrestricted grant generously provided by Pfizer Pharmaceutical, Ann Arbor, Michigan, as part of the CIHR-Industry Grant Program. J. Genest is the recipient of the McGill-Novartis/CIHR Chair in Medicine at McGill University.

Running title: *cAMP modulates cholesterol efflux by ABCA1 protein phosphorylation*

Publié : J Lipid Res. 2002 Dec;43(12):2087-94.

**ABSTRACT**

ABCA1 plays a crucial role in active apolipoprotein A-I (apoA-I) lipidation, a key step in reverse cholesterol transport (RCT). It has been documented that cyclic AMP (cAMP) induces apoA-I binding activity and promotes cellular cholesterol efflux. In the present study we investigated the role of cAMP / protein kinase A (PKA)-dependent pathway in the regulation of cellular cholesterol efflux. Treatment of normal intact fibroblasts with 8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP) increased significantly apoA-I-mediated cholesterol efflux. The effect of 8-Br-cAMP on cholesterol efflux exhibited specificity for apoA-I, but not for cyclodextrin (CDX). On the other hand, 8-Br-cAMP increased ABCA1 phosphorylation in a time-dependent manner. Maximum phosphorylation was reached in less than 10 min representing a 260% increase compared to basal ABCA1 phosphorylation level in untreated cells. Forskolin (FRK) known as cAMP regulator increased both cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation. In contrast, H-89 PKA inhibitor reduced cellular cholesterol efflux by 70% in a dose-dependent manner and inhibits almost completely ABCA1 phosphorylation. To determine whether naturally occurring mutants of ABCA1 may affect its phosphorylation activity, fibroblasts from subjects with Familial HDL Deficiency (FHD, heterozygous ABCA1 defect) and Tangier Disease (TD, homozygous / compound heterozygous ABCA1 defect) were treated with 8-Br-cAMP or FRK. Cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation were increased in FHD but not in TD cells. Taken together, these findings provide evidence for the link between cAMP / PKA-dependent pathway, ABCA1 phosphorylation and apoA-I mediated cellular cholesterol efflux. This process might play *in vivo* a key functional role in the activation of ABCA1 by increasing its phosphorylation, allowing cholesterol to bound free apoA-I.

**Keywords:** ApoA-I, ABCA1, cholesterol efflux, HDL, PKA, cAMP, phosphorylation

**ABBREVIATIONS**

ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; ACAT, acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase; apoA-I, apolipoprotein A-I; BSA, bovine serum albumin; cAMP, cyclic AMP; CDX, cyclodextrin; CE, cholesteryl ester; CTR, normal control; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FC, free cholesterol; FHD, Familial HDL Deficiency; FRK, forskolin; HDL, high density lipoprotein; NBF, nucleotide binding folds; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PAGGE, polyacrylamide gradient gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; PKA, protein kinase A; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris-buffered saline; TD, Tangier Disease; 8-Br-cAMP, 8-bromo-cAMP; 9-CRA, 9-cis retinoic acid; 22-OH chol, 22-hydroxycholesterol.

## INTRODUCTION

The importance of ABCA1 in reverse cholesterol transport (RCT) process has been strikingly demonstrated by the identification of mutations in ABCA1 gene locus as the molecular defect of Tangier Disease (TD) and Familial HDL Deficiency (FHD) (1,2). Those patients were characterized by extremely low HDL levels, caused by inadequate transport of cellular cholesterol and phospholipids to the extracellular space, leading to hypercatabolism of lipid-poor nascent HDL particles (3). Thus, factors affecting the structure, activity, or concentration of ABCA1 are likely to affect the homeostasis of plasma HDL cholesterol and the RCT process, one of several proposed mechanisms (4) by which HDL may protect against atherosclerosis.

ABCA1 is a 240 kDa protein belonging to a large family of conserved transmembrane proteins that transport a wide variety of substrates, including ions, drugs, peptides, and lipid across cell membranes (5). ABC transporters have been associated with many diseases such drug-resistant cancer (6), diabetes (7), and cystic fibrosis (8), making these proteins potential targets for therapeutic intervention (9). The ABCA1 gene product is a member of the superfamily of ATP binding cassette transporters predicted to contain 12 transmembrane spanning domains and two nucleotide binding folds (NBF) responsible for the degradation of ATP to provide the energy required for the transport activity (10). The NBF domains contain the highly conserved phosphate-binding loop (11) that forms intimate contacts with the  $\beta$ - and  $\gamma$ -phosphates of bound ATP (12). In some cases, evidence has been provided for a further regulation via phosphorylation of serine / threonine residues in the NBF region (13).

The interaction between apoA-I and ABCA1 is of critical importance for the active apoA-I lipidation, but the structural and functional pathways involved in this process have not been established. Of interest, the earlier attractive concept of Smith *et al.* (14) suggested that cAMP induces a membrane apolipoprotein receptor that does not lead to endocytosis and degradation, but instead promotes the transfer of lipids to apolipoprotein. The same group had also reported later that cAMP-mediated cholesterol efflux to apoA-I is associated with the binding, uptake, and resecretion of apoA-I in a calcium-dependent pathway in murine macrophages (15). cAMP effect on ABCA1 mRNA and protein appears to be specific to macrophages and is not seen with a number of other cell types (16). Moreover, it has been documented that cAMP induces apoA-I binding activity and promotes cellular cholesterol efflux via ABCA1 protein in macrophages (17). On the other hand, treatment of immortalized fibroblasts with cAMP

analog also induces apoA-I-mediated lipid efflux and ABCA1 expression, but these effects are usually modest and require some cholesterol loading of cells (18,19). We have previously shown that phospholipid breakdown products, mediated by phospholipase C and D, and the activation of protein kinase C modulate cellular cholesterol efflux (20).

The involvement of apoA-I in cellular signaling process and its property to induce cellular cholesterol efflux via its interaction with ABCA1 led us to hypothesize that cAMP / PKA-dependent pathway may modulate cellular cholesterol efflux via activation of ABCA1 by inducing its phosphorylation. The present study aims at providing evidence for links between apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux, cAMP, PKA and ABCA1 phosphorylation, and to examine how these interactions could be affected by cAMP regulator, PKA inhibitor, or naturally occurring mutants of ABCA1 protein.

## METHODS

*Patient selection* — Patients with Familial HDL Deficiency (FHD) and Tangier Disease (TD) were selected as previously described (1,2,21,22). All these subjects carry a mutation at the ABCA1 gene locus or had clinical signs of TD. For the present study, we selected fibroblasts from 2 normal control subjects (CTR1-2), 5 patients with FHD (FHD1-5) and 3 patients with TD (TD1-3). Cellular studies in all TD subjects revealed a marked impairment of apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux. Molecular analysis of ABCA1 gene revealed a compound heterozygous state for subject TD1 and TD3 and a homozygous missense point mutation in subject TD2. The protocol for the study was reviewed and accepted by the Research Ethics Board of the McGill University Health Center. Separate consent forms for blood sampling, DNA isolation and skin biopsy were provided.

*Cell culture* — Human skin fibroblasts were obtained from 3.0 mm punch biopsies of the forearm of patients and healthy control subjects and were cultured as described (21). We seeded  $5 \times 10^4$  cells in 35 mm cell culture wells in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 0.1% nonessential amino acids, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL) and 10% fetal bovine serum (FBS). At approximately 50% confluence, 0.2 or 1  $\mu$ Ci/mL  $^3$ H-cholesterol was added in the cell medium. When the cells reached confluence, they were washed three times in phosphate buffered saline (PBS) containing 1 mg/mL of fatty acid free bovine serum albumin (BSA) and the medium was replaced by DMEM containing 2 mg/mL BSA and 20  $\mu$ g/mL of free non lipoprotein cholesterol for 24 hours. Cellular cholesterol pools were allowed to equilibrate for another 24 hours in DMEM containing 1 mg/mL BSA. Efflux studies (0-24 hours) were then performed in DMEM containing 1 mg/mL BSA and 10  $\mu$ g/mL apoA-I in the presence or absence of specified efflux modulating signaling molecules.

*Cellular cholesterol efflux determination* — ApoA-I-mediated cholesterol efflux was carried out on the 10 cell lines; as control, BSA (1 mg/mL) only was used in the efflux medium. All experiments were performed in triplicate and efflux was determined specifically at 24 h. In some experiments, cells were treated with 8-Br-cAMP as described previously (19) with minor modifications. Briefly, the cells received 0.5 mM 8-Br-cAMP during 24 h pretreatment and during efflux time incubation. At the end time, cells were chilled on ice and the medium was collected. To precipitate any floating cells,

the medium was centrifuged for 10 min at 2500 rpm. The cell layer was dissolved overnight in 0.1N NaOH at 4°C. Cellular protein concentration was determined by the Lowry method (23) and one aliquot was reserved for scintillation counting of cellular <sup>3</sup>H-cholesterol content. Cellular cholesterol efflux was determined as follow: <sup>3</sup>H cpm in medium / (<sup>3</sup>H cpm in medium + <sup>3</sup>H cpm in cells); the results were expressed as % of total radiolabeled cholesterol.

*Cholesteryl ester hydrolysis* — The rate of cholesteryl ester hydrolysis was determined by radioisotopic labeling using <sup>3</sup>H-cholesterol. At 50% confluence, fibroblasts were radiolabeled with <sup>3</sup>H-cholesterol for 48 hours then loaded with free cholesterol for an additional 24 hours at 37°C as described above. An acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor, avasimibe 10 μM (provided by Pfizer Pharmaceutical, Ann Arbor, USA) and 0.5 mM 8-Br-cAMP (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA) were added to the equilibration medium supplemented with 1 mg/mL of BSA at 0 h. At subsequent indicated times the cells were washed with PBS and extracted for both lipids and proteins. Cell lipids were extracted with hexane/isopropanol (3:2, v/v) at room temperature for 30 minutes, followed by a wash with another 0.5 mL of solvent. Protein in the lipid-free wells was extracted with 0.5 mL of 0.1N NaOH for 30 minutes at room temperature and measured by Lowry method. Lipid extracts were dried under N<sub>2</sub> stream then resuspended in 25 μL of chloroform and plated onto LK6D silica gel 60 TLC plates. Free cholesterol (FC) and cholesteryl ester (CE) were separated from other lipids using heptane/ethyl ether/methanol/acetic acid 80:30:3:1.5 (v/v/v/v) as the solvent system and visualized with I<sub>2</sub>. The FC and CE bands were scraped, and radioactivity was measured by liquid scintillation counting.

*ApoA-I preparation* — HDL was isolated from fresh plasma of normolipidemic donors using a standard sequential ultracentrifugation with density (1.125-1.210 g/mL) adjusted with KBr. The HDL preparation was delipidated in acetone:ethanol (1:1) and total proteins were fractionated at 4°C on two Sephacryl S-200 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) columns (2.6 x 100 cm). Fractions contained in the apoA-I peak were extensively dialyzed in 0.01 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, then lyophilized and resuspended in PBS at concentration of 1 mg/mL. Protein purity was assayed by PAGE on each apoA-I fraction and appropriate fractions were pooled, dialyzed in PBS and lyophilized before being stored at -70°C as stock.



*Probes and Northern blots* — A 517 pb probe for human ABCA1 and mouse ABCA1 were prepared by reverse transcription performed on total RNA extracted from normal human skin fibroblast and from J774 mouse macrophages. This was followed by a PCR step using the forward primer 5'-CCTTGGGTTTCAGGGGATTAT-3' and the reverse primer 5'-AGGATTGGCTT CTTCAGGATGTCC-3'. The amplified fragment was subcloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI) and used to transform JM109 cells, then sequenced to ensure the right sequence. After digestion of the subcloned product with Sal I and Sac II, the insert was extracted from agarose gel and <sup>32</sup>P-labeled using the Amersham / Pharmacia Oligolabeling kit. The probe was used at concentration of 10<sup>6</sup> cpm/mL in Northern blots. Ten to fifteen micrograms / lane of the total cell RNA were loaded on a 1% formaldehyde-containing agarose gel and transferred to a Hybond N+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) membrane for probing. Bands were revealed on a Typhoon phosphorimager (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA).

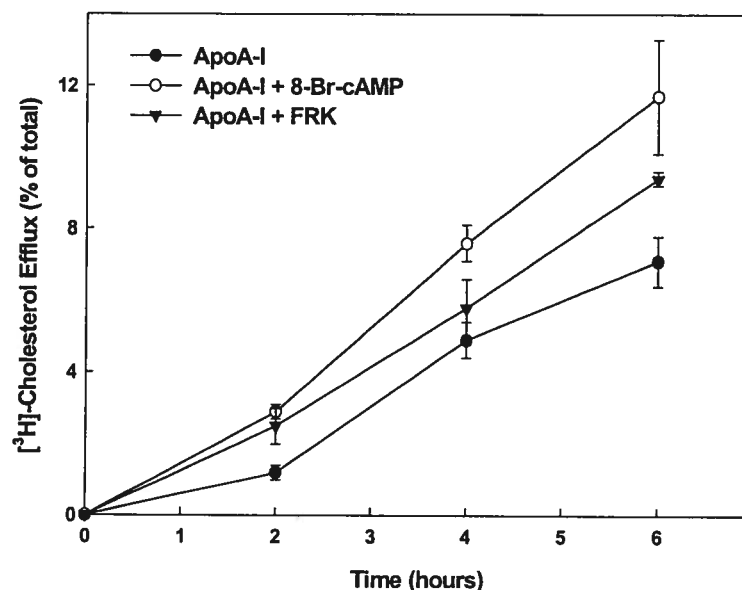
*ABCA1 phosphorylation and immunoprecipitation (IP) procedures* — Confluent fibroblasts were loaded with free cholesterol (20 µg/mL) for 24 hours, washed twice in MEM-free phosphate solution (Invitrogen, Burlington, ON) and incubated with 0.5 mCi/mL of <sup>32</sup>P-labeled orthophosphate for 2 h at 37°C. The cells were washed twice in MEM-free phosphate solution and then treated or not with 1 mM 8-Br-cAMP for varying periods of time as indicated in figures. Cells were also treated with forskolin (FRK) as specified for each experiment. At indicated time, the cells were washed twice with ice-cold PBS and scraped into 0.5 mL of IP buffer containing 20 mM Tris (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton-X 100 (Invitrogen, Burlington, ON) and the suspension was allowed to stand for 30 min at 4°C in presence of a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Cellular debris were removed by centrifugation at 100 x g for 10 min at 4°C. Protein was estimated by BCA protein assay reagent (Pierce, Canada) according to the protocol from manufacturer using bovine serum albumin as standard. Cell lysate (150 µg) was cleared of cellular debris by incubation with 20 µl of a 1:1 slurry of protein-A sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) and IP buffer for 45 min on a rotating platform at 4°C. Non-specific proteins were separated by centrifugation at 750 x g for 1 min. The cell lysate was then incubated overnight at 4°C with 3 µg of anti-ABCA1 antibody (AETSDGTL PAP) directed to the intracytoplasmic domain of amino acid residues 1201-1211 of the human ABCA1 gene (Novus Biologicals, Littleton, CO). After addition of

slurry of 20  $\mu$ L protein-A sepharose the cell lysate was incubated for an additional 2 h. Immunoprecipitates were centrifuged at 750 x g for 1 min, and washed three times with IP buffer solution, and then boiled for 15 min in a sample buffer containing 0.3 M Tris (pH 6.8), 5% SDS, 50% glycerol, 0.125 % bromophenol blue and 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. The supernatants were collected by centrifugation at 750 x g for 2 min. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P polyvinylidene difluoride membrane (PVDF-membrane) (Millipore, Nepean, ON) at 45 V overnight. Bands representing phosphorylated ABCA1 were revealed on a Typhoon phosphorimager (Molecular Dynamics). For protein loading control, the same membranes were rinsed with TBS containing 0.05% Tween 20 (TBST) and blocked with TBST containing non-fat dry milk for 1 h at 25 °C. Blots were then incubated overnight at 4°C with primary ABCA1 antibody diluted in TBST (1:100) containing 3% BSA and rinsed with TBST containing 1% dry milk for 5 min at 25°C. Finally, blots were incubated for 1 h at 25°C with donkey anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) diluted in TBST containing 1% dry milk and rinsed with TBST for 5 min. Bands were revealed by enhanced chemiluminescence substrate for horseradish peroxidase (Pierce, Rockford, IL).

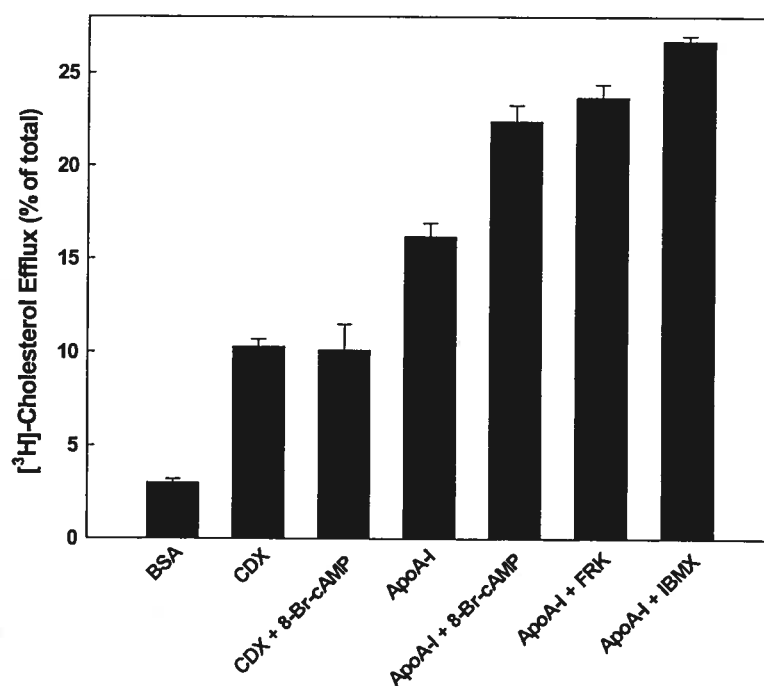
## RESULTS

In the present study we demonstrate that treatment of intact normal fibroblasts with 8-Br-cAMP (0.5 mM) increased apoA-I-mediated cellular efflux by 142%, 55% and 65% at 2, 4 and 6 h incubation periods, respectively, as shown in Fig. 1A. We observed also a significant increase in apoA-I-mediated phospholipid efflux in presence of 8-Br-cAMP (data not shown). To determine whether this effect of cAMP is not due to passive diffusion of cellular cholesterol, we examined the cellular cholesterol efflux into cyclodextrin (CDX, 1mM). We found that 8-Br-cAMP did not affect CDX-mediated cholesterol efflux, as shown in Fig. 1B. Control experiments were performed to probe the specificity of apoA-I and 8-Br-cAMP response. We demonstrate that FRK (5  $\mu$ M), an activator of adenylate cyclase, and IBMX (1 mM), a phosphodiesterase inhibitor known as cAMP regulator, were as effective as 8-Br-cAMP (0.5 mM) in promoting apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in normal cells (Fig. 1A,B). Effect of 8-Br-cAMP on cellular cholesterol efflux was shown to be stable and was essentially unchanged over 24 h. Based on these experiments all cellular cholesterol efflux analysis were made at 24 h.

A

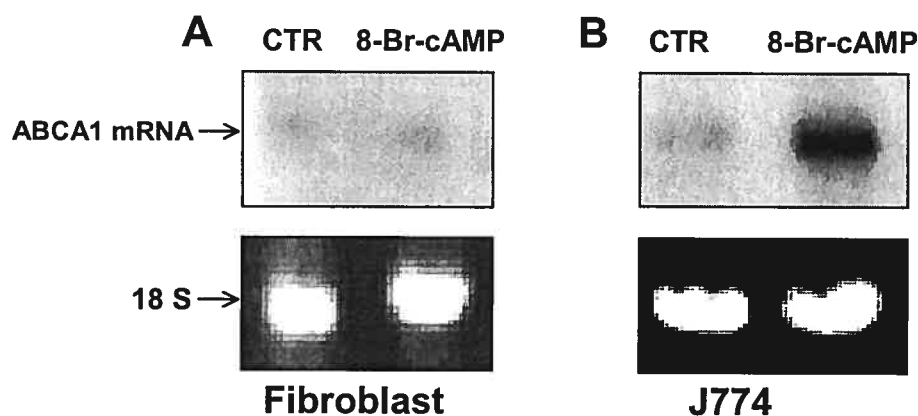


B



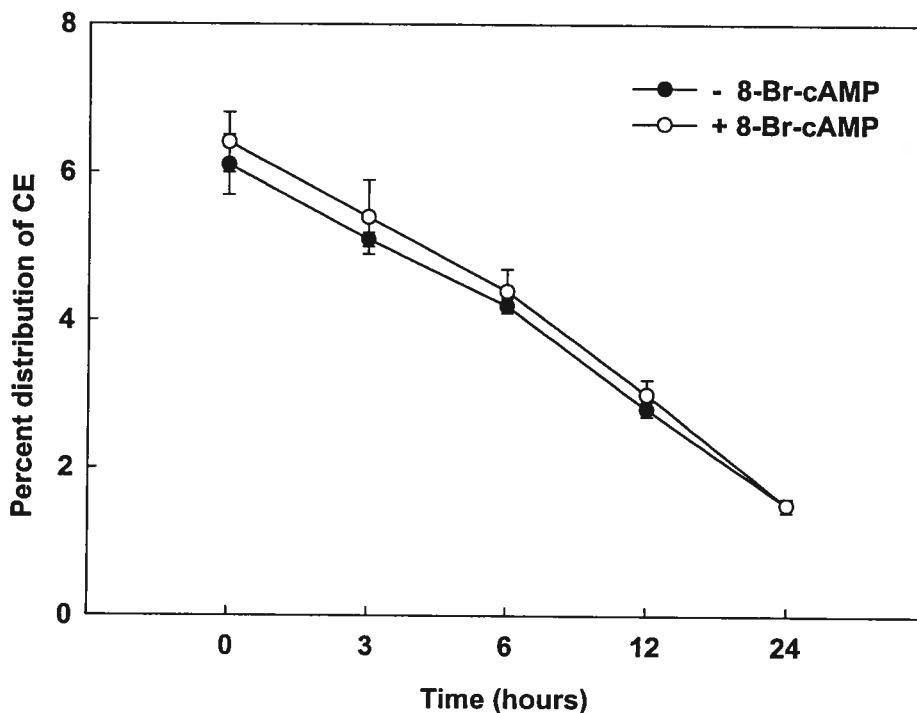
**Figure 1. Effect 8-Br-cAMP or cAMP regulator on apoA-I and cyclodextrin-mediated cellular cholesterol efflux. Panel A:** normal control fibroblasts were cholesterol-loaded and  $^3\text{H}$ -cholesterol-labeled, as described in Methods. Cells were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apoA-I alone or in the presence of 0.5 mM 8-Br-cAMP, 5  $\mu\text{M}$  FRK or 1mM IBMX. After 2, 4 and 6 h incubations, radioactivity in the medium and in the cells was determined. Cholesterol efflux is presented as the percent of total radioactivity recovered from the cells and the medium, and represents the mean  $\pm$  S.D. from triplicate wells. **Panel B:** normal control fibroblasts were cholesterol-loaded and  $^3\text{H}$ -cholesterol-labeled. Cells were incubated with 1 mM cyclodextrin (CDX) or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apoA-I in the presence or absence of 0.5 mM 8-Br-cAMP, 5  $\mu\text{M}$  FRK and 1mM IBMX. After 24 h incubation, cholesterol efflux was determined as in A. One experiment, representative of three, is shown.

We tested in normal cells whether the increase in apoA-I-mediated cholesterol efflux induced by 8-Br-cAMP was associated with changes in cellular ABCA1 mRNA. Human skin fibroblasts were incubated for 24 h with 8-Br-cAMP (0.5 mM). There was no effect of cAMP on ABCA1 mRNA levels in fibroblasts (Fig. 2A). However, 8-Br-cAMP increased dramatically ABCA1 mRNA in J774 mouse peritoneal macrophages used as control in this experiment (Fig. 2B).



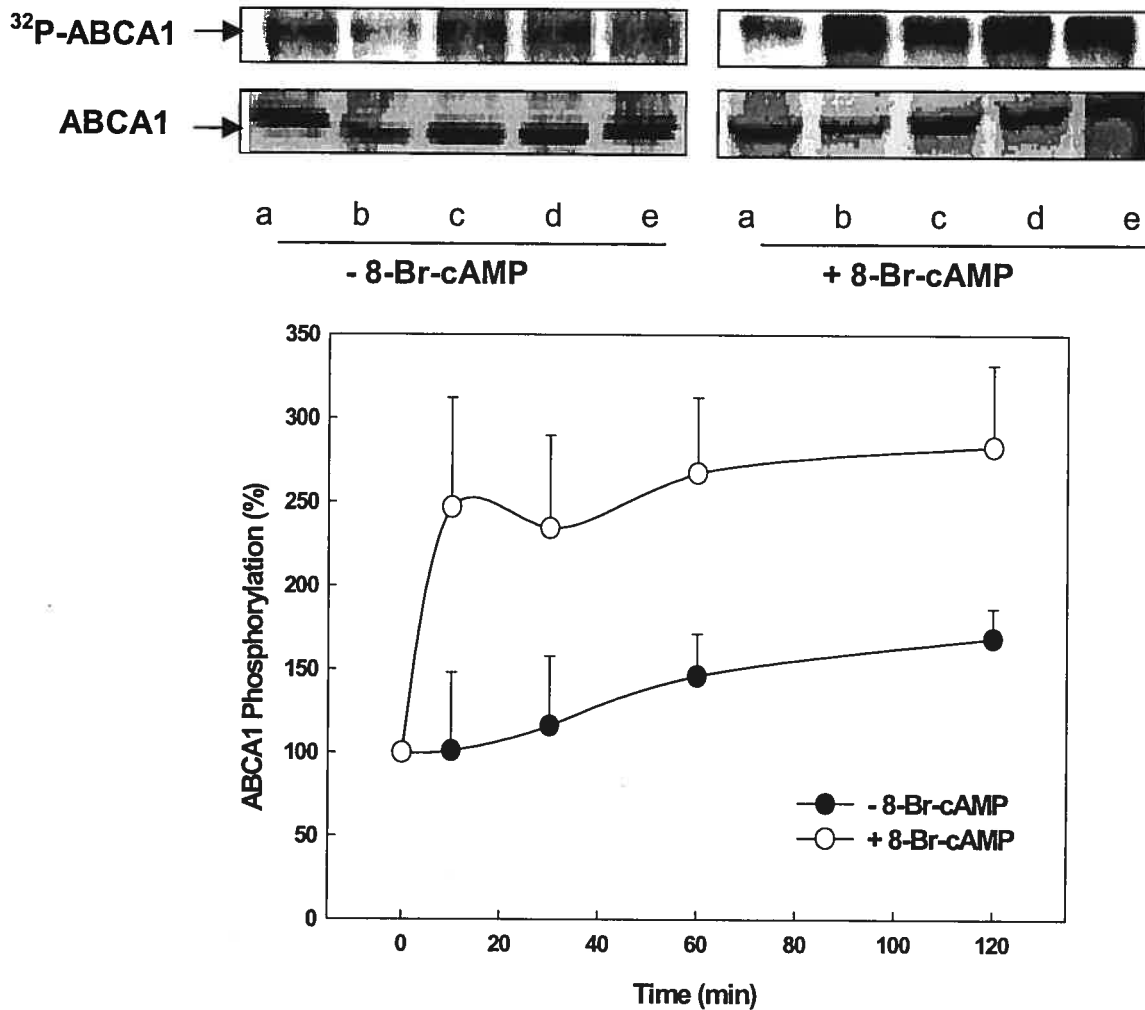
**Figure 2. Effect of 8-Br-cAMP on ABCA1 mRNA expression in normal control fibroblasts and J774 cells.** Panel A: normal fibroblasts were incubated in presence or absence of 1 mM 8-Br-cAMP for 24 h and then harvested. Total RNA was isolated and 15  $\mu$ g were loaded per lane on agarose gel. After transfer, the blot was probed with human ABCA1 cDNA, as described in Methods. Panel B: J774 cells were incubated in presence or absence of 1 mM 8-Br-cAMP for 24 h and then harvested. Northern blots were incubated with a murine ABCA1 cDNA probe. J774 cells were used as control in this experiment.

Previous studies showed that cAMP could stimulate neutral cholesteryl ester hydrolase activity in some cell types (24). In order to test the hypothesis that apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux stimulation by 8-Br-cAMP was not dependent on an increased cholesteryl ester (CE) turnover and free cholesterol availability, normal control fibroblasts were cholesterol-loaded and [ $^3$ H]-cholesterol-labeled, as described in Methods. 0.5 mM 8-Br-cAMP and 10  $\mu$ M avasimibe, an ACAT inhibitor, were added at 0 hours as indicated by vertical arrow (Fig. 3). At subsequent times the rate of CE was decreased due to the presence of the ACAT inhibitor. Cellular radiolabeled CE content was determined in each time point by TLC. The addition of 8-Br-cAMP had no effect on the hydrolysis of radiolabeled esterified cholesterol (Fig. 3).



**Figure 3. Effect of 8-Br-cAMP on cholesteryl ester (CE) hydrolysis.** Normal control fibroblasts were cholesterol-loaded and [ $^3\text{H}$ ]-cholesterol-labeled, as described in Methods. 0.5 mM 8-Br-cAMP and 10  $\mu\text{M}$  avasimibe, an ACAT inhibitor, were added at 0 h as indicated by vertical arrow in panel. Cellular radiolabeled CE content was determined in each time point by TLC. Results were expressed as percentage of control at 0 h (100%), and represent the mean  $\pm$  S.D. from triplicate wells.

In order to establish the relationship of cAMP / PKA-dependent pathway with ABCA1 phosphorylation activity, ABCA1 was phosphorylated in intact cells using  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate, and then immunoprecipitated with anti-ABCA1 antibody, as described in Methods. The specificity of ABCA1-antibody was assessed by immunoprecipitation of [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine labeled-ABCA1, which show a molecular mass of  $\sim 250$  kDa, and was induced by both hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid (data not shown). The phosphorylation of ABCA1 was investigated by treatment of normal cells with 8-Br-cAMP for varying periods of time and untreated cells were used as control for each periods of time. Phosphorylated ABCA1 was immunoprecipitated, and then separated by SDS-PAGE (4-12.5%) gel. Gels were transferred to PVDF-ImmobilonP membrane.  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was detected by phosphorimager, and then the same membrane was revealed for ABCA1 protein by anti-ABCA1 antibody, as described in Methods. As shown in Fig. 4, treatment of normal intact fibroblasts with 8-Br-cAMP increased ABCA1 phosphorylation in a time-dependent manner.



**Figure 4. Time-dependent phosphorylation of ABCA1 in presence or absence of 8-Br-cAMP.** Normal intact fibroblasts were incubated with  $^{32}\text{P}$ -labeled orthophosphate for 2h, and then treated or not with 1 mM 8-Br-cAMP for varying periods of time (0, 10, 30, 60, 120 min; lanes a to e).  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was immunoprecipitated and separated by electrophoresis, and then transferred to PVDF-membrane as described in Methods.  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was revealed and quantified by phosphorimager. Percent increase of  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 from three different experiments from the same cells was presented. Plotted values are mean  $\pm$  S.D. of triplicate values (lower panel). ABCA1 protein were detected in the same membrane by anti-ABCA1 antibody and used as control for protein loading.  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 was not normalized to ABCA1 mass protein. One experiment, representative of three, is shown in the upper panel.

Maximum phosphorylation was reached in less than 10 min, representing a 260% increase compared to basal phosphorylation level of ABCA1 in untreated cells, and remained constant for the remaining 120 min of the experiment.  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was quantified by phosphorimager. Percent increase of  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 from three different

experiments from the same cell lines was presented (Fig. 4, lower panel). One experiment, representative of three different experiments, is shown in the upper panel of Fig. 4.

In order to provide evidence for a specific role of PKA in apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux process and ABCA1 phosphorylation activity, we examined the effect of H-89 PKA inhibitor on cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation. Treatment of normal intact cells with 20  $\mu$ M H-89 decreased significantly basal apoA-I-mediated cholesterol efflux level in the absence of 8-Br-cAMP (Fig. 5A) and also basal ABCA1 phosphorylation level (data not shown). In addition, H-89 reduced cellular cholesterol efflux by 70% in a dose-dependent manner in the presence of 1 mM 8-Br-cAMP (Fig. 5B). On the other hand, H-89 inhibits almost completely in a dose dependent manner ABCA1 phosphorylation (0, 5, 10, 20  $\mu$ M; lanes a to d), as shown in the inset of Fig. 5B. Interestingly, we observed that inhibition of the serine / threonine phosphatases by okadaic acid increased the phosphorylation of ABCA1 in normal cells (data not shown).

To determine whether naturally occurring mutants of ABCA1 may affect cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation activity, fibroblasts from subjects with Familial HDL Deficiency (FHD) and Tangier Disease (TD) (Table I) were treated with 8-Br-cAMP or FRK. Cellular cholesterol efflux was increased in control, FHD but not in TD cells (Fig. 6A) in response to 8-Br-cAMP treatment. Furthermore, cells from a normal control (CTR1), FHD (FHD4) and TD (TD1) subjects (Table I) were incubated with  $^{32}$ P-orthophosphate in the presence or absence of 8-Br-cAMP (1 mM). As shown in Fig. 6B (upper panel), ABCA1 phosphorylation was increased in control and FHD cells, compared to basal phosphorylation levels in the absence of 8-Br-cAMP. However, under the same condition ABCA1 from TD1 cells shows no further phosphorylation over baseline. Control experiment was performed to verify 8-Br-cAMP response. We demonstrated that FRK (5  $\mu$ M) was effective as 8-Br-cAMP (0.5 mM) in inducing ABCA1 phosphorylation in control and FHD, but not in TD cells (Fig. 6B, lower panel).

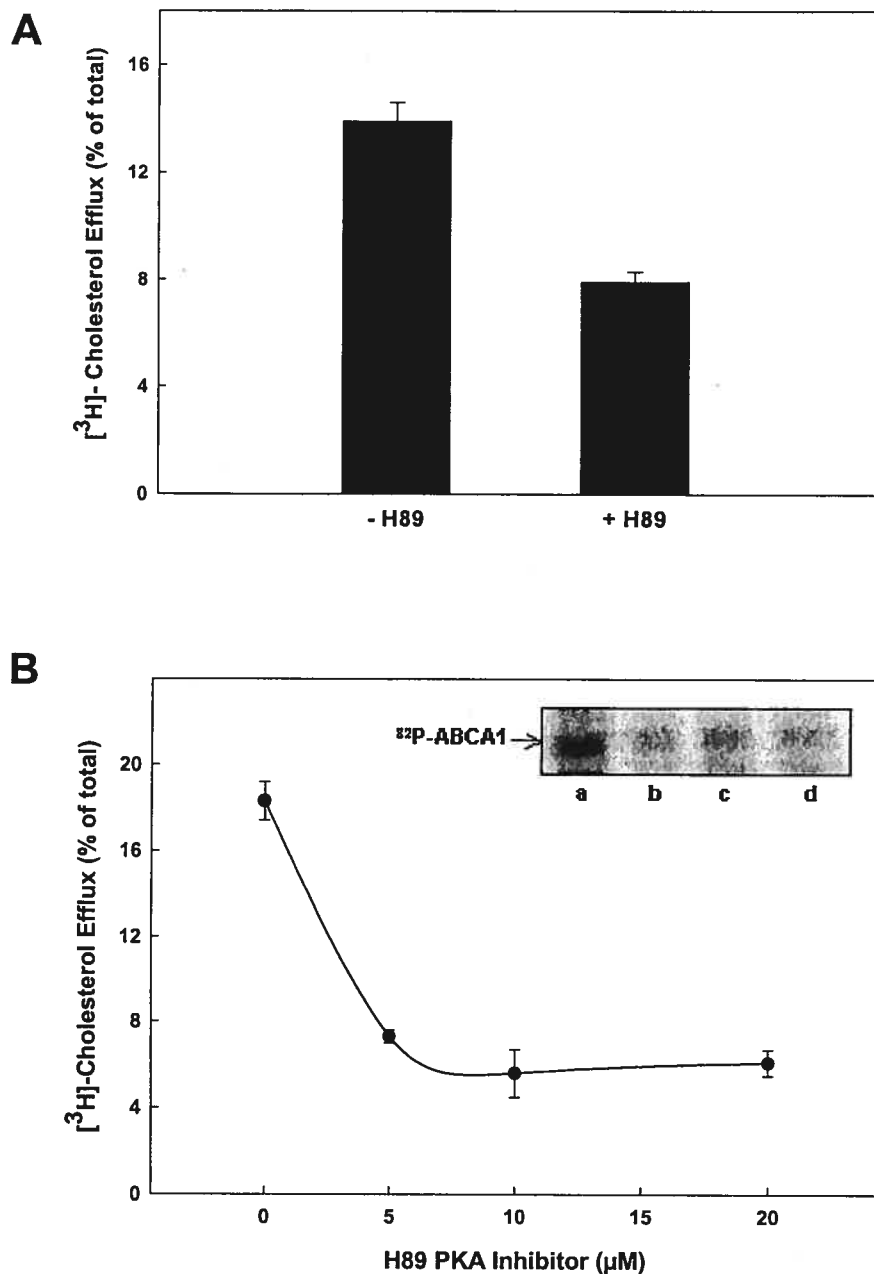


**Table I. Molecular characterization of ABCA1 gene in study subjects**

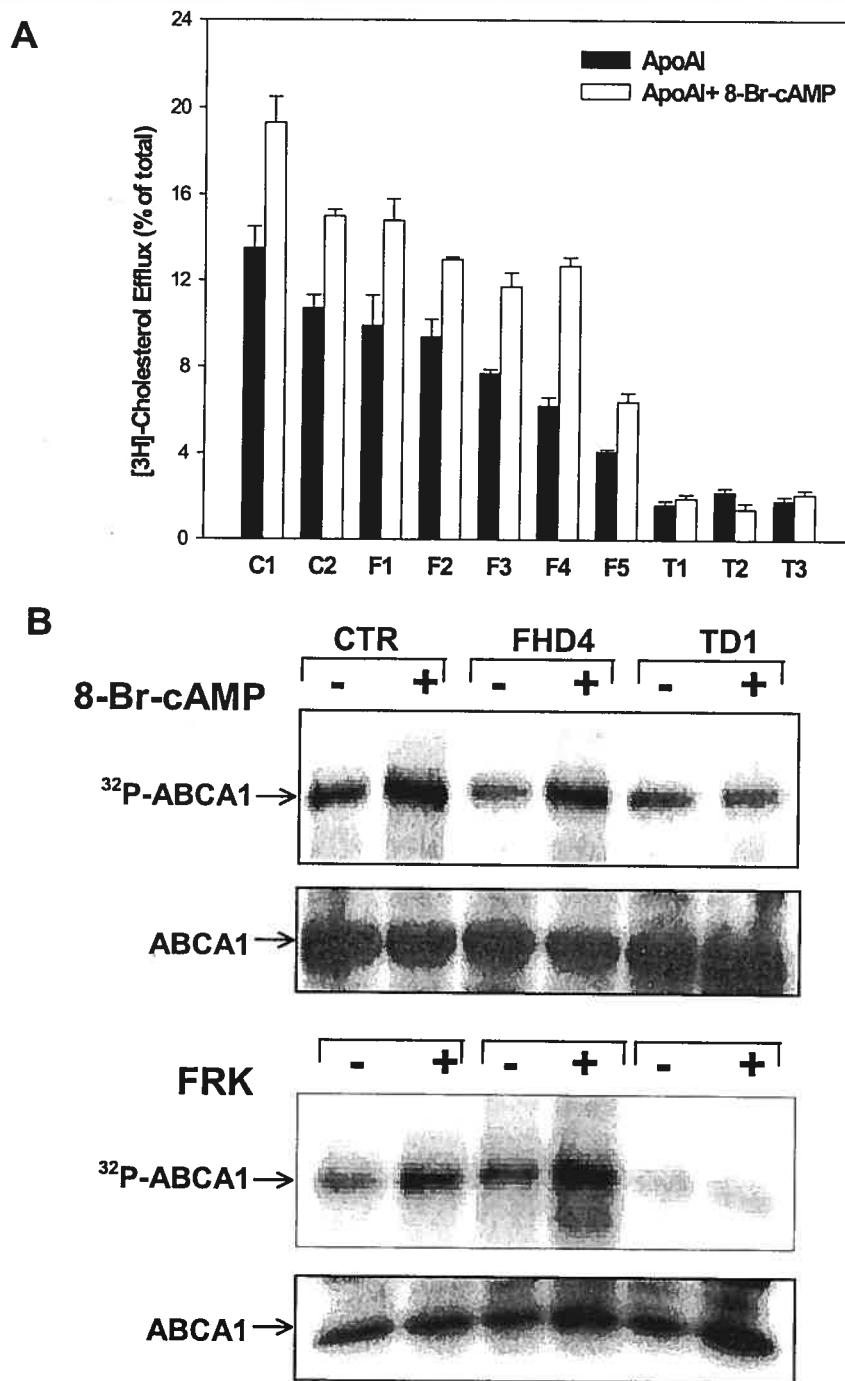
| <b>Cell Lines</b> | <b>HDL-C<br/>(mmol/L)</b> | <b>Nucleotide Change</b>                                 | <b>Predicted Protein Alteration</b>      |
|-------------------|---------------------------|--|--|
| CTR1              | 1.63                      | -  | -  |
| CTR2              | 1.20                      | -  | -  |
| FHD1              | 0.27                      | Exon 14 $\Delta$ 2017-9                                  | $\Delta$ L693                            |
| FHD2              | 0.18                      | Exon 18 C2665T   | R909X                                    |
| FHD3              | 0.39                      | Exon 41 $\Delta$ 5618-23                                 | $\Delta$ ED1893,4                        |
| FHD4              | 0.18                      | Exon 48 C6370T   | R2144X                                   |
| FHD5              | 0.09                      | Exon 36 GG5277,8C  | fs 1628G, Q1636X                         |
| TD1               | <0.1                      | Exon 30 T4369C;<br>Exon 24 splice site G $\rightarrow$ C | C1477R<br>Part of the transcript deleted |
| TD2               | <0.1                      | Exon 13 A1730G   | Q597R                                    |
| TD3               | <0.1                      | Exon 48 $\Delta$ C6370; nd                               | 2145X; nd                                |

FHD1-5 are heterozygous for the reported mutation;

TD1,3 are compound heterozygous and TD2 is homozygous; nd, not determined.



**Figure 5. Effect of H-89 PKA-inhibitor on apoA-I-mediated cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation. Panel A:** normal control fibroblasts were cholesterol-loaded and [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labeled, as described in Methods. Cells were incubated with 10 μg/mL apoA-I in absence or presence of 20 μM H-89. After 24 h incubation, cholesterol efflux was determined. Results represent the mean ± S.D. from triplicate wells. **Panel B:** normal control fibroblasts were cholesterol-loaded and [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labeled. Cells were incubated with 10 μg/mL apoA-I in presence of 1 mM 8-Br-cAMP with increasing amounts of H-89 (0, 5, 10, 20 μM). After 24 h incubation, cholesterol efflux was determined. Results represent the mean ± S.D. from triplicate wells. **Panel B, inset:** normal intact fibroblasts were incubated with <sup>32</sup>P-labeled orthophosphate for 2h in the presence of 1 mM 8-Br-cAMP and H-89 (0, 5, 10, 20 μM, lanes a to d). <sup>32</sup>P-labeled ABCA1 was revealed as described in Fig. 4. One experiment, representative of two, is shown.



**Figure 6. Specific naturally occurring mutations of ABCA1 affect its cellular cholesterol efflux and phosphorylation activities. Panel A:** fibroblasts from normal control, FHD and TD subjects (Table I), were cholesterol-loaded and [<sup>3</sup>H]-cholesterol-labeled, as described in Methods. Cells were incubated with 10  $\mu$ M apoA-I alone or in the presence of 0.5 mM 8-Br-cAMP. After 24 h incubation, radioactivity in the medium and in the cells was determined. Cholesterol efflux is presented as the percent of total radioactivity recovered from the cells and the medium, and represents the mean  $\pm$  S.D. from triplicate wells. **Panel B, upper panel:** fibroblasts from CTR1, FHD4 and TD1 subjects were radiolabeled with <sup>32</sup>P-orthophosphate and treated with 1 mM 8-Br-cAMP for 1 h. ABCA1 was identified as described in figure 4. **Lower panel:** fibroblasts from CTR1, FHD4 and TD1 subjects were radiolabeled with <sup>32</sup>P-orthophosphate and treated with 5  $\mu$ M FRK for 2 h. ABCA1 was identified as described in Fig. 4. One experiment, representative of two from the same subjects, is shown in upper and lower panels.

## DISCUSSION

cAMP has been recognized to promote apoA-I-mediated cellular lipid efflux (14). Here we have shown that 8-Br-cAMP increased apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in normal cells, but did not affect the diffusion-mediated non-specific cholesterol efflux (Fig. 1B). At the same time, treatment of intact normal cells with 8-Br-cAMP increased ABCA1 phosphorylation in a time-dependent manner. At 10 min, 2.5 fold increase in ABCA1 phosphorylation was observed compared to basal phosphorylation level in untreated cells (Fig. 4). The effect of 8-Br-cAMP on cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation was not due to ABCA1 mRNA and protein increase levels (Fig. 2A). However, previous studies have documented that both ABCA1 mRNA and protein levels are induced by cAMP treatment in macrophages (16,17). Furthermore, 8-Br-cAMP did not affect the activity of cholesteryl ester hydrolase (Fig. 3). It is more likely that a cAMP-dependent signaling pathway directly induces or activates key proteins involved in the apolipoprotein-mediated lipid removal pathway.

The effects of 8-Br-cAMP on cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation was supported by experiments showing that FRK, known as an activator of adenylate cyclase, induces both increased cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation in normal cells (Fig. 1A,B and Fig. 6B, lower panel). These are consistent with the concept that cAMP / PKA-dependent pathway may regulate cellular cholesterol efflux. This concept is supported by the finding that: 1) H-89 PKA inhibitor reduces significantly cellular cholesterol efflux (Fig. 5A,B); and 2) ABCA1 phosphorylation was also reduced by H-89 (Fig. 5, inset). Additional evidence for the link between ABCA1 phosphorylation and cellular cholesterol efflux was provided by the observation that increase in apoA-I-mediated cholesterol efflux was observed within the first hour of treatment with 8-Br-cAMP (Fig. 1A), concurrent with the kinetic of phosphorylation of ABCA1 in presence of 8-Br-cAMP (Fig. 4). Of interest, it has been demonstrated that apoE induces Akt / protein kinase B phosphorylation in neuronal cells via cAMP / PKA-dependent pathway (25), and apoA-I stimulates human placental lactogen release by activation of MAP kinase (26). One can speculate that ApoA-I may regulate cAMP levels which was determined by the balance of cellular adenyl cyclase and phosphodiesterase activities (27), that lead to the activation of PKA and subsequent activation of ABCA1 by increasing its phosphorylation. It would be of interest to

determined whether apoA-I mutations affecting its hydrophobic and charged residues in helices, regulate cAMP / PKA-dependent pathway and ABCA1 phosphorylation activity.

Although the structural characteristics of ABCA1 activation and its interaction with apoA-I has not yet been determined, the present study shows that fibroblasts from a TD patient (TD1, Table I) were unable to increase apoA-I cholesterol efflux (Fig. 6A) and ABCA1 protein phosphorylation by 8-Br-cAMP or FRK treatment (Fig. 6B,C). However, 8-Br-cAMP or FRK increased both cellular cholesterol efflux and ABCA1 phosphorylation in normal control and FHD cells. It has been demonstrated that apoA-I directly binds to ABCA1 which its expression substantially increased apoA-I binding (28). The binding of apoA-I to fibroblasts from TD (homozygote) patients has been reported to be abnormal (29), but not in FHD patients (21). In the present study, we examined cell lines from a FHD patient (FHD4, Table I) with heterozygous truncated mutation in exon 48 (C6370T; Arg2144stop) and a TD patient (TD1, Table I) with compound heterozygosity for a splice site defect in intron 24 and a point mutation in exon 30 (T4369C; Cys1417Arg). Evidence from the study of those patients suggested that specific mutation of ABCA1 could severely affect its interaction with apoA-I molecules (protein-protein interactions) and subsequently its phosphorylation. Alternatively, abnormal folding of ABCA1 in TD cells may affect the serine / threonine phosphorylation sites. It was reported that a mutation of multidrug resistance protein 2 (ABCC2), substitutions (Ala and Cys) of Trp1254, alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity of ABCC2, whereas other substitutions (Phe and Tyr) had no effect (30). In addition, phosphorylation of P-glycoprotein, an ABC transporter protein was proposed to play important role in its drug-efflux activity (31). The physical interaction between apoA-I and ABCA1 was supported by recent works by Fitzgerald *et al.* (32) suggesting that apoA-I stimulating cholesterol efflux cannot occur without direct interaction between apolipoprotein and critical residues in two extracellular loops of ABCA1 protein.

Cellular cholesterol efflux appears to be an important determinant of plasma HDL-C levels. This is based on the observation that ABCA1 defects lead to a marked deficiency of plasma HDL-C, and cellular cholesterol efflux correlates with plasma HDL-C level (33). The regulation of ABCA1-mediated cellular cholesterol efflux is complex and regulated both at the transcriptional and post-transcriptional levels in cells. It might be insufficient, therefore, to increase ABCA1 mRNA levels in peripheral cells such as fibroblasts in order to increase cellular cholesterol efflux. Strategies targeting the modulation of both the amount of ABCA1 protein and its activation by phosphorylation

have potential therapeutic interventions aimed at raising HDL-C levels in plasma of patients at increased risk for developing atherosclerotic vascular disease.

The results presented in this study provide evidence supporting that apoA-I interacts with cAMP / PKA-dependent pathway leading to ABCA1 phosphorylation. This process might play *in vivo* a key functional role in the activation of ABCA1 by increasing its phosphorylation, allowing cholesterol to bound free apoA-I.

Further study of the role of apoA-I in mediating cellular signaling and its interaction with ABCA1 protein may provide new insights into the mechanism of reverse cholesterol transport, plasma factors affecting HDL metabolism, and the therapeutic potential of ABCA1 in preventing or treating atherosclerotic vascular disease.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. Dominique Devost for technical advice.

## REFERENCES

1. Brooks-Wilson,A., Marcil,M., Clee,S.M., Zhang,L.H., Roomp,K., van Dam,M., Yu,L., Brewer,C., Collins,J.A., Molhuizen,H.O. *et al.* 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat.Genet.* 22:336-345.
2. Marcil,M., Brooks-Wilson,A., Clee,S.M., Roomp,K., Zhang,L.H., Yu,L., Collins,J.A., van Dam,M., Molhuizen,H.O., Loubster,O. *et al.* 1999. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 354:1341-1346.
3. Batal,R., Tremblay,M., Krimbou,L., Mamer,O., Davignon,J., Genest,J.Jr., and Cohn,J.S. 1998. Familial HDL deficiency characterized by hypercatabolism of mature apoA-I but not proapoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:655-664.
4. Tall,A.R. 1993. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 34:1255-1274.
5. Croop,J.M. 1998. Evolutionary relationships among ABC transporters. *Methods Enzymol.* 292:101-116.
6. Tusnady,G.E., Bakos,E., Varadi,A., and Sarkadi,B. 1997. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.* 402:1-3.
7. Thomas,P.M., Cote,G.J., Wohlk,N., Haddad,B., Mathew,P.M., Rabl,W., Aguilar-Bryan,L., Gagel,R.F., and Bryan,J. 1995. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268:426-429.
8. Strautnieks,S.S., Bull,L.N., Knisely,A.S., Kocoshis,S.A., Dahl,N., Arnell,H., Sokal,E., Dahan,K., Childs,S., Ling,V. *et al.* 1998. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat.Genet.* 20:233-238.
9. Demolombe,S. and Escande,D. 1996. ATP-binding cassette proteins as targets for drug discovery. *Trends Pharmacol.Sci.* 17:273-275.



10. Dean, M. and Allikmets, R. 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:779-785.
11. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1:945-951.
12. Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15:430-434.
13. Picciotto, M.R., Cohn, J.A., Bertuzzi, G., Greengard, P., and Nairn, A.C. 1992. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 267:12742-12752.
14. Smith, J.D., Miyata, M., Ginsberg, M., Grigaux, C., Shmookler, E., and Plump, A.S. 1996. Cyclic AMP induces apolipoprotein E binding activity and promotes cholesterol efflux from a macrophage cell line to apolipoprotein acceptors. *J. Biol. Chem.* 271:30647-30655.
15. Takahashi, Y. and Smith, J.D. 1999. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:11358-11363.
16. 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.
17. Oram, J.F., Lawn, R.M., Garvin, M.R., and Wade, D.P. 2000. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* 275:34508-34511.
18. Lawn, R.M., Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., and Oram, J.F. 1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest.* 104:R25-R31.

19. Oram,J.F., Mendez,A.J., Lymp,J., Kavanagh,T.J., and Halbert,C.L. 1999. Reduction in apolipoprotein-mediated removal of cellular lipids by immortalization of human fibroblasts and its reversion by cAMP: lack of effect with Tangier disease cells. *J.Lipid Res.* 40:1769-1781.
20. Haidar,B., Mott,S., Boucher,B., Lee,C.Y., Marcil,M., and Genest,J., Jr. 2001. Cellular cholesterol efflux is modulated by phospholipid-derived signaling molecules in familial HDL deficiency/Tangier disease fibroblasts. *J.Lipid Res.* 42:249-257.
21. Marcil,M., Yu,L., Krimbou,L., Boucher,B., Oram,J.F., Cohn,J.S., and Genest,J.Jr. 1999. Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:159-169.
22. Marcil,M., Boucher,B., Krimbou,L., Solymoss,BC., Davignon,J., Frohlich,J., and Genest,J.Jr. 1995. Severe familial HDL deficiency in French-Canadian kindreds. Clinical, biochemical, and molecular characterization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15:1015-1024.
23. Lowry,O., Rosebrogh,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
24. Bernard,D.W., Rodriguez,A., Rothblat,G.H., and Glick,J.M. 1991. cAMP stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J7774 macrophages. *J.Biol.Chem.* 266:710-716.
25. Laffont,I., Takahashi,M., Shibukawa,Y., Honke,K., Shuvaev,V.V., Siest,G., Visvikis,S., and Taniguchi,N. 2002. Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform- specific manner. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 292:83-87.
26. Kanda,Y., Richards,R.G., and Handwerger,S. 1998. Apolipoprotein A-I stimulates human placental lactogen release by activation of MAP kinase. *Mol.Cell Endocrinol.* 143:125-131.
27. Tang,W.J. and Gilman,A.G. 1992. Adenylyl cyclases. *Cell* 70:869-872.

28. Wang,N., Silver,D.L., Costet,P., and Tall,A.R. 2000. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol.Chem.* 275:33053-33058.
29. Francis,G.A., Knopp,R.H., and Oram,J.F. 1995. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* 96:78-87.
30. Ito,K., Oleschuk,C.J., Westlake,C., Vasa,M.Z., Deeley,R.G., and Cole,S.P. 2001. Mutation of Trp1254 in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J Biol.Chem.* 276:38108-38114.
31. Berger,H.A., Travis,S.M., and Welsh,M.J. 1993. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol.Chem.* 268:2037-2047.
32. Fitzgerald,M.L., Morris,A.L., Rhee,J.S., Andersson,L.P., Mendez,A.J., and Freeman,M.W. 2002. Naturally occurring mutations in ABCA1's largest extracellular loops can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J.Biol.Chem.* (In press).
33. Clee,S.M., Kastelein,J.J., van Dam,M., Marcil,M., Roomp,K., Zwarts,K.Y., Collins,J.A., Roelants,R., Tamasawa,N., Stulc,T. *et al.* 2000. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J Clin.Invest* 106:1263-1270.

## **Chapitre 5: Article 3**

### **Apolipoprotein A-I Activates Cellular cAMP Signaling through the ABCA1 Receptor**

EVIDENCE FOR INTERACTIONS BETWEEN ABCA1 RECEPTOR AND G PROTEIN\*

**Bassam Haidar<sup>1,2</sup>, Maxime Denis<sup>1,2</sup>, Larbi Krimbou<sup>1</sup>, Michel Marcil<sup>1</sup>, Jacques Genest Jr.<sup>1</sup>**

From the <sup>1</sup>Cardiovascular Genetics Laboratory, Division of Cardiology, McGill University Health Centre / Royal Victoria Hospital, Montréal, Québec H3A 1A1, Canada, and <sup>2</sup> Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

This work was supported by grants MOP 15042 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. J. Genest holds the McGill University-Novartis Chair in Cardiology.

*Running title: ApoA-I activates cAMP signaling*

Soumis au *Journal of Biological Chemistry* 25 Août 2003

## ABSTRACT

It has been suggested that signal transduction pathway initiated by apoA-I activates key proteins involved in cellular lipid efflux. We investigated apoA-I-mediated cAMP signaling in cultured human fibroblasts induced with 22 (R)-hydroxycholesterol and 9-*cis*-retinoic. Treatment of fibroblasts with apoA-I increased ABCA1 phosphorylation in a concentration-dependent manner. Maximum phosphorylation was reached at 10 µg/mL of apoA-I, representing a 220% increase. Concomitantly, apoA-I increased the intracellular level of cAMP in a concentration and time-dependent manner. Maximal cAMP level was reached within 10 min at 10 µg/mL of apoA-I representing a 100% increase. The ability of apoA-I to mediate cAMP production was only observed in stimulated cells, whereas forskolin, an activator of adenylyl cyclase, induced cAMP production in either stimulated or unstimulated cells. Pharmacological inhibition of PKA (H89) completely blocked apoA-I-mediated ABCA1 phosphorylation. Naturally occurring mutations of ABCA1 associated with Tangier disease (TD) (C1477R, 2203X and 2145X) severely reduced apoA-I-mediated cAMP production, ABCA1 phosphorylation, <sup>125</sup>I-apoA-I binding, and cellular lipid efflux, without affecting forskolin-mediated cAMP elevation. By contrast, the PKA catalytic subunit was able to phosphorylate similarly ABCA1 from mutant and control cell lines *in vitro*. Finally, pertussis toxin, which inhibits G protein-dependent activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C, markedly decreased apoA-I-mediated phospholipid efflux in stimulated normal cells. Together, our results indicate that: 1) apoA-I activates ABCA1 phosphorylation via cAMP/PKA-dependent pathway; 2) apoA-I-mediated cAMP production required high level expression of functional ABCA1 protein; and 3) ABCA1-dependent phospholipid efflux is modulated by phospholipases. These findings suggest that apoA-I activates cAMP signaling through G protein-coupled ABCA1 receptor.

**Keywords:** ApoA-I, HDL, ABCA1 phosphorylation, PKA, cAMP signaling, G protein

**ABBREVIATIONS**

ABCA1, ATP binding cassette A1; AC, adenylyl cyclase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; FHD, Familial HDL deficiency; FRK, forskolin; GPCRs, G protein-coupled receptors;  $G\alpha_s$ ,  $\alpha$  subunit of the heterotrimeric  $G_s$  protein; HDL, high density lipoprotein; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells;  $IP_3$ , inositol 1,4,5-trisphosphate; OA, okadaic acid; PC-PLC, phosphatidylcholine-specific phospholipase C; PC-PLD, phosphatidylcholine-specific phospholipase D; PI-PLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PKA, protein kinase A; PKA-c, catalytic unit of PKA; PTx, pertussis toxin; TD, Tangier disease.

## INTRODUCTION

ATP-binding cassette transporter AI (ABCA1) mediates the active removal of cellular cholesterol and phospholipids to lipid-poor apolipoproteins from a variety of cells. This process plays a crucial role in the biogenesis of HDL particles (1-3). The importance of ABCA1 in reverse cholesterol transport (RCT) process has been strikingly demonstrated by the identification of mutations in ABCA1 gene locus as the molecular defect of Tangier Disease (TD) and Familial HDL Deficiency (FHD) (4;5). These patients are characterized by extremely low HDL levels, caused by inadequate transport of cellular cholesterol and phospholipids to the extracellular space, leading to hypercatabolism of lipid-poor nascent HDL particles (6). Thus, factors affecting the active lipidation of apoA-I are likely to affect the homeostasis of plasma HDL cholesterol and the RCT process, one of the major mechanisms by which HDL may prevent atherosclerotic vascular disease (7).

We have previously documented that cAMP/protein kinase A (PKA)-dependent pathway plays a pivotal role in ABCA1 phosphorylation and modulates cellular lipid efflux-mediated by apoA-I in fibroblasts (8). In a related observation, See *et al.* (9) reported that S2054 on the ABCA1 protein is essential for PKA phosphorylation and for regulation of ABCA1 transporter activity. In addition, it has been shown that PKA or protein kinase C (PKC) controls the function of ABC transporters, CFTR and P-glycoprotein by their phosphorylation (10;11). A number of kinases have been implicated in cellular lipid efflux including mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PKC (12;13). PKC inhibitors severely reduce apolipoprotein-mediated cholesterol efflux (14), at the same time, protein kinase agonists such as 1,2-dioctanoylglycerol and phorbol myristate acetate increase cholesterol efflux (15). On the other hand, it was reported that cAMP-mediated cholesterol efflux to apoA-I is associated with the binding, uptake, and resecretion of apoA-I in a calcium-dependent pathway in murine macrophages (16). Such cross-talk between cAMP signaling,  $Ca^{2+}$  and phospholipid-dependent signaling pathways might play *in vivo* a key functional role in the activation of ABCA1 by its phosphorylation, allowing apoA-I lipidation.

Although it is clear that cellular signaling process plays an important role in cellular lipid homeostasis and lipid efflux, structural determinants of molecular interactions between cell signaling molecules and apoA-I have not been elucidated. We hypothesize that apoA-I activates cAMP signaling directly or via cross-talk mechanisms with other signal transduction pathways. The present study aims at providing evidence for links

between apoA-I, intracellular cAMP production, ABCA1 phosphorylation, and to examine how these interactions could be affected by cAMP regulators, PKA inhibitors, or by naturally occurring mutants of ABCA1.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Patients selection* — Patients with TD were selected as previously described (3). All these subjects carry a mutation at the ABCA1 gene locus and had clinical signs of TD. Cellular studies in all TD subjects revealed a marked impairment of apoA-I-mediated phospholipid and cholesterol efflux. Molecular analysis of the ABCA1 gene revealed a compound heterozygous state for subjects TD-1 and TD-3 and a homozygous nonsense point mutation in subject TD-2 (Table I). Fibroblasts from three normolipidemic subjects were used as controls.

*ABCA1 mutational analysis* — Analysis of mutations at the ABCA1 gene was performed as previously described (4;5). Exon-specific oligonucleotides were synthesized for each exon of the ABCA1 gene. Direct sequencing was performed on all patients and single nucleotide changes were assessed by comparison between species to identify highly conserved residues. All detected nucleotide changes were assessed in a large DNA samples from control individuals with normal HDL-C and from the same origin.

*In vivo phosphorylation and immunoprecipitation (IP)* — Confluent cells were stimulated or not with 2.5  $\mu\text{g/mL}$  of 22 (R)-hydroxycholesterol and 5  $\mu\text{M}$  of 9-*cis*-retinoic acid for 20 h, and the media was replaced by MEM-free phosphate solution (Invitrogen). Cells were then labeled with 0.5 mCi/mL  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate (Perkin Elmer) for 45 min at 37°C in the presence or absence of either apoA-I (Biodesign International), 8-Br-cAMP or okadaic acid. At the indicated time, the cells were washed twice with ice-cold PBS and scraped into 0.5 mL of IP buffer containing 20 mM Tris (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1 % Triton-X 100, 1% sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 25  $\mu\text{g/mL}$  okadaic acid, 25 mM glycerophosphate and the suspension was allowed to stand for 30 min at 4°C in presence of a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics).  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 was immunoprecipitated by anti-ABCA1 antibody (Novus Biologicals), separated on SDS-gel and detected by phosphorimager as previously described (8).

*Intracellular cAMP assay* — Twenty-five thousand cells were seeded in 24-well plates. The next day the cells were incubated overnight in a serum-free medium (DMEM/BSA, 1 mg/mL) supplemented with 2  $\mu\text{Ci/mL}$   $^3\text{H}$ -adenine (Perkin Elmer) in the presence or absence of 22 (R)-hydroxycholesterol and 9-*cis*-retinoic acid. Cells were then washed once with (DMEM/HEPES, 20 mM) and incubated at 37°C in the presence

of 1 mM IBMX with different concentrations of ApoA-I for the indicated times. Adenylyl cyclase was activated with 40  $\mu$ M forskolin. After removal of the medium, the reaction was stopped with 500  $\mu$ L trichloroacetic acid 5% and the cells were mechanically scraped and layered on the top of WA-1 acid alumina columns (Sigma-Aldrich). The separation of  $^3$ H-cAMP so formed was achieved according to the method already described (17) and slightly modified (18). In brief, the columns were washed sequentially with 4 mL of 0.5 mM HCl and 0.5 mL of 0.1 M ammonium acetate (AA) and collected into scintillation vials with 4 mL of 0.1 M AA. The intracellular cAMP level was expressed in fmol/mg cell protein. All the experiments were performed in triplicate and the same experiment was performed at least three times with identical results.

*In vitro phosphorylation by PKA-catalytic subunit* — Cells were stimulated with 22 (R)-hydroxycholesterol and 9-*cis*-retinoic acid and the ABCA1 protein was immunoprecipitated as described above. The complex protein A-Sepharose-ABCA1 (25  $\mu$ L) was added to PKA reaction buffer containing 20  $\mu$ M ATP, 10  $\mu$ Ci  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP (Perkin Elmer), 0.1% BSA, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 7.4), and incubated with 180 nM of PKA catalytic subunit (Calbiochem) at 30°C for 15 min in a total volume of 50  $\mu$ L.  $^{32}$ P-ABCA1 was separated on SDS-6% polyacrylamide gel and then separated proteins were transferred into PVDF-membrane and detected by phosphorimager.

*ApoA-I binding assay* — Purified human plasma apoA-I was iodinated with  $^{125}$ I by IODO-GEN (Pierce) to a specific activity of 4000 cpm/ng apoA-I. Cells from three normal controls and three TD subjects (Table I) were grown on 24-well plates and stimulated as described above. Cells were then incubated at 37°C with 10  $\mu$ g/mL  $^{125}$ I-apoA-I (under saturating binding conditions) in DMEM/BSA (1 mg/mL) for 2 h at 37°C and then washed twice with cold PBS/BSA and twice with PBS. Cell association radioactivity and cell protein were measured after digestion in 0.1 N NaOH. Non specific binding was determined in the presence of a 40-fold excess of unlabeled apoA-I. Results are expressed as nanograms of specific  $^{125}$ I-apoA-I binding/mg of cell protein. For appropriate comparison results were presented as percent of controls (Table I).

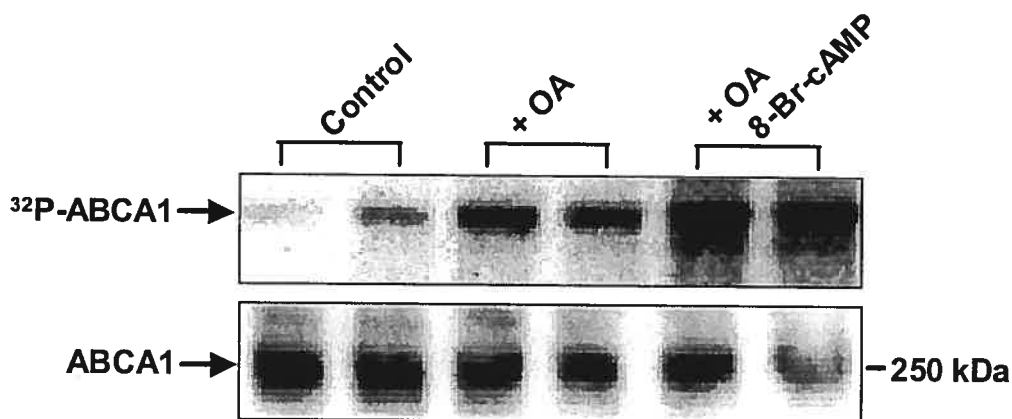
*Cellular lipid Efflux* — Phospholipid and cholesterol efflux were determined as previously described (3;19) with minor modifications. Briefly, 50 000 cells were seeded in 12-well

plates. At mid-confluence, the cells were labeled with 1-5  $\mu\text{Ci/mL}$   $^3\text{H}$ -choline (Perkin Elmer) or 0.2  $\mu\text{Ci/mL}$   $^3\text{H}$ -cholesterol (Perkin Elmer) for 48 h. At confluence, cells were cholesterol-loaded (20  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. After a 24 h equilibration period, cells were stimulated with 2.5  $\mu\text{g/mL}$  of 22 (R)-hydroxycholesterol and 5  $\mu\text{M}$  of 9-*cis*-retinoic acid for 20 h. Phospholipid or cholesterol efflux was determined at either 2 h or 24 h with 10  $\mu\text{g/mL}$  apoA-I. Cellular lipid efflux was determined as follow:  $^3\text{H}$  cpm in medium/( $^3\text{H}$  cpm in medium +  $^3\text{H}$  cpm in cells); the results were expressed as % of total radiolabeled phospholipids or cholesterol.

*Statistical analysis* — Intracellular cAMP levels have been compared statistically by t-test. Two-tailed  $p$  values < 0.05 were considered as significantly different.

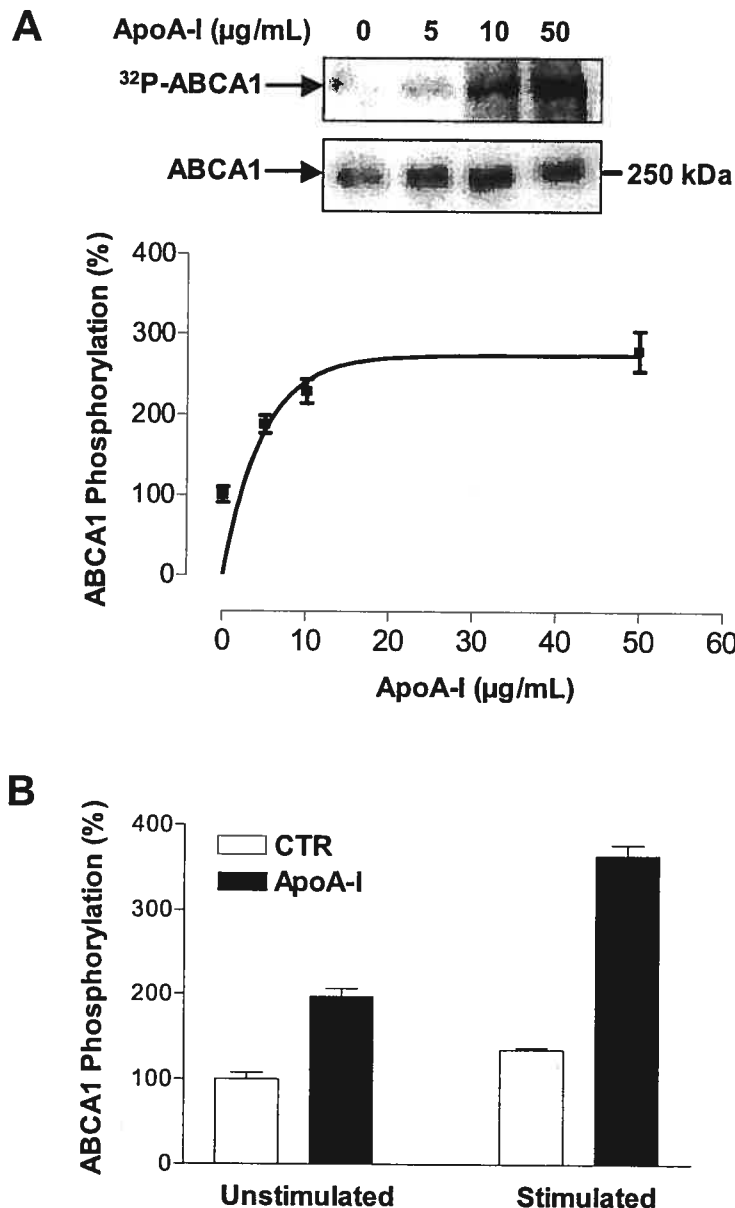
## RESULTS

Previously we developed a semi-quantitative, immunoprecipitation-based method for detection of ABCA1 phosphorylation in intact cells (8). In the present study, we modified this technique by reducing the time of labeling the cells with  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate from 120 min to 45 min at  $37^\circ\text{C}$ , the new method is more sensitive to small variation of ABCA1 phosphorylation. As shown in Fig.1, ABCA1 is phosphorylated at a basal level in untreated normal intact cultured human fibroblasts in which ABCA1 was induced by 22 (R)-hydroxycholesterol and 9-*cis*-retinoic acid (stimulated cells). Inclusion of the Ser/Thr phosphatase inhibitor okadaic acid (OA,  $10\ \mu\text{M}$ ) during  $^{32}\text{PO}_4$  labeling resulted in a significant increase in the level of ABCA1 phosphorylation. In addition, the treatment of cells with 8-Br-cAMP ( $1\ \text{mM}$ ) in the presence of OA during the  $^{32}\text{PO}_4$  labeling further increased ABCA1 phosphorylation levels up to 6 to 8-fold.



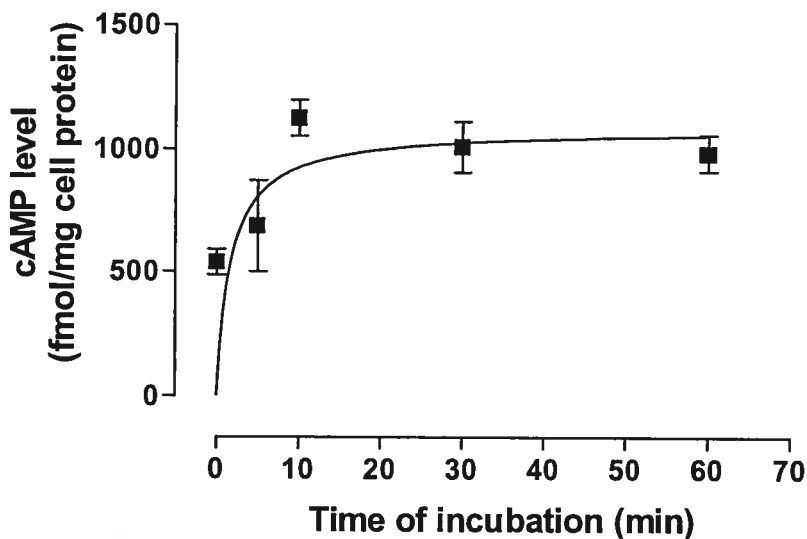
**Fig. 1. Detection of ABCA1 receptor phosphorylation using a more sensitive method.** Normal intact fibroblasts were stimulated with  $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  of 22 (R)-hydroxycholesterol and  $5\ \mu\text{M}$  of 9-*cis*-retinoic acid for 20 h (stimulated cells). Cells were then labeled with  $0.5\ \text{mCi}/\text{mL}$  of  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate for 45 min in the presence or absence of  $10\ \mu\text{M}$  okadaic acid (OA) alone or  $10\ \mu\text{M}$  of OK plus  $0.5\ \text{mM}$  8-Br-cAMP.  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was immunoprecipitated and separated by electrophoresis, and then transferred to PVDF-membrane as described under "Experimental Procedures".  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 separated in duplicate for each treatment was revealed by phosphorimager. The ABCA1 protein was detected on the same membrane by anti-ABCA1 antibody.

In order to establish the relationship of apoA-I with ABCA1 phosphorylation activity, normal intact stimulated cells were treated with increasing amounts of apoA-I (0, 5, 10, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) during  $^{32}\text{PO}_4$  labeling. Phosphorylated ABCA1 was immunoprecipitated and detected as described under "Experimental Procedures". As shown in Fig. 2A, treatment of stimulated fibroblasts with apoA-I increased ABCA1 phosphorylation in a concentration-dependent manner. Maximum phosphorylation was reached at 10  $\mu\text{g/mL}$  apoA-I, and represents a 220% increase, compared to basal phosphorylation level of ABCA1 in untreated cells. Percent increase of  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 from three different samples separated together on the same membrane for appropriate comparison was presented (Fig. 2A, lower panel). One representative experiment is shown in the upper panel of Fig. 2A. The effect of apoA-I on ABCA1 phosphorylation was also observed in unstimulated cells, and this effect was markedly enhanced in stimulated cells (Fig. 2B).



**Fig. 2. Concentration-dependence of apoA-I-mediated phosphorylation of ABCA1 and the effect of cell stimulation on ABCA1 phosphorylation. Panel A:** stimulated fibroblasts were  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate-labeled (as in Fig. 1) in the presence of increasing amounts of apoA-I (0, 5, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 45 min at  $37^\circ\text{C}$ .  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was immunoprecipitated and quantified by phosphorimager. Percent increase of  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 from three different samples from the same cells is presented. Plotted values are mean  $\pm$  S.D. of triplicate measures (lower panel). ABCA1 protein were detected in the same membrane by anti-ABCA1 antibody and used as a control for protein loading. One experiment, representative of three, is shown in the upper panel. **Panel B:** either unstimulated or stimulated normal fibroblasts were  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate-labeled in the absence or presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of apoA-I.  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was immunoprecipitated and quantified by phosphorimager. Percent increase of  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 from three different samples from the same cells is presented. Plotted values are mean  $\pm$  S.D. of triplicate measures.

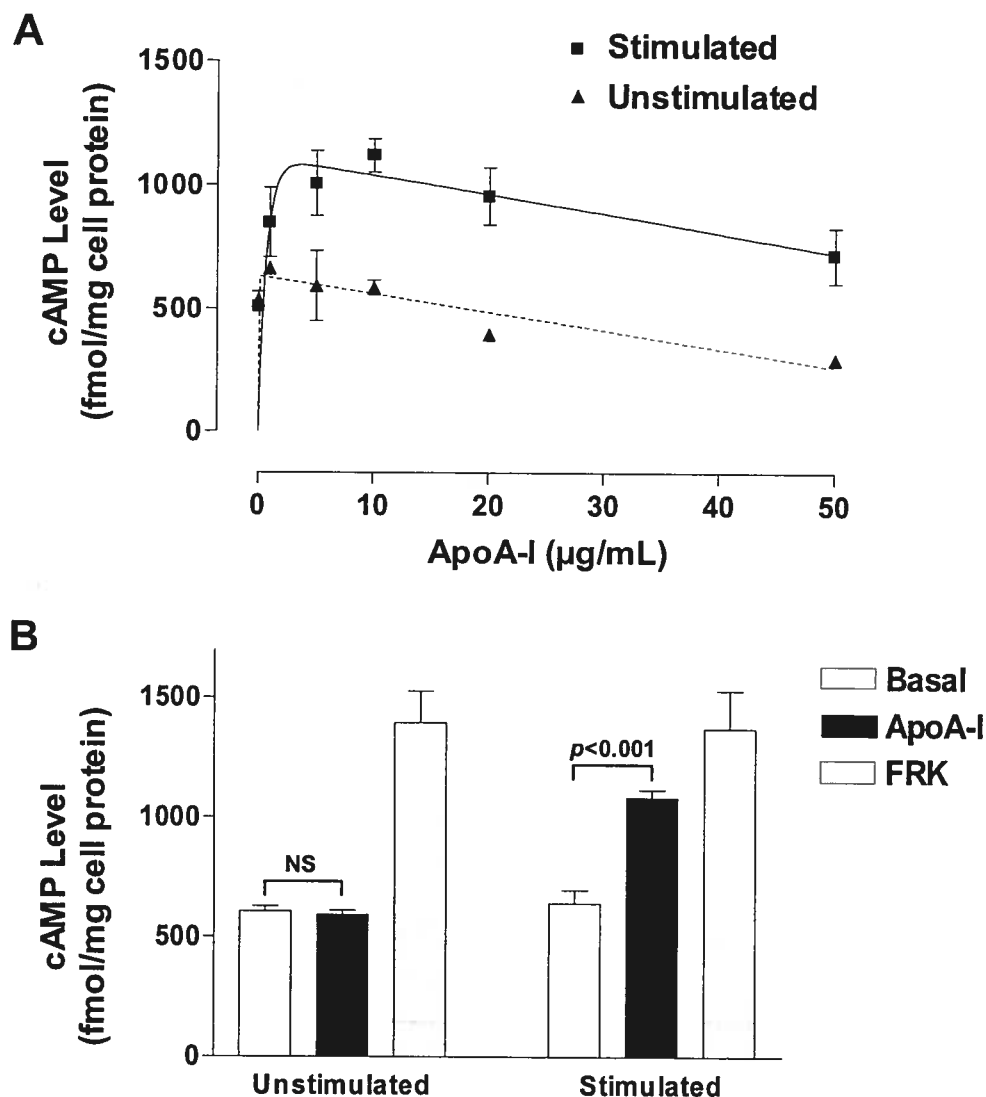
Because cAMP has been suggested as the mediator of apoA-I-mediated ABCA1 phosphorylation (8;9), the question was raised whether the increase in ABCA1 phosphorylation induced by apoA-I was associated with an increase in cAMP production. As shown in Fig.3, treatment of stimulated fibroblasts with apoA-I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), increased rapidly the intracellular level of cAMP in a time-dependent manner, reaching maximal levels within 10 min, and then decreased slightly at 30 min.



**Fig. 3. Time-dependence of apoA-I-mediated cAMP production in stimulated normal cells.** Stimulated normal cells were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of apoA-I for varying periods of time (0, 5, 10, 30, 60 min) and then intracellular cAMP levels were determined as described under "Experimental Procedures". Plotted values are mean  $\pm$  S.D. of triplicate measures.

At the same time, treatment of stimulated normal cells with increasing amounts of apoA-I (0, 1, 5, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) increased intracellular cAMP levels in a concentration-dependent manner (Fig. 4A). Maximal cAMP level was reached at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of apoA-I, representing a 100% increase, compared to basal intracellular cAMP level in untreated cells (506 $\pm$ 15 vs. 1119.9 $\pm$ 66.2 fmol/ mg cell protein, respectively). Above 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of apoA-I, the intracellular cAMP levels decreased gradually. By contrast, increasing the concentration of agonist (apoA-I) in unstimulated cells did not elevate cAMP concentrations above basal levels (Fig.4A). A control experiment was performed to probe the specificity of apoA-I response. We demonstrate that apoA-I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was able to mediate cAMP production in stimulated, but not unstimulated normal fibroblasts from three different cell lines (Fig.4B). We observed that stimulation of cells with 22 (R)-hydroxycholesterol and

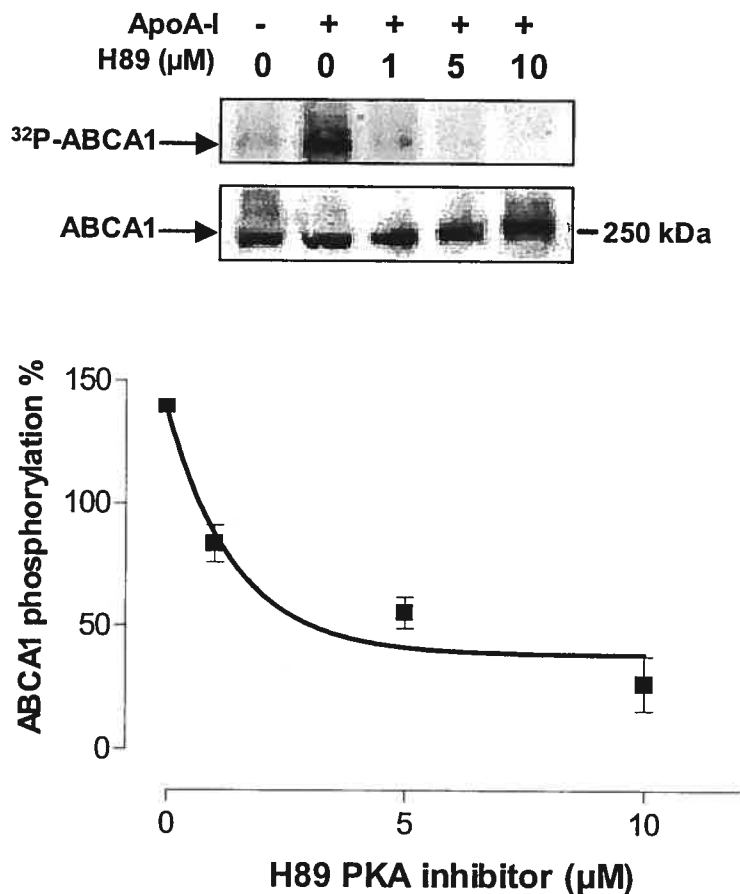
9-*cis*-retinoic for 16 to 24 h increased ABCA1 protein levels and specific  $^{125}\text{I}$ -apoA-I binding by 4-fold, compared to unstimulated cells (data not shown). As expected, forskolin increased intracellular cAMP similarly in either unstimulated or stimulated cells (Fig.4B).



**Fig. 4. Concentration and time-dependence of apoA-I-mediated cAMP production in stimulated and unstimulated normal cells.** Panel A: either stimulated or unstimulated normal fibroblasts were incubated with increasing amounts of apoA-I (0, 1, 5, 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) for 15 min at 37°C and intracellular cAMP levels were determined. Plotted values are mean  $\pm$  S.D. of triplicate values. Panel B: unstimulated and stimulated normal fibroblasts from three different cell lines were incubated with either 10  $\mu\text{g/mL}$  of apoA-I or 40  $\mu\text{M}$  forskolin (FRK) for 15 min at 37°C and intracellular cAMP levels were determined. Plotted values are mean  $\pm$  S.D. of triplicate values from three different cell lines. Results shown in A and B are representative of three different independent experiments.



In order to provide further evidence for a specific role of PKA in apoA-I-mediated ABCA1 phosphorylation activity, we examined the effect of H89 PKA inhibitor on ABCA1 phosphorylation. Treatment of normal stimulated cells with increasing amounts of H89 (0,1,5 10  $\mu\text{M}$ ) in the presence of apoA-I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibited almost completely apoA-I-mediated ABCA1 phosphorylation in a dose-dependent manner (Fig.5).

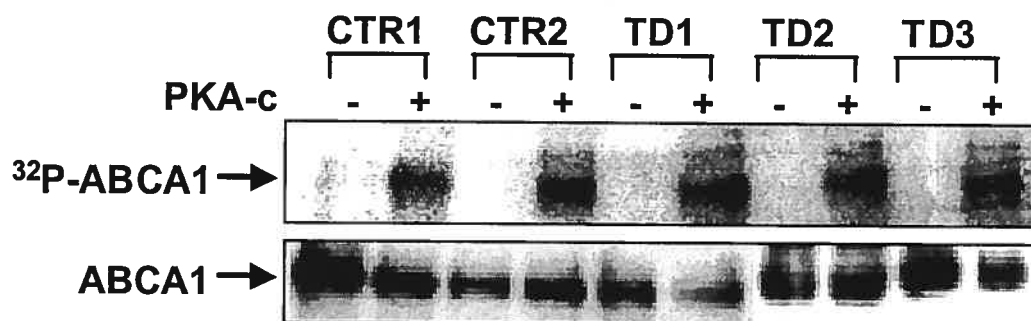


**Fig. 5. Effect of H89 protein kinase A (PKA) inhibitor on apoA-I-mediated ABCA1 phosphorylation.** Lower panel: stimulated normal fibroblasts were  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate-labeled (as in Fig. 1) in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of apoA-I with increasing amounts of H89 (0, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ).  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was immunoprecipitated and quantified by phosphorimager. Percent decrease of  $^{32}\text{P}$ -ABCA1 from three different samples from the same cells is presented. Plotted values are mean  $\pm$  S.D. of triplicate measures. One experiment representative of three is shown in the upper panel. The ABCA1 protein was detected on the same membrane by anti-ABCA1 antibody and used as a control for protein loading.

To determine whether naturally occurring mutations of ABCA1 may affect the ability of apoA-I to mediate either cAMP production or ABCA1 phosphorylation activity, stimulated fibroblasts from normal control and three ABCA1 mutants associated with Tangier Disease (TD) (Table I) were incubated in the absence or presence of apoA-I (10 µg/mL) or FRK (40 µM) for 15 min, and the intracellular concentration of cAMP were determined. In parallel experiments, stimulated cells from normal control and TD cell lines were labeled with <sup>32</sup>P-orthophosphate in the absence or presence (10 µg/mL) of apoA-I and the percent increased in ABCA1 phosphorylation were determined. As shown in Table I, intracellular cAMP levels and ABCA1 phosphorylation were increased significantly in response to apoA-I treatment in normal cells, but apoA-I failed to mediate either intracellular cAMP production, ABCA1 phosphorylation or cellular lipid efflux in TD cell lines. As expected, FRK-mediated cAMP production was not significantly different between normal and TD cell lines (Table I).

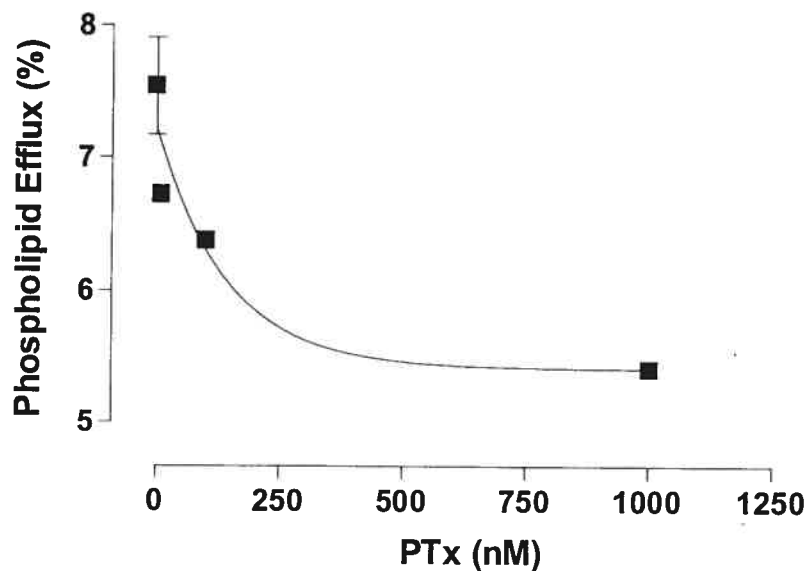
We next examined whether the absence of cAMP response was due to defective apoA-I binding to ABCA1 mutants. Specific <sup>125</sup>I-apoA-I cell association was determined in three normal and three ABCA1 mutant cell lines, as described under "Experimental Procedures". As shown in Table I, specific <sup>125</sup>I-apoA-I was found severely reduced in TD cell lines as compared to normal cells.

To determine whether the absence of ABCA1 phosphorylation in response to apoA-I stimulation in TD cells was due to an abnormal PKA phosphorylation sites, *in vitro* experiments were carried out in which immunoprecipitated ABCA1 from normal and TD stimulated cells was phosphorylated by the catalytic subunit of PKA (PKA-c). As shown in Fig. 6, the PKA-c was able to phosphorylate similarly ABCA1 from normal and TD cells.



**Fig. 6. ABCA1 receptor from normal and TD cell lines is phosphorylated by PKA catalytic subunit *in vitro*.** Fibroblasts from normal controls (n=2) and TD subjects (n=3) (Table I), were stimulated and ABCA1 was immunoprecipitated and incubated with  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP in the absence or presence of the PKA catalytic subunit (PKA-c) as described under "Experimental Procedures".  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was separated by electrophoresis, and then transferred to PVDF-membrane.  $^{32}\text{P}$ -labeled ABCA1 was revealed by phosphorimager. The ABCA1 protein was detected on the same membrane by anti-ABCA1 antibody and used as a control for protein loading.

Defective regulation of either phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) or phosphatidylcholine-specific phospholipase D (PC-PLD) in response to apoA-I was previously observed in TD cells (20) suggesting that G protein-dependent coupling of two phospholipases was affected by ABCA1 mutations associated with TD. We next examined a possible interaction between ABCA1 receptor and phospholipases. The effect of pertussis toxin (PTx) known as an inhibitor of signaling through G-protein-dependent activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), was tested on apoA-I-mediated phospholipid efflux in stimulated cells. Treatment of stimulated cells with increasing amounts of PTx (0,10,100,1000 nM) in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apoA-I significantly reduced phospholipid efflux in a dose-dependent manner (Fig. 7).



**Fig. 7. Effect of pertussis toxin (PTx) on apoA-I-mediated phospholipid efflux in stimulated normal fibroblasts.** Normal fibroblasts were cholesterol-loaded and  $^3\text{H}$ -choline-labeled, as described under "Experimental Procedures". Cells were stimulated for 20 h and preincubated with increasing amounts of PTx (0, 10, 100, 1000 nM) for 2 h, and then incubated for an additional 2 h in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of apoA-I. The radioactivity in the medium and in the cells was determined. Phospholipid efflux was determined as percent of total (media + cells)  $^3\text{H}$ -phospholipids measured in the medium, and represents the mean  $\pm$  S.D. from triplicate wells.

## DISCUSSION

It is well accepted that removal of cholesterol from peripheral cells by HDL involves signal transduction systems in which HDL receptors at the cell surface are believed to transmit the signal to intracellular effectors (21;22). In this report, we demonstrate that apoA-I induces ABCA1 phosphorylation activity in a concentration-dependent manner in stimulated normal cells (Fig. 2). Concomitantly, apoA-I increased intracellular cAMP levels in a concentration and time-dependent manner in stimulated normal cells (Fig. 3,4). At the same time, the H89 PKA inhibitor abolished apoA-I-mediated ABCA1 phosphorylation (Fig. 5), consistent with the concept that cAMP/PKA-dependent pathway may regulate ABCA1 activity and consequently cellular lipid efflux (8;9). This is supported by a previous study demonstrating that anion flux mediated by ABCA1 expression in *Xenopus* oocytes can be stimulated by cAMP or inhibited by the PKA inhibitor, H89 (23). Furthermore, it was documented that PKA phosphorylation of ABCA1 S2054 is important for maintaining normal phospholipid efflux function (9).

Although the molecular mechanism of apoA-I-mediated cAMP signaling has not yet been elucidated, the present study shows that at a constant level of ABCA1 receptor expression in unstimulated cells, increasing agonist concentration (apoA-I) did not elevate cAMP concentrations above basal levels (Fig. 4A), this indicate that the amount of ABCA1 in unstimulated fibroblasts, is below a threshold level needed to trigger cAMP production. At the same time, increasing ABCA1 receptor expression in stimulated cells (4-fold) caused a significant increase in the intracellular cAMP concentration (80-100%) in response to apoA-I treatment (Fig. 4A,B). These results suggest that the amount of apoA-I-dependent cAMP accumulation in normal stimulated fibroblasts reflects the level of adenylyl cyclase (AC) activation and thereby indicates the efficiency of ABCA1 receptor coupling to G protein  $\alpha$  subunits ( $G\alpha_s$ ), known as a physiological activator of AC. In agreement with this conclusion, we demonstrated that in human endothelial cells (HUVEC), which do not express the ABCA1 receptor, apoA-I failed to increase cAMP production in both stimulated and unstimulated cells (data not shown). It is well documented that a wide variety of neurotransmitters, peptide and protein hormones, chemokines, growth factors, and other ligands elicit specific cellular responses by binding to plasma membranes receptors that are coupled to one or more heterotrimeric guanine nucleotide binding regulatory proteins (G protein)-coupled receptors (GPCRs). Once activated, GPCRs couple to and activate specific G protein isoforms that promote the production of intracellular second messengers such cAMP (24;25). Of interest, we

observed that increasing apoA-I concentration above 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  depressed intracellular cAMP production (Fig. 4A), consistent with the phenomenon of receptor uncoupling process (desensitization), whereby activated receptors become phosphorylated and bind  $\beta$ -arrestin proteins, inhibiting further interaction with G protein (26;27). Our results suggest that apoA-I activates cAMP signaling through ABCA1 receptor coupled to G protein. This concept of apoA-I receptor-mediated signaling was supported by the identification of a PDZ-containing adaptor protein interacting with the cytoplasmic domain of the intensively studied HDL receptor scavenger receptor type BI (SR-BI) (28).

The proposed mechanism of apoA-I/ABCA1 receptor/G protein interactions was further strengthened by our results demonstrating that apoA-I-mediated either cAMP production or ABCA1 phosphorylation were severely impaired in stimulated fibroblasts from TD subjects (Table I). We postulate that functional ABCA1 is required for selective coupling to  $G\alpha_s$  or, alternatively, the structural characteristics of apoA-I binding to ABCA1 receptor can directly affect its interaction with G protein. In the present study, evidence was in fact obtained to support both of these possibilities. First, specific binding of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to ABCA1 receptor was severely reduced in TD cells, suggesting that ABCA1 receptor mutants that failed to bind apoA-I also failed to mediate either an increase in cellular cAMP levels, PKA-mediated ABCA1 phosphorylation or cellular lipid efflux (Table I). This conclusion is consistent with the finding that: 1) the capacity of forskolin to stimulate AC was unimpaired in TD cells (Table I); and 2) the PKA catalytic subunit was able to phosphorylate similarly ABCA1 from the three mutants and control cell lines *in vitro* (Fig.6). Although the three ABCA1 mutants seem to be normally expressed (Fig. 6), the localization of ABCA1 to the plasma membrane (PM) was not examined here. However, it was reported that ABCA1 mutation in the second large extracellular loop (C1477R) associated with TD1 was detected at the PM but elicited a significantly reduced binding of apoA-I and lipid efflux (29). This suggests that the main defect resides in the inability to bind apoA-I inline with the current concept. However, it was documented that ABCA1 with a R587W or Q597R mutation appeared to be impaired with intracellular trafficking and predominantly localized in the endoplasmic reticulum (ER) (30). In addition, it was reported by Fitzgerald et al (31) that W590S mutant of ABCA1 had a normal apoA-I binding, but showed little or no apoA-I-stimulated cholesterol efflux. These observations indicate that although the binding of apoA-I to ABCA1 might be necessary for coupling to G protein and subsequent activation of AC, it is not sufficient for stimulation of cholesterol efflux. This suggests that a specific domain

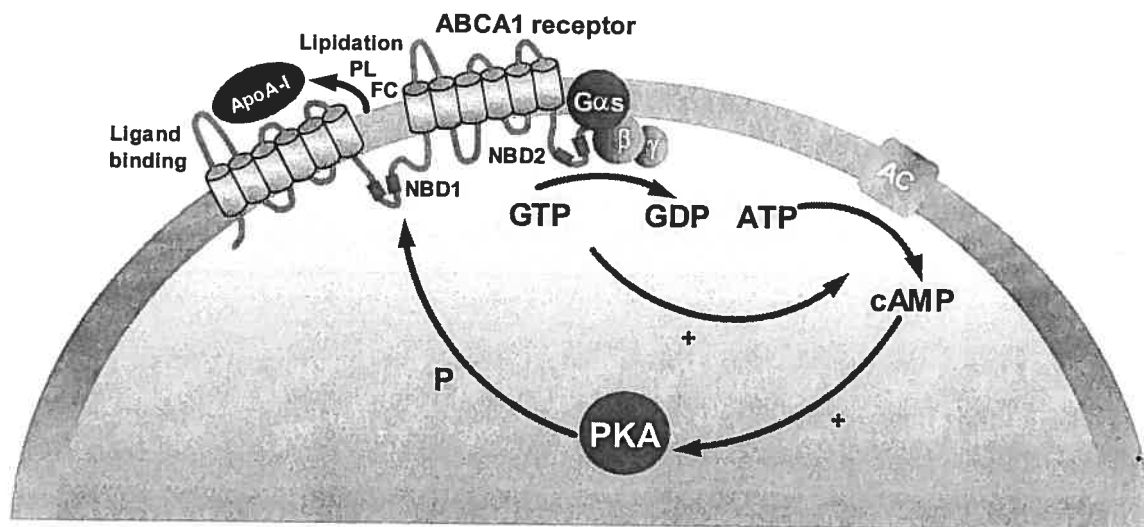
within ABCA1 may be necessary for coupling to G protein. Consistent with this idea, substitution of loop i2 and i3 of the glucagon receptor did not affect glucagon binding, but abolished glucagon-mediated cAMP production, indicating that both loop i2 and loop i3 are involved in glucagon receptor coupling to  $G_s$  (31). Similarly,  $G_s$ -coupled adenylyl cyclase-activated cAMP production was severely impaired by the substitution at the carboxyl terminal of the gonadotropin releasing hormone receptor (32). We are currently investigating the structural requirement for ABCA1 receptor to couple to G protein, activating AC, and regulating receptor activity at the cell surface.

HDL triggers a variety of intracellular signaling events, including activation of either PI-PLC, PC-PLC or PC-PLD, PKC, MAPK, tyrosine kinase (33-35), nitric oxide (NO), intracellular  $Ca^{2+}$  release, and ceramide production (36). The diversity of HDL-mediated cellular responses can in part be explained by the heterogeneity and composition of HDL particles (apolipoproteins and lipids) (37-39) as well as by the different HDL receptor possibly involved (SR-BI, ABCA1, G protein coupled to phospholipases). Defective regulation of either PC-PLC or PC-PLD in response to apoA-I was previously observed in TD cells (20). The same group has also reported later that proteins of the Rho family (RhoA, RhoB, RhoG, Rac-1) are enriched in fibroblasts from TD patients (40), suggesting that G protein- or Rho family protein-dependent coupling of phospholipases was affected by ABCA1 mutations. This concept is supported by our result demonstrating that pertussis toxin (PTx), which inhibits signaling through G protein-dependent activation of PI-PLC, decreased significantly phospholipid efflux induced by apoA-I in stimulated normal cells in a concentration dependent-manner (Fig. 7). We focused on phospholipid efflux, because there is accumulating evidence that ABCA1 may be a phospholipid translocase and may not directly transport cholesterol (41;42). It is well documented that activation of PI-PLC results in the immediate production of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) and diacylglycerol with subsequent activation of PKC, which regulate cellular lipid efflux (14;15). In addition, it was reported that both PLC-mediated  $IP_3$  generation and mobilization of  $Ca^{2+}$ , are regulated through PTx-sensitive,  $G_{\alpha_i}$ -derived  $G\beta\gamma$  subunits rather than through  $G_q$ -coupled mechanisms (43). This observation raises the possibility that ABCA1 may be coupled to both  $G_{\alpha_s}$  and phospholipases, allowing apoA-I to be lipidated through different pathways. Receptor coupling to multiple G proteins, *i.e.* dual coupling or cross-talk, has been observed in several reports. Thus, receptor for LH/CG, cholecystokinin A and TRH can couple to both phospholipase C and AC pathways (44;45). In addition,  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -

AR) was found to couple to both  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_i$ , and protein kinase A-mediated phosphorylation of the  $\beta$ -AR was shown to serve as a switching mechanism to regulate the dual G protein coupling specificity of the receptor (46). Undoubtedly, further work is necessary to establish more definitively a possible functional link between ABCA1 receptor, phospholipases and G protein.

In conclusion, we have found that intracellular cAMP release induced by apoA-I leads to ABCA1 phosphorylation via a PKA-dependent mechanism, most likely involving G protein-coupled to ABCA1 receptor. This mechanism is outlined in the model presented in Fig. 8. This model requires initial apoA-I binding to ABCA1 receptor which couple to  $G\alpha_s$  leading to activation of AC, cAMP production and subsequent PKA-mediated ABCA1 phosphorylation, allowing lipidation of apoA-I. Further elucidation of the molecular interactions between apoA-I/ABCA1/G protein complex should clarify the mechanism by which ABCA1 is involved in the biogenesis of HDL particles and suggest novel therapeutic potential of signaling molecules in preventing or treating atherosclerotic vascular disease.





**Fig. 8. A proposed model of ABCA1 receptor coupling to  $G\alpha_s$ -mediated-activation of adenylyl cyclase (AC) in stimulated fibroblasts.** ApoA-I binding to ABCA1 receptor stimulates  $G\alpha_s$ -mediated activation of AC leading to an increase of cAMP production and, in turn, activates PKA-mediated ABCA1 phosphorylation, allowing the lipidation of apoA-I.

**Table 1. Levels of intracellular cAMP, ABCA1 phosphorylation, specific ApoA-I binding and lipid efflux in normal and ABCA1 deficient stimulated cell lines<sup>†</sup>**

| Cell Line    | Predicted Protein Alteration | Intracellular cAMP levels, fmol/mg cell protein |  | ABCA1 Phosphorylation, % increase | Specific <sup>125</sup> I-ApoA-I Binding, % of control | Cellular Lipid Efflux, % |             |         |
|--------------|------------------------------|---|--|-----------------------------------|--|--------------------------|-------------|---------|
|              |                              | Basal   | + apoA-I <sup>‡</sup> + Forskolin <sup>‡</sup> |                                   |  | Phospholipid             | Cholesterol |         |
| Control, n=3 | -                            | 628±118   | 1140±70 <sup>**</sup>                          | 1289±151 <sup>**</sup>            | 220±29   | 100±2.8                  | 100±6.4     | 100±6.0 |
| TD-1         | C1477R, §                    | 792±13  | 745±108  | 1330±167 <sup>*</sup>             | n. d.  | 22±2.6                   | 25±1.9      | 14±1.6  |
| TD-2         | 2203X                        | 682±106   | 629±80   | 1030±135 <sup>*</sup>             | n. d.  | n. d.                    | 11±1.0      | 5.1±0.5 |
| TD-3         | 2145X                        | 578±25  | 584±13   | 950±87                            | n. d.  | 16±3.7                   | 9.0±0.7     | 7.2±0.5 |

<sup>†</sup> Values have been determined as described under "Experimental Procedures";

<sup>‡</sup> Compared to Basal level, \*\* p<0.001, \* p<0.05;

§ Splice site mutation on the second allele (IVS25+1, G→C), part of the transcript deleted; TD-1 and TD-3, compound heterozygous (mutation on the second allele not determined in TD-3) and TD-2, homozygous for the ABCA1 gene mutation; n. d., not detectable.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors express their thanks to J. Vincent and A. Hasbi for technical assistance and Xenon Genetics Inc. (Burnaby, B.C., Canada) for analysis of ABCA1 gene mutations in study subjects.

## REFERENCES

1. Tall, A. R. (2003) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23**, 710-711
2. Brewer, H. B., Jr. and Santamarina-Fojo, S. (2003) *Am.J.Cardiol.* **91**, 3E-11E
3. Marcil, M., Bissonnette, R., Vincent, J., Krimbou, L., and Genest, J. (2003) *Circulation* **107**, 1366-1371
4. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Hayden, M. R., and . (1999) *Nat.Genet.* **22**, 336-345
5. Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S. M., Roomp, K., Zhang, L. H., Yu, L., Collins, J. A., van Dam, M., Molhuizen, H. O., Loubster, O., Ouellette, B. F., Sensen, C. W., Fichter, K., Mott, S. , Denis, M., Boucher, B., Pimstone, S., Genest, J., Jr., Kastelein, J. J., and Hayden, M. R. (1999) *Lancet* **354**, 1341-1346
6. Batal, R., Tremblay, M., Krimbou, L., Mamer, O., Davignon, J., Genest, J., Jr., and Cohn, J. S. (1998) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18**, 655-664
7. Tall, A. R. (1993) *J.Lipid Res.* **34**, 1255-1274
8. Haidar, B., Denis, M., Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J., Jr. (2002) *J.Lipid Res.* **43**, 2087-2094
9. See, R. H., Caday-Malcolm, R. A., Singaraja, R. R., Zhou, S., Silverston, A., Huber, M. T., Moran, J., James, E. R., Janoo, R., Savill, J. M., Rigot, V., Zhang, L. H., Wang, M., Chimini, G., Wellington, C. L., Tafuri, S. R., and Hayden, M. R. (2002) *J.Biol.Chem* **277**, 41835-41842
10. Goodfellow, H. R., Sardini, A., Ruetz, S., Callaghan, R., Gros, P., McNaughton, P. A., and Higgins, C. F. (1996) *J.Biol.Chem* **271**, 13668-13674
11. Picciotto, M. R., Cohn, J. A., Bertuzzi, G., Greengard, P., and Nairn, A. C. (1992) *J.Biol.Chem* **267**, 12742-12752
12. Deeg, M. A., Bowen, R. F., Oram, J. F., and Bierman, E. L. (1997) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **17**, 1667-1674
13. Mendez, A. J., Oram, J. F., and Bierman, E. L. (1991) *Trans.Assoc.Am.Physicians* **104**, 48-53
14. Li, Q., Tsujita, M., and Yokoyama, S. (1997) *Biochemistry* **36**, 12045-12052
15. Haidar, B., Mott, S., Boucher, B., Lee, C. Y., Marcil, M., and Genest, J., Jr. (2001) *J.Lipid Res.* **42**, 249-257
16. Takahashi, Y. and Smith, J. D. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 11358-11363

17. Alvarez, R. and Daniels, D. V. (1992) *Anal.Biochem.* **203**, 76-82
18. Allouche, S., Polastron, J., and Jauzac, P. (1996) *J.Neurochem.* **67**, 2461-2470
19. Marcil, M., Yu, L., Krimbou, L., Boucher, B., Oram, J. F., Cohn, J. S., and Genest, J., Jr. (1999) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19**, 159-169
20. Walter, M., Reinecke, H., Gerdes, U., Nofer, J. R., Hobbel, G., Seedorf, U., and Assmann, G. (1996) *J.Clin Invest* **98**, 2315-2323
21. Fidge, N. H. (1999) *J.Lipid Res.* **40**, 187-201
22. von Eckardstein, A., Nofer, J. R., and Assmann, G. (2001) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 13-27
23. Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B., and Chimini, G. (1997) *J.Biol.Chem* **272**, 2695-2699
24. Hepler, J. R. and Gilman, A. G. (1992) *Trends Biochem.Sci.* **17**, 383-387
25. Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D., and Dixon, R. A. (1994) *Annu.Rev.Biochem.* **63**, 101-132
26. Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D., and Lefkowitz, R. J. (2002) *Science* **298**, 834-836
27. Ferguson, S. S. (2001) *Pharmacol.Rev.* **53**, 1-24
28. Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M., and Inoue, K. (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 6538-6543
29. Rigot, V., Hamon, Y., Chambenoit, O., Alibert, M., Duverger, N., and Chimini, G. (2002) *J.Lipid Res.* **43**, 2077-2086
30. Tanaka, A. R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K., Ikeda, Y., Kano, F., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Murata, M., Yokoyama, S., and Ueda, K. (2003) *J.Biol.Chem* **278**, 8815-8819
31. Cypess, A. M., Unson, C. G., Wu, C. R., and Sakmar, T. P. (1999) *J.Biol.Chem* **274**, 19455-19464
32. Arora, K. K., Krsmanovic, L. Z., Mores, N., O'Farrell, H., and Catt, K. J. (1998) *J.Biol.Chem* **273**, 25581-25586
33. Cockerill, G. W. and Reed, S. (1999) *Int.Rev.Cytol.* **188**, 257-297
34. Nofer, J. R., Junker, R., Pulawski, E., Fobker, M., Levkau, B., von Eckardstein, A., Seedorf, U., Assmann, G., and Walter, M. (2001) *Thromb.Haemost.* **85**, 730-735

35. Nofer, J. R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., and von Eckardstein, A. (2002) *Atherosclerosis* **161**, 1-16
36. Li, X. A., Titlow, W. B., Jackson, B. A., Giltiay, N., Nikolova-Karakashian, M., Uittenbogaard, A., and Smart, E. J. (2002) *J.Biol.Chem* **277**, 11058-11063
37. Fielding, C. J. and Fielding, P. E. (1995) *J.Lipid Res.* **36**, 211-228
38. Krimbou, L., Marcil, M., Chiba, H., and Genest, J., Jr. (2003) *J.Lipid Res.* **44**, 884-892
39. Krimbou, L., Marcil, M., Davignon, J., and Genest, J., Jr. (2001) *J.Biol.Chem* **276**, 33241-33248
40. Utech, M., Hobbel, G., Rust, S., Reinecke, H., Assmann, G., and Walter, M. (2001) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **280**, 229-236
41. Fielding, P. E., Nagao, K., Hakamata, H., Chimini, G., and Fielding, C. J. (2000) *Biochemistry* **39**, 14113-14120
42. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C., and Tall, A. R. (2001) *J.Biol.Chem* **276**, 23742-23747
43. Luo, X., Zeng, W., Xu, X., Popov, S., Davignon, I., Wilkie, T. M., Mumby, S. M., and Muallem, S. (1999) *J.Biol.Chem* **274**, 17684-17690
44. Herrlich, A., Kuhn, B., Grosse, R., Schmid, A., Schultz, G., and Gudermann, T. (1996) *J.Biol.Chem* **271**, 16764-16772
45. Wu, V., Yang, M., McRoberts, J. A., Ren, J., Seensalu, R., Zeng, N., Dagra, M., Birnbaumer, M., and Walsh, J. H. (1997) *J.Biol.Chem* **272**, 9037-9042
46. Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997) *Nature* **390**, 88-91

## Chapitre 6 : Discussion générale

### 6.1 Altération de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire

La régulation du cholestérol intracellulaire dans les cellules périphériques résulte d'un équilibre entre l'apport du cholestérol par les LDL, la biosynthèse endogène et l'efflux de cholestérol. L'absorption cellulaire du cholestérol est contrôlée par le récepteur des LDL, ainsi que par le récepteur Scavenger, responsable de l'absorption non régulée du cholestérol à partir des LDL oxydées. Donc, les cellules qui accumulent et ne métabolisent pas le cholestérol, doivent se doter d'un système efficace afin d'éliminer l'excès de cholestérol dans la cellule. Lors de ce processus, l'ABCA1, une protéine contrôlée par les niveaux de cholestérol cellulaire, est le transporteur qui a la capacité de moduler les niveaux de cholestérol intracellulaire en stimulant l'efflux de cholestérol vers l'apolipoprotéine A-I. Des mutations dans le gène de l'ABCA1 sont à l'origine de la maladie de Tangier et de la déficience familiale en HDL. Chez les sujets qui en sont affectés, il y a une accumulation d'esters de cholestérol dans les cellules de tissu réticulo-endothélial et une incapacité à effluer le cholestérol intracellulaire vers les particules d'HDL ou d'apoA-I. Cependant, cet efflux actif de cholestérol est dépendant de la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1 et implique des voies de transduction de signaux cellulaires ainsi qu'une translocation des molécules de cholestérol et de phospholipides via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Dans ce modèle, Mendez et al. ont observé que le défaut d'efflux de cholestérol est corrélé avec une altération des fonctions de l'appareil de Golgi (187). De même, le traitement des fibroblastes normaux avec la bréfeldine et le monensin (inhibiteurs de la fonction du Golgi) diminue très fortement l'efflux de cholestérol contrôlé par l'apoA-I ou les HDL (187). L'altération de la fonction de l'appareil de Golgi est probablement due à l'accumulation des esters de cholestérol et à la dégradation accrue des phospholipides observés dans les macrophages des cellules Tangier. En ce sens, une altération de l'homéostasie des lipides rencontrée dans les cellules de Tangier serait associée au défaut de mobilisation vers la membrane plasmique des lipides des structures Golgiennes. Ce défaut serait dépendant de l'ABCA1 et du transport vésiculaire des lipides. En effet, récemment l'équipe de McPherson et al. a montré que l'apoA-I stimule le transport vésiculaire du Golgi vers la membrane plasmique (188). Ce transport nécessite une protéine ABCA1 fonctionnelle ou un mécanisme d'efflux de cholestérol actif. C'est probablement pour cette raison que le défaut moléculaire de l'ABCA1 rencontré dans les cellules de Tangier

a été incapable de provoquer ce même transport vésiculaire (188). Cependant, le mécanisme de participation de l'ABCA1 au transport vésiculaire du Golgi reste toujours à être élucidé. Étant donné que l'appareil de Golgi (surtout le *trans*-Golgi) partage beaucoup de caractéristiques structurales avec la membrane plasmique, il n'est pas exclu que l'ABCA1 soit aussi présent le long du Golgi et influence directement le transport vésiculaire vers la membrane plasmique. Cette théorie a été renforcée par les travaux de Neufeld et al. qui suggèrent l'existence d'un transport par navette d'ABCA1 entre les endosomes, les lysosomes et la membrane plasmique (189). L'ensemble de ces travaux suggère que l'apoA-I puisse initier une cascade de transductions de signaux régulant l'activité de l'ABCA1 à la membrane plasmique ou dans l'appareil de Golgi, stimulant ainsi le transport vésiculaire et l'efflux des molécules de cholestérol.

L'altération de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire rencontrée dans la maladie de Tangier et de FHD provoque l'hypoalphalipoprotéïnémie. D'autres troubles métaboliques provoquent aussi la baisse de la concentration d'HDL plasmatique. C'est le cas de la maladie neurodégénérative de Niemann-Pick de type C (NPC), caractérisée par une accumulation de cholestérol dans les lysosomes et les endosomes (190,191). Au niveau moléculaire, la maladie se caractérise par des mutations de la protéine NPC1 qui facilite le transport du cholestérol des endosomes/lysosomes vers le Golgi et la membrane plasmique (192,193). Récemment, des chercheurs ont mis en évidence que le défaut de transport de cholestérol rencontré chez les patients NPC est le résultat d'une activité réduite de l'ABCA1 dans les fibroblastes (194). Par conséquent, ceci provoque une chute de la concentration de HDL chez 81% des sujets NPC<sup>-/-</sup> étudiés. Ces travaux suggèrent ainsi un lien entre le défaut d'activité de l'ABCA1 et la neurodégénérescence rencontrée dans la maladie de NPC. De plus, le défaut de cholestérol observé dans les neurones (195) et les cellules gliales (196) laisse supposer un défaut d'activité de l'ABCA1 dans le cerveau. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour la compréhension du rôle de l'ABCA1 et du transport du cholestérol dans les cellules nerveuses afin de mieux comprendre certaines maladies neurodégénératives.

Jusqu'à maintenant, l'ABCA1 nous apparaît comme étant la protéine clé dans le contrôle du mouvement du cholestérol cellulaire dans plusieurs types cellulaires ainsi que dans la fabrication des particules HDL. La modulation de cette protéine ouvre la voie au développement d'un traitement contre les maladies cardiovasculaires ainsi que contre toutes autres maladies impliquées dans un défaut de transport du cholestérol.



## 6.2 Modulation de l'efflux de cholestérol par les voies de transduction de signaux

### 6.2.1 Voie de la phosphatidycholine, de la sphingomyéline et de la céramide

En utilisant une méthode de radiomarquage du cholestérol qui enrichie les pools intracellulaires de cholestérol (marquage des cellules durant leur croissance), nous avons démontré un efflux de cholestérol et de phospholipides cellulaires anormalement diminué (50% du niveau des sujets normaux) chez les sujets présentant une déficience familiale en HDL. Cette anomalie est associée à une mobilisation nettement réduite du pool de cholestérol estérifié au cours de la stimulation de l'efflux (197). Ce défaut est semblable à celui rapporté dans la maladie de Tangier (10% du niveau des sujets normaux). L'efflux de cholestérol a été examiné en utilisant l'apoA-I comme accepteur extracellulaire de cholestérol.

Par ailleurs, la désorption (diffusion passive) du cholestérol de la membrane plasmique dans les cellules des patients FHD et de la maladie de Tangier n'est pas affectée. En effet, nous avons démontré que l'efflux de cholestérol généré par les vésicules de sphingomyéline, phosphatidycholine et cyclodextrine, est similaire dans les cellules contrôles ainsi que dans les cellules des sujets affectés (chapitre 3, Fig. 2 et 3). Dans ce processus, il n'existe pas de mécanisme de liaison à un récepteur particulier, mais plutôt une simple diffusion du cholestérol membranaire vers des vésicules de phospholipides ou de cyclodextrine. D'autres part, l'efflux de cholestérol provoqué par l'apoA-I est augmenté dans les trois lignées cellulaires et corrigé dans les cellules de Tangier et FHD par l'addition de vésicules de phosphatidylcholine et de sphingomyéline exogènes. Dans le fibroblaste, approximativement 90% du cholestérol et de la sphingomyéline réside à la membrane plasmique (198). Cette colocalisation est probablement attribuable à la grande affinité du cholestérol pour la sphingomyéline, comparativement aux autres phospholipides (199), capables de provoquer un efflux de cholestérol (200,201). Il est aussi suggéré que la sphingomyéline contribue aux mécanismes de transduction de signaux à travers la sphingomyélinase capable de générer des céramides et des sphingosines. La céramide a été impliquée dans l'activation de certains isoformes de la PKC (202), lesquels sont capables de stimuler la translocation de l'efflux de cholestérol cellulaire (115). Récemment, l'équipe de Davidson et al. a démontré que l'augmentation de la concentration endogène de la céramide augmente l'efflux de cholestérol cellulaire ainsi que la disponibilité de la protéine ABCA1 à la membrane plasmique (203). Ces travaux suggèrent donc l'importance des

sphingolipides dans le transport du cholestérol et dans la régulation du transporteur ABCA1.

### 6.2.2 Voie des phospholipases C et D, et de la PKC

Il a été montré par l'équipe de Walter et al. que les particules HDL<sub>3</sub> ou apoA-I effluent le cholestérol cellulaire par la voie de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (24). Le même groupe a aussi démontré qu'en présence d'apoA-I ou de HDL<sub>3</sub>, les fibroblastes de la maladie de Tangier ont un défaut de mobilisation du cholestérol intracellulaire relié à une altération de l'activité de la PC-PLD et de la PC-PLC (25). Dans cette étude, la production du PA par l'action de la PLD est réduite, tandis que celle du DAG par l'action de la PLC est très augmentée, et ce, dans les fibroblastes de la maladie de Tangier comparativement à ceux des sujets normaux exposés aux mêmes conditions. L'augmentation des niveaux d'acide phosphatidique par l'action d'un inhibiteur de la phosphohydrolase (propranolol) ou par un apport exogène du PA, augmente l'efflux de cholestérol cellulaire activé par l'apoA-I dans les fibroblastes des sujets normaux, FHD et Tangier (chapitre 3, fig. 6). Également, l'anomalie de production de PA et DAG observée dans les cellules de Tangier a été recréée dans des cellules normales en présence de HDL<sub>3</sub> et de la toxine de pertussis (PTx). La PTx bloque l'activation de la PC-PLD régulée par une protéine-G sensible à la toxine et accroît l'activation de la PC-PLC (25). Ces données suggèrent que l'activation de la PLD couplée à des protéines-G, soit associée à l'inhibition de l'activation de la PLC et que le défaut moléculaire de la maladie de Tangier puisse résider au niveau d'un effecteur en amont de la protéine kinase C, responsable de la régulation des phospholipases spécifiques à la phosphatidylcholine et dépendantes de la protéine-G.

Parmi d'autres évidences d'une altération de la voie de transduction de signaux dans les cellules de Tangier, l'équipe de Drobnik et al. (26) a démontré une activation fortement réduite de la PI-PLC dans les fibroblastes de Tangier stimulés par des HDL<sub>3</sub> ou des LDL. De plus, cette altération était accompagnée d'une diminution de la production d'inositol phosphate et de DAG ayant pour effet de réduire la mobilisation du calcium intracellulaire et la translocation de la PKC à la membrane plasmique. Il a aussi été rapporté que la mobilisation d'inositol triphosphate et la libération de calcium intracellulaire par la PI-PLC peuvent être modulées par la protéine G $\alpha_i$  sensible au traitement de la PTx (204). Nos résultats montrent que le traitement des fibroblastes

normaux par cette toxine diminue (à dose dépendante) l'efflux de phospholipides dépendant de l'ABCA1 (chapitre 5, fig. 7). Ces observations suggèrent que la protéine ABCA1 puisse être associée à des phospholipases couplées à des protéines-G, permettant à l'apoA-I d'être lipidée à travers différentes voies de signalisation. Un défaut d'ABCA1 rencontré dans la maladie de Tangier aboutit à un défaut de modulation de ces phospholipases et altère, par conséquent, l'efflux de lipides cellulaires.

Nous avons aussi démontré que la stimulation exogène de la PKC, en présence de DOG ou de PMA, pouvait corriger le défaut de l'efflux de cholestérol observé dans les cellules des sujets FHD et même l'augmenter significativement dans les cellules de la maladie de Tangier. De plus, l'efflux de cholestérol des sujets normaux était très diminué par la présence des inhibiteurs spécifiques de la PKC (calphostine C et GÖ 6976) (chapitre 3, fig. 7). De même, il a été rapporté que la sphingosine pourrait être un inhibiteur de la PKC (205). En effet, nos résultats avec la sphingosine montrent que l'efflux de cholestérol activé par l'apoA-I est complètement réduit dans les cellules des sujets normaux, FHD et Tangier. Enfin, nos résultats concordent avec d'autres études (206,207) démontrant un rôle important de la PKC dans la mobilisation et l'efflux du cholestérol cellulaire.

Bien que son activité ait été impliquée dans la phosphorylation des protéines appartenant à la famille des kinases à activité mitogène (Raf-1 et MEK-1) (98), en réponse au traitement par l'apoA-I ou les HDL, la PKC pourrait aussi activer la PLD et générer le PA (208). L'incubation simultanée de la calphostine C (inhibant la PKC) et du propranolol (augmentant le PA) rétablit le défaut d'efflux de cholestérol inhibé ultérieurement par la calphostine seule (chapitre 3, fig. 7). Ces données démontrent l'importance du PA dans l'efflux du cholestérol cellulaire. Le PA, ainsi que la PLD, sont souvent associés au transport vésiculaire dans l'appareil de Golgi (116,117). De plus, le PA peut être converti en acide lysophosphatidique (LPA) par l'action de la phospholipase A2. Cependant, nous avons trouvé que le LPA diminue l'efflux de cholestérol cellulaire dans les fibroblastes des sujets normaux et FHD, alors qu'il augmente l'efflux dans les cellules de Tangier. De fait, il a été rapporté de façon intéressante que le LPA est capable de moduler une variété de voies de signalisation cellulaire et, plus particulièrement, d'inhiber l'adénylate cyclase membranaire libérant l'AMPc cellulaire (209). À l'heure actuelle, nos données suggèrent que la voie de l'adénylate cyclase et les niveaux d'AMPc cellulaire soient d'une importance majeure

dans la modulation de l'efflux du cholestérol activé par l'apoA-I (tel que discuté plus bas). Ainsi, nos observations de la diminution de l'efflux de cholestérol en présence du LPA pourrait être attribuable à l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase dans les fibroblastes de sujets normaux et ceux de la déficience familiale en HDL en présence d'une activité résiduelle de l'ABCA1. Cependant, cet effet inhibiteur serait absent des fibroblastes de Tangier dû à une activité résiduelle de l'ABCA1 insuffisante ou absente.

L'ensemble de ces résultats suggère l'importance de la voie de la PLC, de la PLD et de la PKC dans la signalisation cellulaire et la modulation de l'efflux du cholestérol cellulaire. Ces voies appartiennent aux séries d'événements reliés à l'activation de l'efflux du cholestérol cellulaire et initiées par l'interaction entre l'apoA-I et l'ABCA1. Un défaut de cette interaction aurait des conséquences importantes dans les voies métaboliques responsables du transport du cholestérol cellulaire à la membrane plasmique.

### 6.2.3 Rôle de l'AMPc cellulaire dans la phosphorylation de l'ABCA1

Bien que la voie de la protéine kinase C apparaisse clairement impliquée dans le processus de transduction de signaux, la voie de la protéine kinase A dépendante de l'AMPc pourrait également être impliquée dans la modulation du transport intracellulaire du cholestérol. L'implication de l'AMPc dans la modulation de l'ABCA1 ainsi que dans l'efflux du cholestérol cellulaire a fait l'objet de nombreuses investigations. L'AMPc a été reconnue comme étant capable de promouvoir l'efflux de cholestérol cellulaire activé par l'apoA-I dans les macrophages humains (129). De plus, il a été démontré par Hokland et al. (131) qu'une augmentation de l'AMPc cellulaire provoquait la translocation à la membrane plasmique de stérols nouvellement synthétisés. Aussi, nos résultats démontrent que l'AMPc cellulaire augmente l'efflux de cholestérol cellulaire activé par l'apoA-I dans les fibroblastes des sujets normaux. Les niveaux cellulaires d'AMPc étaient augmentés par l'addition d'un activateur de l'adénylcyclase (forskoline) ou d'un inhibiteur de la phosphodiesterase (IBMX) (chapitre 4, fig.1). Par ailleurs, la diffusion passive du cholestérol membranaire n'était pas augmentée par le traitement à l'AMPc en présence de molécules de cyclodextrine (chapitre 4, fig.1B). L'augmentation de l'efflux du cholestérol cellulaire, induit par l'AMPc, n'était pas dû à l'augmentation de l'ARNm ou de la protéine ABCA1, ni à l'hydrolyse des esters de cholestérol dans les fibroblastes (chapitre 4, fig. 2 et 3). Cependant, dans les macrophages, la présence

d'AMPc augmentait à la fois l'expression de l'ABCA1, l'efflux de cholestérol, la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1 (28,30) ainsi que l'hydrolyse des esters de cholestérol par l'enzyme NCEH (210). Il semble donc que l'AMPc cellulaire exerce une régulation différentielle selon le type cellulaire. Il est probable que les macrophages, cellules accumulant le cholestérol cellulaire et à risque de devenir spumeuses, puissent se doter de mécanismes efficaces leur permettant d'évacuer une surcharge de cholestérol intracellulaire. Ces données suggèrent que dans les fibroblastes, l'AMPc module l'efflux de cholestérol cellulaire par des mécanismes de régulation post-transcriptionnels, activant ainsi une ou des protéines clés dans le processus de translocation du cholestérol intracellulaire contrôlé par l'apoA-I.

Tel que mentionné précédemment, l'ABCA1 est une protéine composée de douze domaines transmembranaires et deux domaines intracytoplasmiques nommés *Nucleotide Binding Fold* (NBF). Elle est responsable de l'hydrolyse de l'ATP, une source d'énergie nécessaire à l'activité du transporteur (211). Les domaines NBF contiennent des séquences conservées pour la liaison de l'ATP (21), lesquelles forment un contact avec le phosphate  $\beta$  et  $\delta$  de l'ATP (212). Des études démontrent que le transporteur CFTR subit une régulation par phosphorylation grâce à des résidus sérine / thréonine localisés dans les domaines NBF (213). Pour la première fois, nous démontrons que l'ABCA1 est une phosphoprotéine induite par l'AMPc. La phosphorylation de l'ABCA1 a été observée dans les premières minutes d'incubation avec l'AMPc ou la forskoline (chapitre 4, fig.4) et apparaît corrélée avec la fonction de l'ABCA1, responsable de l'efflux de cholestérol (chapitre 4, fig.1). Sachant que la protéine ABCA1 contient également des sites consensus de la phosphorylation par la PKA (214) dans les deux domaines intracellulaires, il est intéressant de constater que la phosphorylation est augmentée en présence d'acide okadaïque (OA), un inhibiteur des phosphatases sérine / thréonine (chapitre 5, fig. 1). De plus, nous montrons que l'incubation de la sous-unité catalytique de la PKA provoque la phosphorylation de l'ABCA1 immunoprécipité par un anticorps spécifique à l'ABCA1 (chapitre 5, fig. 6). Aussi, la présence de l'inhibiteur de la PKA, le H-89, dans des fibroblastes chargés en cholestérol, inhibe à la fois la phosphorylation et l'efflux de cholestérol provoqués par l'apoA-I (chapitre 4, fig. 5). Suite à la publication de ces données (chapitre 4), l'équipe de Hayden et ses collaborateurs ont identifié les sites de phosphorylation de la PKA (215), soit la sérine 1042 (Ser 1042) et la sérine 2054 (Ser 2054), localisées dans les motifs *walker A* et *B*

de l'ABCA1, sites préférentiels de phosphorylation par la PKA. La mutation de la Ser 2054 abolissait l'efflux de cholestérol cellulaire dans les macrophages RAW et dans les cellules embryonnaires humaines des reins, alors que la mutation de la Ser 1042 n'affectait pas l'activité de l'ABCA1. L'ensemble de ces données suggère l'implication de la PKA dans le processus de phosphorylation de l'ABCA1 et de l'efflux du cholestérol cellulaire. Puisqu'il est généralement admis que l'AMPc est le principal médiateur de la protéine kinase A, nous suggérons donc que la voie de la PKA dépendante de l'AMPc contrôle la fonction de l'ABCA1 par un mécanisme de phosphorylation fréquemment rencontré parmi d'autres transporteurs ABC, tel le CFTR et le P-glycoprotéine (213,216).

À la différence des fibroblastes des sujets normaux, les cellules de Tangier étaient incapables de stimuler l'efflux de cholestérol par la présence d'AMPc ou de forskoline (chapitre 4, fig. 6A). De même, malgré la présence de la protéine dans les fibroblastes de Tangier, la phosphorylation de l'ABCA1 était altérée (chapitre 4, fig. 6B). Cependant, l'AMPc et la forskoline arrivaient à corriger l'efflux de cholestérol et la phosphorylation de l'ABCA1 dans les fibroblastes des sujets FHD. Ces données suggèrent qu'un seul allèle fonctionnel du gène de l'ABCA1 soit suffisant pour augmenter l'efflux de cholestérol ainsi que la phosphorylation de la protéine par l'AMPc cellulaire.

Le défaut de phosphorylation de l'ABCA1, corrélé avec le défaut d'efflux de cholestérol dans les cellules de Tangier, peut être dû à un défaut d'activation de la PKA ou d'un repliement (*folding*) de la protéine affectant les sites de phosphorylation Ser/Thr. En ce sens, une étude récente démontre que des mutations de l'ABCA1 causent la maladie de Tangier et altèrent la translocation de la protéine à la surface de la cellule, et ce, probablement par un défaut de *folding* de la protéine (217). Des défauts de *folding* identifiés dans certains mutants du transporteur CFTR (ABCC7) causent la fibrose kystique (218). Beaucoup d'efforts ont été déployés afin d'explorer les différents mécanismes pouvant corriger les défauts de *folding* des mutants CFTR. Il est aussi rapporté que la substitution du Trp1254 par un Ala et Cys altère la fonction du *multidrug resistance protein 2* (ABCAC2) (219).

Nos données démontrent que l'augmentation de l'efflux du cholestérol cellulaire activé par l'apoA-I concorde avec celle de la phosphorylation de l'ABCA1 dans les premières heures de stimulation par l'AMPc. De même, un défaut de stimulation de l'efflux de cholestérol par l'AMPc, observé dans les fibroblastes des sujets de la maladie de

Tangier, apparaît aussi corrélé avec un défaut de phosphorylation de l'ABCA1. De plus, le fait que le H-89 inhibe à la fois la phosphorylation basale de l'ABCA1 et l'efflux de cholestérol activé par l'apoA-I (chapitre 4, fig. 5 A et B), signifie que la PKA contrôle la fonction de l'ABCA1 à l'état physiologique normal. De plus, il est intéressant de constater que la PKA contrôle aussi l'ABCA1 exprimée dans les ovocytes de *Xenopus* par un mécanisme de phosphorylation dépendante de l'AMPc cellulaire (220).

D'autre part, l'implication de la PKC n'a pas encore fait l'objet d'investigations poussées des mécanismes de phosphorylation de l'ABCA1 dans les cellules de la maladie de Tangier ou de la déficience familiale en HDL. Par ailleurs, nos résultats préliminaires montrent que l'activation de la PKC par le PMA augmente la phosphorylation de l'ABCA1, et ceci, parallèlement à l'augmentation de l'efflux de cholestérol tel que discuté précédemment. De plus, la sous unité catalytique de la PKC a été incapable de phosphoryler l'ABCA1 dans un système *in vitro* (résultat non présenté) comparativement à la sous unité catalytique de la PKA, qui elle, a réussi la phosphorylation (chapitre 5). À partir de ces données, nous suggérons que la voie de la PKC soit une voie alternative au mécanisme de phosphorylation de l'ABCA1. Plus précisément, la PKC pourrait moduler l'activité de la PKA tel que proposé par l'équipe de Dahan et al. dans le modèle de phosphorylation du CFTR (221). Des travaux additionnels seront nécessaires afin de déterminer la contribution seule de la PKC dans la modulation de l'ABCA1 et l'efflux de cholestérol cellulaire.

L'ensemble de ces travaux propose que la phosphorylation de l'ABCA1 agisse comme élément clé dans le processus de transduction de signaux, modulant le transport du cholestérol dans les fibroblastes et impliquant principalement la voie de la PKA.

### **6.3 Mécanismes de régulation de l'efflux du cholestérol par l'apoA-I**

Nos résultats présentés au chapitre 4 supportent l'hypothèse que l'apoA-I stimule l'efflux de cholestérol cellulaire principalement par la voie de la PKA dépendante de l'AMPc, provoquant ainsi la régulation de l'ABCA1 par phosphorylation. L'expression de l'ABCA1 cellulaire est contrôlée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (31). Dans cette étude, nous avons montré que l'apoA-I stimule la phosphorylation de son récepteur ABCA1 (chapitre 5, fig. 2A), et que l'augmentation de la masse de ce

récepteur par le 22-OH et le 9-CRA (cellules stimulées) augmente sa phosphorylation (chapitre 5, fig. 2B). La phosphorylation maximale de l'ABCA1 est atteinte après une heure de stimulation avec 10 µg/mL d'apoA-I, indiquant ainsi que tous les sites de phosphorylation présents sur l'ABCA1 sont saturés. De plus, le H-89 abolit complètement la phosphorylation de l'ABCA1 (chapitre 5, fig. 5) et l'efflux de cholestérol cellulaire (chapitre 4, fig. 5) stimulés par l'apoA-I. Ces résultats démontrent que l'apoA-I induit la phosphorylation de l'ABCA1 et l'efflux de cholestérol cellulaire par la voie de la PKA dépendante de l'AMPc. Dans cette thèse, nous suggérons que l'apoA-I (le ligand) contrôle l'activité de l'ABCA1 (le récepteur). Ce concept concorde avec des études récentes suggérant que l'apoA-I augmente la concentration de l'ABCA1 à la surface de la cellule, et ce, en stabilisant la protéine par inhibition des protéases calpines protéosomiales contrôlées par la séquence PEST de l'ABCA1 (32,33).

Parallèlement, nous avons trouvé que le traitement de l'apoA-I augmente dramatiquement les niveaux d'AMPc cellulaire. Cette augmentation est dépendante de l'ABCA1. En effet, dans les cellules non stimulées par des agonistes du facteur de transcription LXR/RXR, l'augmentation de la concentration de l'apoA-I ne stimule pas la libération de l'AMPc cellulaire, comparativement à l'état basal (chapitre 5, fig. 4A). Par contre, dans les cellules stimulées (niveau d'ABCA1 augmenté de quatre fois), l'apoA-I provoque une augmentation rapide de l'AMPc cellulaire de 100% (chapitre 5, fig. 4A et B). Ces données suggèrent que le niveau d'AMPc intracellulaire induit par l'action de l'apoA-I dans les fibroblastes stimulés reflète l'activation de la protéine  $G_{\alpha s}$ , un activateur physiologique de l'adénylate cyclase (chapitre 5, fig. 4B). Ainsi, le niveau d'expression de l'ABCA1 contrôle la libération de l'AMPc intracellulaire dans les fibroblastes de sujets normaux. Cependant, dans les cellules endothéliales humaines, n'exprimant pas le récepteur ABCA1, l'apoA-I est incapable de provoquer une libération d'AMPc (données non présentées).

Il est bien établi qu'une variété d'hormones, de cytokines, de neurotransmetteurs et de facteurs de croissance se fixent à des récepteurs membranaires couplés aux protéines-G hétérotrimériques (GPCRs), conduisant ainsi à l'activation d'une voie de signalisation qui produit un effet biologique au niveau de la cellule. Une fois activées, les GPCRs induisent la libération d'un second messager tel que l'AMPc (222). Dans ce contexte, nous avons démontré, grâce à des méthodes de radiomarquage à l'iode 125,



que l'<sup>125</sup>I-apoA-I se lie à l'ABCA1 dans les fibroblastes stimulés (chapitre 5, Table I). De plus, nous avons observé que les concentrations d'apoA-I, au-dessus de 10 µg/mL, diminuent de façon significative la production d'AMPc cellulaire (chapitre 5, fig.4A). Cette diminution de l'AMPc est possiblement due au phénomène de découplage de la protéine-G ou à la désensibilisation du récepteur ABCA1. Une étude intéressante de Lefkowitz et ses collaborateurs (223) montre que le récepteur β-adrénergique, capable de produire l'AMPc, est vite désensibilisé après phosphorylation, ceci, en recrutant les protéines β-arrestine et en dégradant l'AMPc cellulaire. Dans cette étude, la β-arrestine inhibe le recrutement supplémentaire des protéines G et fait appel à la phosphodiesterase de la membrane plasmique des cellules de mammifères.

L'hypothèse des complexes d'interaction entre l'apoA-I, le récepteur ABCA1 et les protéines-G est supportée par nos résultats démontrant que la production de l'AMPc et la phosphorylation de l'ABCA1 sont altérées dans les fibroblastes des sujets de la maladie de Tangier (chapitre 5, table I). Nous suggérons alors que la fonction de l'ABCA1 soit essentielle au couplage des protéines-G, ou, alternativement, que les caractéristiques structurales de la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1 peuvent affecter directement l'interaction aux protéines-G. En effet, nos résultats supportent ces deux possibilités. Tout d'abord, la liaison spécifique de l'apoA-I à l'ABCA1 est altérée dans les fibroblastes des patients de la maladie de Tangier (chapitre 5, table I), suggérant que le récepteur ABCA1 mutant puisse altérer la liaison avec l'apoA-I, la production de l'AMPc, sa propre phosphorylation par la PKA, ainsi que l'activation de l'efflux de lipides (chapitre 5, table I). Cependant, l'activation de l'adénylate cyclase par la forskoline ainsi que la phosphorylation de l'ABCA1 par la sous unité catalytique de la PKA ne sont pas affectées dans les cellules étudiées de trois patients atteints de la maladie de Tangier (chapitre 5, table I). Bien que les fibroblastes de ces trois patients expriment normalement la protéine ABCA1, la localisation de l'ABCA1 à la membrane plasmique n'a pas été investiguée dans le présent travail (chapitre 5, fig. 6). Il a été rapporté que la mutation de l'ABCA1 (C1477R) dans la deuxième boucle extracellulaire, associée à la maladie de Tangier, n'affectait pas la localisation de l'ABCA1 à la membrane plasmique, mais diminuait à la fois la liaison de l'apoA-I et l'efflux de lipides cellulaires (224). De plus, l'équipe de Fitzgerald et ses collaborateurs ont démontré que la mutation W590S de l'ABCA1 n'altérait pas la liaison de l'apoA-I, mais diminuait fortement l'efflux de cholestérol cellulaire stimulé par l'apoA-I (217). L'ensemble de ces données suggère

que, bien que la liaison du complexe apoA-I / ABCA1 soit nécessaire à la stimulation de l'efflux du cholestérol cellulaire, l'ABCA1 doit contenir un domaine spécifique pour l'interaction avec des protéines-G, activant ainsi l'adénylate cyclase et la phosphorylation de l'ABCA1. Dans ce modèle, il a été rapporté que des mutations dans les boucles intracellulaires i2 et i3 du récepteur au glucagon n'affecte pas la liaison du glucagon, mais abolit la production de l'AMPc intracellulaire (225). Dans cette étude, les auteurs soulignent l'importance des boucles i2 et i3 dans l'activation et le couplage aux protéines G du récepteur au glucagon. Des études similaires montrent que la production de l'AMPc contrôlée par les protéines-G est altérée par des substitutions d'acides aminés dans le domaine carboxyterminale du récepteur libérant la gonadotropine (226). Des investigations futures seront nécessaires afin de caractériser les différentes protéines-G ainsi que leurs domaines d'interaction avec l'ABCA1.

Sur la base de nos données, nous proposons le modèle suivant de mécanismes de régulation de l'efflux du cholestérol par l'apoA-I (chapitre 5, fig. 8): 1) l'apoA-I lie le récepteur ABCA1 et probablement active les protéines  $G\alpha_s$ ; 2) ces dernières stimulent l'activité de l'adénylate cyclase qui 3) génère l'AMPc intracellulaire; 4) l'augmentation des niveaux d'AMPc cellulaire provoque l'activation de la PKA et la phosphorylation de l'ABCA1; enfin, 5) la phosphorylation de l'ABCA1 modulée par l'apoA-I stimule l'efflux de cholestérol cellulaire et permet la lipodation de l'apoA-I et la génération des particules HDL naissantes.

La modulation de l'ABCA1 et l'augmentation de l'efflux de cholestérol, surtout dans les macrophages, représentent un nouvel outil potentiel de traitement contre l'athérosclérose. Les activateurs de facteurs de transcription LXR/RXR sont un exemple d'augmentation de la transcription de l'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol dans une variété de types cellulaires. Ces activateurs augmentent aussi la transcription d'autres gènes impliqués dans l'efflux et le transport du cholestérol (revue détaillée dans (227)). De plus, il a été rapporté que le ligand synthétique de LXR inhibe le développement de l'athérosclérose chez la souris (228). Cependant, les activateurs de LXR/RXR augmentent aussi la transcription des facteurs de transcription SREBP ainsi que leurs gènes cibles, provoquant souvent l'hypertriglycéridémie (229,230).

Par ailleurs, dans cette thèse, nous proposons que la modulation post-transcriptionnelle de l'ABCA1 par phosphorylation représente une autre voie essentielle pour la régulation de l'efflux du cholestérol cellulaire. Des investigations plus poussées permettront de trouver des protéines qui interagissent localement et spécifiquement avec l'ABCA1, tel que les inhibiteurs des protéases de calpain (231) ou d'autres inhibiteurs de phosphatases Ser / Thr. D'autre part, de petites molécules ou peptides qui miment l'action de l'apoA-I peuvent stabiliser le transporteur ABCA1, probablement par un mécanisme de phosphorylation ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques importantes dans le champ de développement des médicaments contre les maladies cardiovasculaires.

## Conclusion

Une diminution de la concentration plasmatique du cholestérol est fréquemment retrouvée chez les patients avec maladie coronarienne précoce. Le concept actuel consiste à augmenter les concentrations de cholestérol-HDL et stimuler la voie de retour du cholestérol cellulaire en excès, des tissus périphériques vers le foie. La protéine ABCA1 joue un rôle essentiel dans le transport et d'efflux du cholestérol et des phospholipides dans une large variété cellulaire. Sa découverte, en 1999, a suscité beaucoup d'intérêt et un nombre considérable (près de 250) de publications de recherche dans le domaine de l'athérosclérose. Des études de biologie cellulaire associées à des recherches cliniques ont montré que le transporteur ABCA1 s'avère une protéine majeure, à la fois dans l'élimination du cholestérol en excès dans macrophages et la maturation des particules HDL. Puisque l'accumulation du cholestérol dans les macrophages de la paroi artérielle constitue l'un des événements athérogènes majeurs et que les HDL possèdent des nombreuses propriétés antiathérogènes, l'activité de l'ABCA1 peut avantageusement influencer la progression ou la régression de maladies cardiovasculaires. Des travaux futurs sur des modèles animaux bien caractériser nous permettront de mieux comprendre la participation de l'ABCA1 à l'efflux du cholestérol cellulaire et la maturation des particules HDL.

Dans cette thèse, il fut mis en évidence un mécanisme de régulation de l'activité de l'ABCA1, permettant de moduler son activité de transporteur de cholestérol et de phospholipides. Ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'ABCA1 est contrôlée par la phosphorylation de l'ABCA1, dépendante de la PKA. De plus, grâce à des études fonctionnelles de l'ABCA1 dans les fibroblastes de sujets normaux, avec déficience familiale en HDL ou maladie de Tangier, nous avons réussi à identifier une série d'événements biochimiques essentiels à la translocation du cholestérol intracellulaire et la lipidation de l'apoA-I. Premièrement, nous avons démontré la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1. Cette liaison cause l'augmentation rapide des niveaux d'AMPc cellulaire et la phosphorylation la protéine ABCA1 par la PKA. De plus, nos données suggèrent fortement l'implication des protéines-G hétérotrimériques, plus particulièrement les protéines Gas, dans le couplage à l'ABCA1. Nos données suggèrent également un trouble dans la cascade de transduction des signaux

provoquant un défaut d'efflux du cholestérol cellulaire causant le phénotype cellulaire de la maladie de Tangier et la déficience familiale en HDL.

Il est rapporté que la liaison des particules HDL ou de l'apoA-I à la surface de la cellule permet l'activation des voies de transductions cellulaires, notamment l'activation des phospholipases C et D, qui lient vraisemblablement des protéines-G, et l'activation de la PKC. L'activité de ces phospholipases, ainsi que les produits qui en génèrent, apparaissent altérés dans les cellules de la maladie de Tangier. Dans cette thèse, il fut aussi démontré qu'un efflux déficient de cholestérol retrouvé dans la déficience familiale en HDL et la maladie de Tangier peut être corrigé par des agents pharmacologiques exogènes ou endogènes ou des produits d'hydrolyse des phospholipides agissant dans la voie de signalisation cellulaire. De plus, grâce à l'effet d'activateurs et d'inhibiteurs de la PKC, nous avons mis en évidence l'importance de cette kinase dans la stimulation de l'efflux du cholestérol cellulaire. Des études additionnelles seront toutefois nécessaires pour déterminer la contribution spécifique de la PKC à la modulation de l'ABCA1 et l'efflux du cholestérol cellulaire.

Finalement, nos données supportent le concept qu'une interaction entre l'apoA-I et l'ABCA1 déclenche l'efflux de cholestérol et phospholipides par la phosphorylation de l'ABCA1 à la surface de la cellule, impliquant des mécanismes de signalisation intracellulaire. Par des techniques biochimiques et d'études cellulaires, nous avons défini des mécanismes cellulaires impliqués dans un désordre métabolique du cholestérol. Ces données ouvre des perspectives nouvelles au traitement des dyslipoprotéïnémies, à la fois pour le traitement de déficiences en HDL et d'autres désordres lipidiques impliquant une hypoalphalipoprotéïnémie. Bien que les bénéfices d'une augmentation thérapeutiques des niveaux de HDL par la voie de l'ABCA1 n'ont pas fait l'objet d'évaluation, il est permis de croire que cette nouvelle piste d'intervention cellulaire puisse composer une nouvelle classe d'agents pharmacologiques prometteurs.

Le défi des prochaines années visera l'identification et l'étude de nouveaux gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides ainsi que le développement de nouvelles molécules pouvant moduler la régulation de ces gènes et influencer le développement et la progression de la maladie coronarienne athéroscléreuse à des fins thérapeutiques ou de préventions.

## Bibliographie

1. Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., and Lusis, A.J. 1995. Atherosclerosis: Basic Mechanisms : Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation* 91:2488-2496.
2. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, and McNamara PM. 1971. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med.* 74:1-12.
3. Ross R. 1986. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med.* 314:488-500.
4. Lipid Research Clinics Program. 1984. *JAMA* 252:2545-2548.
5. Miller GJ and Miller NE. 1975. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1:16-19.
6. Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, and Castelli WP. 1988. High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham Study. *Arteriosclerosis* 8:207-211.
7. Genest, J.J., Jr., Martin-Munley, S.S., McNamara, J.R., Ordovas, J.M., Jenner, J., Myers, R.H., Silberman, S.R., Wilson, P.W., Salem, D.N., and Schaefer, E.J. 1992. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 85:2025-2033.
8. 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.
9. Gotto, A.M., Jr. 1991. Rationale for treatment. *Am. J. Med.* 91:31S-36S.
10. Mahaney, M.C., Blangero, J., Rainwater, D.L., Comuzzie, A.G., VandeBerg, J.L., Stern, M.P., MacCluer, J.W., and Hixson, J.E. 1995. A Major Locus Influencing Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in the San Antonio Family Heart Study : Segregation and Linkage Analyses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1730-1739.
11. Heiba IM, DeMeester CA, Xia YR, Diep A, George VT, Amos CI, Srinivasan SR, Berenson GS, Elston RC, and Lusis AJ. 1993. Genetic contributions to quantitative lipoprotein traits associated with coronary artery disease: analysis of a large pedigree from the Bogalusa Heart Study. *Am J Med Genet* 47:875-883.
12. Fievét, C., Nuttens, M.C., Ducimetière, P., Fruchart, J.C., Bertrand, M., and Salomez, J.L. 1991. Relation of arteriographically defined coronary artery disease to serum lipoprotein particles mapped with monoclonal antibodies. *Circulation* 84:153-159.

13. Plump,A.S., Scott,C.J., and Breslow,J.L. 1994. Human Apolipoprotein A-I Gene Expression Increases High Density Lipoprotein and Suppresses Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *PNAS* 91:9607-9611.
14. Emmerich,J., Verges,B., Tauveron,I., Rader,D., Santamarina-Fojo,S., Shaefer,J., Ayrault-Jarrier,M., Thieblot,P., and Brewer,H.B., Jr. 1993. Familial HDL deficiency due to marked hypercatabolism of normal apoA-I. *Arterioscler.Thromb.* 13:1299-1306.
15. Rader,D.J., Ikewaki,K., Duverger,N., Feuerstein,I., Zech,L., Connor,W., and Brewer,H.B., Jr. 1993. Very low high-density lipoproteins without coronary atherosclerosis. *Lancet* 342:1455-1458.
16. Cheung,M.C., Mendez,A.J., Wolf,A.C., and Knopp,R.H. 1993. Characterization of apolipoprotein A-I- and A-II-containing lipoproteins in a new case of high density lipoprotein deficiency resembling Tangier disease and their effects on intracellular cholesterol efflux. *J Clin.Invest* 91:522-529.
17. Bodzioch,M., Orso,E., Klucken,J., Langmann,T., Bottcher,A., Diederich,W., Drobnik,W., Barlage,S., Buchler,C., Porsch-Ozcurumez,M. *et al.* 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat.Genet.* 22:347-351.
18. Batal,R., Tremblay,M., Krimbou,L., Mamer,O., Davignon,J., Genest,J.Jr., and Cohn,J.S. 1998. Familial HDL deficiency characterized by hypercatabolism of mature apoA-I but not proapoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:655-664.
19. Brooks-Wilson,A., Marcil,M., Clee,S.M., Zhang,L.H., Roomp,K., van Dam,M., Yu,L., Brewer,C., Collins,J.A., Molhuizen,H.O. *et al.* 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat.Genet.* 22:336-345.
20. Rust,S., Rosier,M., Funke,H., Real,J., Amoura,Z., Piette,J.C., Deleuze,J.F., Brewer,H.B., Duverger,N., Deneffe,P. *et al.* 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat.Genet.* 22:352-355.
21. Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J., and Gay,N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1:945-951.
22. Marcil,M., Bissonnette,R., Vincent,J., Krimbou,L., and Genest,J. 2003. Cellular Phospholipid and Cholesterol Efflux in High-Density Lipoprotein Deficiency. *Circulation* 107:1366.
23. Lange,Y. 1991. Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J Lipid Res* 32:329-339.

24. Walter,M., Reinecke,H., Nofer,J.R., Seedorf,U., and Assmann,G. 1995. HDL3 stimulates multiple signaling pathways in human skin fibroblasts. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15:1975-1986.
25. Walter,M., Reinecke,H., Gerdes,U., Nofer,J.R., Hobbel,G., Seedorf,U., and Assmann,G. 1996. Defective regulation of phosphatidylcholine-specific phospholipases C and D in a kindred with Tangier disease. Evidence for the involvement of phosphatidylcholine breakdown in HDL-mediated cholesterol efflux mechanisms. *J Clin.Invest* 98:2315-2323.
26. Drobnik,W., Mollers,C., Resink,T., and Schmitz,G. 1995. Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in response to HDL3 and LDL is markedly reduced in cultured fibroblasts from Tangier patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15:1369-1377.
27. Mendez,A.J., Oram,J.F., and Bierman,E.L. 1991. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor- dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol.Chem.* 266:10104-10111.
28. Oram,J.F., Lawn,R.M., Garvin,M.R., and Wade,D.P. 2000. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J.Biol.Chem.* 275:34508-34511.
29. Abe-Dohmae,S., Suzuki,S., Wada,Y., Aburatani,H., Vance,D.E., and Yokoyama,S. 2000. Characterization of apolipoprotein-mediated HDL generation induced by cAMP in a murine macrophage cell line. *Biochemistry* 39:11092-11099.
30. 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.
31. Wang,N. and Tall,A.R. 2003. Regulation and Mechanisms of ATP-Binding Cassette Transporter A1-Mediated Cellular Cholesterol Efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1178.
32. Arakawa,R. and Yokoyama,S. 2002. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol.Chem.* 277:22426-22429.
33. Wang,N., Chen,W., Linsel-Nitschke,P., Martinez,L.O., Agerholm-Larsen,B., Silver,D.L., and Tall,A.R. 2003. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin.Invest* 111:99-107.
34. Wilson,P.W., Garrison,R.J., Castelli,W.P., Feinleib,M., McNamara,P.M., and Kannel,W.B. 1980. Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterol. *Am.J Cardiol.* 46:649-654.



35. Genest,J.Jr., Bard,J.M., Fruchart,J.C., and Schaefer,E.J. 1993. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 13:1728-1737.
36. Assmann,G., Schulte,H., von Eckardstein,A., and Huang,Y. 1996. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 124:Suppl-20.
37. Parra,H.J., Arveiler,D., Evans,A.E., Cambou,J.P., Amouyel,P., Bingham,A., McMaster,D., Schaffer,P., Douste-Blazy,P., Luc,G. *et al.* 1992. A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler.Thromb.* 12:701-707.
38. Goldbourt,U., Yaari,S., and Medalie,J.H. 1997. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17:107-113.
39. Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, and Schaefer EJ. 1991. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 67:1185-1189.
40. Castelli,W.P., Garrison,R.J., Wilson,P.W., Abbott,R.D., Kalousdian,S., and Kannel,W.B. 1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 256:2835-2838.
41. Laakso,M., Lehto,S., Penttila,I., and Pyorala,K. 1993. Lipids and lipoproteins predicting coronary heart disease mortality and morbidity in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Circulation* 88:1421-1430.
42. Kuller,L.H., Hulley,S.B., Laporte,R.E., Neaton,J., and Dai,W.S. 1983. Environmental determinants, liver function, and high density lipoprotein cholesterol levels. *Am.J.Epidemiol.* 117:406-418.
43. Cooper,A.D. 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J.Lipid Res.* 38:2173-2192.
44. Hayden MR and Henderson HE. 1999. The molecular biology and genetics of human lipoprotein lipase. *Lipoproteins in Health and Disease*. London: Oxford University Press , 247-260.
45. Beisiegel,U., Weber,W., Ihrke,G., Herz,J., and Stanley,K.K. 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341:162-164.
46. Hussain,M.M., Maxfield,F.R., Mas-Oliva,J., Tabas,I., Ji,Z.S., Innerarity,T.L., and Mahley,R.W. 1991. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J.Biol.Chem.* 266:13936-13940.

47. Karpe F, Steiner G, Uffelman K, Olivecrona T, and Hamsten A. 1994. Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 106:83-97.
48. Dammerman, M. and Breslow, J.L. 1995. Genetic Basis of Lipoprotein Disorders. *Circulation* 91:505.
49. Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J., and Yamamoto, T. 1992. Rabbit Very Low Density Lipoprotein Receptor: A Low Density Lipoprotein density Receptor-Like Protein with Distinct Ligand Specificity. *PNAS* 89:9252-9256.
50. Sherrill, B.C., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. 1980. Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. Identity with the chylomicron remnant transport process. *J. Biol. Chem.* 255:1804-1807.
51. Windler, E.E., Kovanen, P.T., Chao, Y.S., Brown, M.S., Havel, R.J., and Goldstein, J.L. 1980. The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J. Biol. Chem.* 255:10464-10471.
52. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
53. Li, Z., McNamara, J.R., Ordovas, J.M., and Schaefer, E.J. 1994. Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res.* 35:1698-1711.
54. Cabezas, M.C., Van Heusden, G.P., de Bruin, T.W., Van Beckhoven, J.R., Kock, L.A., Wirtz, K.W., and Erkelens, D.W. 1993. Reverse cholesterol transport: relationship between free cholesterol uptake and HDL3 in normolipidaemic and hyperlipidaemic subjects. *Eur. J Clin. Invest* 23:122-129.
55. de Beer, M.C., Durbin, D.M., Cai, L., Mirocha, N., Jonas, A., Webb, N.R., de Beer, F.C., and Der Westhuyzen, D.R. 2001. Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high density lipoprotein by scavenger receptor BI. *J Biol. Chem.* 276:15832-15839.
56. Liscum, L. 2000. Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam. *Traffic.* 1:218-225.
57. Ory, D.S. 2000. Niemann-Pick type C: a disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:331-339.
58. Simons, K. and Ikonen, E. 2000. How Cells Handle Cholesterol. *Science* 290:1721-1726.
59. Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. 2002. *J Clin Invest.* 109:1125-1131

60. Bachorik,P.S., Franklin,F.A., Virgil,D.G., and Kwiterovich,P.O., Jr. 1982. High-affinity uptake and degradation of apolipoprotein E free high- density lipoprotein and low-density lipoprotein in cultured porcine hepatocytes. *Biochemistry* 21:5675-5684.
61. Chen,Y.D., Kraemer,F.B., and Reaven,G.M. 1980. Identification of specific high density lipoprotein-binding sites in rat testis and regulation of binding by human chorionic gonadotropin. *J Biol.Chem.* 255:9162-9167.
62. Acton,S., Rigotti,A., Landschulz,K.T., Xu,S., Hobbs,H.H., and Krieger,M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520.
63. Chen,W., Silver,D.L., Smith,J.D., and Tall,A.R. 2000. Scavenger Receptor-BI Inhibits ATP-binding Cassette Transporter 1- mediated Cholesterol Efflux in Macrophages. *J Biol.Chem.* 275:30794-30800.
64. Fielding,C.J. and Fielding,P.E. 2001. Cellular cholesterol efflux. *Biochim.Biophys.Acta* 1533:175-189.
65. Graf,G.A., Connell,P.M., van der Westhuyzen,D.R., and Smart,E.J. 1999. The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J Biol.Chem.* 274:12043-12048.
66. Gu,X., Kozarsky,K., and Krieger,M. 2000. Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J Biol.Chem.* 275:29993-30001.
67. Ji,Y., Jian,B., Wang,N., Sun,Y., Moya,M.L., Phillips,M.C., Rothblat,G.H., Swaney,J.B., and Tall,A.R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol.Chem.* 272:20982-20985.
68. Francis,G.A., Knopp,R.H., and Oram,J.F. 1995. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* 96:78-87.
69. Owen,J.S. and Mulcahy,J.V. 2002. ATP-binding cassette A1 protein and HDL homeostasis. *Atheroscler.Suppl* 3:13-22.
70. Brinton,E.A., Eisenberg,S., and Breslow,J.L. 1991. Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. *J Clin.Invest* 87:536-544.
71. Kuivenhoven,J.A., Pritchard,H., Hill,J., Frohlich,J., Assmann,G., and Kastelein,J. 1997. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 38:191-205.
72. Kuivenhoven,J.A., van Voorst tot Voorst EJ, Wiebusch,H., Marcovina,S.M., Funke,H., Assmann,G., Pritchard,P.H., and Kastelein,J.J. 1995. A unique genetic and biochemical presentation of fish-eye disease. *J Clin.Invest* 96:2783-2791.

73. Carlson,L.A. and Holmquist,L. 1985. Evidence for deficiency of high density lipoprotein lecithin: cholesterol acyltransferase activity (alpha-LCAT) in fish eye disease. *Acta Med.Scand.* 218:189-196.
74. Schaefer,E.J., Zech,L.A., Schwartz,D.E., and Brewer,H.B., Jr. 1980. Coronary heart disease prevalence and other clinical features in familial high-density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Ann Intern Med.* 95:261-266
75. Marcil,M., Brooks-Wilson,A., Clee,S.M., Roomp,K., Zhang,L.H., Yu,L., Collins,J.A., van Dam,M., Molhuizen,H.O., Loubster,O. *et al.* 1999. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 354:1341-1346.
76. Roma,P., Gregg,R.E., Meng,M.S., Ronan,R., Zech,L.A., Franceschini,G., Sirtori,C.R., and Brewer,H.B., Jr. 1993. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-IMilano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *J Clin.Invest.* 91:1445-1452.
77. Bruckert,E., von Eckardstein,A., Funke,H., Beucler,I., Wiebusch,H., Turpin,G., and Assmann,G. 1997. The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-I Milano. *Atherosclerosis* 128:121-128.
78. Calabresi,L. and Franceschini,G. 1997. High density lipoprotein and coronary heart disease: insights from mutations leading to low high density lipoprotein. *Curr.Opin.Lipidol.* 8:219-224.
79. Hara,H. and Yokoyama,S. 1991. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol.Chem.* 266:3080-3086.
80. Favre,G., Blancy,E., Tournier,J.F., and Soula,G. 1989. Proliferative effect of high density lipoprotein (HDL) and HDL fractions (HDL1,2, HDL3) on virus transformed lymphoblastoid cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1013:118-124.
81. Jozan,S., Faye,J.C., Tournier,J.F., Tauber,J.P., David,J.F., and Bayard,F. 1985. Interaction of estradiol and high density lipoproteins on proliferation of the human breast cancer cell line MCF-7 adapted to grow in serum free conditions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 133:105-112.
82. Fidge,N.H. and Nestel,P.J. 1985. Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein3 with receptors on cultured cells. *J Biol.Chem.* 260:3570-3575.
83. Bond,H.M., Morrone,G., Venuta,S., and Howell,K.E. 1991. Characterization and purification of proteins which bind high-density lipoprotein. A putative cell-surface receptor. *Biochem.J.* 279:633-641.

84. McKnight,G.L., Reasoner,J., Gilbert,T., Sundquist,K.O., Hokland,B., McKernan,P.A., Champagne,J., Johnson,C.J., Bailey,M.C., Holly,R. *et al.* 1992. Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J Biol.Chem.* 267:12131-12141.
85. Hokland,B., Mendez,A.J., and Oram,J.F. 1992. Cellular localization and characterization of proteins that bind high density lipoprotein. *J Lipid Res.* 33:1335-1342.
86. Kruse,C., Grunweller,A., Notbohm,H., Kugler,S., Purschke,W.G., and Muller,P.K. 1996. Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin. *Biochem.J.* 320:247-252.
87. Plenz,G., Kugler,S., Schnittger,S., Rieder,H., Fonatsch,C., and Muller,P.K. 1994. The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression pattern. *Hum.Genet.* 93:575-582.
88. Oram,J.F., Mendez,A.J., Slotte,J.P., and Johnson,T.F. High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts.1999. *Arterioscler Thromb.* 11:403-414
89. Kruse,C., Grunweller,A., Notbohm,H., Kugler,S., Purschke,W.G., and Muller,P.K. 1996. Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin. *Biochem.J.* 320:247-252.
90. Wang,N., Silver,D.L., Costet,P., and Tall,A.R. 2000. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J.Biol.Chem.* 275:33053-33058.
91. Wang,N., Silver,D.L., Thiele,C., and Tall,A.R. 2001. ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) Functions as a Cholesterol Efflux Regulatory Protein. *J.Biol.Chem.* 276:23742-23747.
92. Chroni,A., Liu,T., Gorshkova,I., Kan,H.Y., Uehara,Y., von Eckardstein,A., and Zannis,V.I. 2003. The central helices of ApoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type ApoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. *J Biol.Chem.* 278:6719-6730.
93. Panagotopoulos,S.E., Witting,S.R., Horace,E.M., Hui,D.Y., Maiorano,J.N., and Davidson,W.S. 2002. The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1. *J Biol.Chem.* 277:39477-39484.
94. Fitzgerald,M.L., Morris,A.L., Rhee,J.S., Andersson,L.P., Mendez,A.J., and Freeman,M.W. 2002. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol.Chem.* 277:33178-33187.

95. Rader,D.J. 2002. High-density lipoproteins and atherosclerosis. *Am.J Cardiol.* 90:62-70.
96. Nofer,J.R., Fobker,M., Hobbel,G., Voss,R., Wolinska,I., Tepel,M., Zidek,W., Junker,R., Seedorf,U., von Eckardstein,A. *et al.* 2000. Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by HDL- associated lysosphingolipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux. *Biochemistry* 39:15199-15207.
97. Porn,M.I., Akerman,K.E., and Slotte,J.P. 1991. High-density lipoproteins induce a rapid and transient release of Ca<sup>2+</sup> in cultured fibroblasts. *Biochem.J.* 279:29-33.
98. Garver,W.S., Deeg,M.A., Bowen,R.F., Culala,M.M., Bierman,E.L., and Oram,J.F. 1997. Phosphoproteins regulated by the interaction of high-density lipoprotein with human skin fibroblasts. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17:2698-2706.
99. Tamagaki,T., Sawada,S., Imamura,H., Tada,Y., Yamasaki,S., Toratani,A., Sato,T., Komatsu,S., Akamatsu,N., Yamagami,M. *et al.* 1996. Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 123:73-82.
100. Nazih,H., Devred,D., Martin-Nizard,F., Fruchart,J.C., and Delbart,C. 1990. Phosphatidylcholine breakdown in HDL3 stimulated platelets. *Thromb.Res.* 59:913-920.
101. Nazih,H., Devred,D., Martin-Nizard,F., Clavey,V., Fruchart,J.C., and Delbart,C. 1992. Pertussis toxin sensitive G-protein coupling of HDL receptor to phospholipase C in human platelets. *Thromb.Res.* 67:559-567.
102. Nofer,J.R., Walter,M., Kehrel,B., Seedorf,U., and Assmann,G. 1995. HDL3 activates phospholipase D in normal but not in glycoprotein IIb/IIIa-deficient platelets. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 207:148-154.
103. Nofer,J.R., Walter,M., Kehrel,B., Wierwille,S., Tepel,M., Seedorf,U., and Assmann,G. 1998. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide- derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris- phosphate. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18:861-869
104. Wu,Y.Q. and Handwerger,S. 1992. High density lipoproteins stimulate molecular weight 80K protein phosphorylation in human trophoblast cells: evidence for a protein kinase-C-dependent pathway in human placental lactogen release. *Endocrinology* 131:2935-2940.
105. Nofer,J.R., Junker,R., Pulawski,E., Fobker,M., Levkau,B., von Eckardstein,A., Seedorf,U., Assmann,G., and Walter,M. 2001. High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *Thromb.Haemost.* 85:730-735.

106. Wu,Y.Q., Jorgensen,E.V., and Handwerger,S. 1988. High density lipoproteins stimulate placental lactogen release and adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) production in human trophoblast cells: Evidence for cAMP as a second messenger in human placental lactogen release. *ENDOCRINOLOGY* 123:1879-1884.
107. Ishigami,M., Swertfeger,D.K., Hui,M.S., Granholm,N.A., and Hui,D.Y. 2000. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:1020-1026.
108. Dietschy,J.M., Turley,S.D., and Spady,D.K. 1993. 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.
109. Chen,L.Y. and Mehta,J.L. 1994. Inhibitory effect of high-density lipoprotein on platelet function is mediated by increase in nitric oxide synthase activity in platelets. *Life Sci.* 55:1815-1821.
110. Riddell,D.R., Vinogradov,D.V., Stannard,A.K., Chadwick,N., and Owen,J.S. 1999. Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J Lipid Res.* 40:1925-1930.
111. Neverov,N.I., Kaysen,G.A., Nuccitelli,R., and Weiss,R.H. 1997. HDL causes mesangial cell mitogenesis through a tyrosine kinase- dependent receptor mechanism. *J Am.Soc.Nephrol.* 8:1247-1256.
112. Honda,H.M., Wakamatsu,B.K., Goldhaber,J.I., Berliner,J.A., Navab,M., and Weiss,J.N. 1999. High-density lipoprotein increases intracellular calcium levels by releasing calcium from internal stores in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 143:299-306.
113. Nofer,J.R., Kehrel,B., Fobker,M., Levkau,B., Assmann,G., and von Eckardstein,A. 2002. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 161:1-16.
114. Rogler,G., Trumbach,B., Klima,B., Lackner,K.J., and Schmitz,G. 1995. HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15:683-690.
115. Li,Q., Tsujita,M., and Yokoyama,S. 1997. Selective down-regulation by protein kinase C inhibitors of apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux in macrophages. *Biochemistry* 36:12045-12052.
116. Brown,H.A., Gutowski,S., Moomaw,C.R., Slaughter,C., and Sternweis,P.C. 1993. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75:1137-1144.
117. Cockcroft,S., Thomas,G.M., Fensome,A., Geny,B., Cunningham,E., Gout,I., Hiles,I., Totty,N.F., Truong,O., and Hsuan,J.J. 1994. Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* 263:523-526.

118. Deeg, M.A., Bowen, R.F., Oram, J.F., and Bierman, E.L. 1997. High density lipoproteins stimulate mitogen-activated protein kinases in human skin fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:1667-1674.
119. Racchi, M., Bergamaschi, S., Govoni, S., Wetsel, W.C., Bianchetti, A., Binetti, G., Battaini, F., and Trabucchi, M. 1994. Characterization and distribution of protein kinase C isoforms in human skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 314:107-111.
120. Mendez, A.J. 1997. Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. *J Lipid Res.* 38:1807-1821.
121. Remaley, A.T., Schumacher, U.K., Stonik, J.A., Farsi, B.D., Nazih, H., and Brewer, H.B., Jr. 1997. Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:1813-1821.
122. Mendez, A.J., Lin, G., Wade, D.P., Lawn, R.M., and Oram, J.F. 2001. Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *J Biol. Chem.* 276:3158-3166.
123. Rothman, J.E. and Wieland, F.T. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272:227-234.
124. Piguet V, Gu F, Foti M, Demaurex N, Gruenberg J, Carpentier JL, and Trono D. 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell* 97:63-73.
125. Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A.R., Tabas, I., and Tall, A.R. 2001. Preferential ATP-binding Cassette Transporter A1-mediated Cholesterol Efflux from Late Endosomes/Lysosomes. *J Biol. Chem.* 276:43564-43569.
126. Neufeld, E.B., Remaley, A.T., Demosky, S.J., Stonik, J.A., Cooney, A.M., Comly, M., Dwyer, N.K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S. *et al.* 2001. Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1 Transporter. *J Biol. Chem.* 276:27584-27590.
127. Utech, M., Hobbel, G., Rust, S., Reinecke, H., Assmann, G., and Walter, M. 2001. Accumulation of RhoA, RhoB, RhoG, and Rac1 in fibroblasts from Tangier disease subjects suggests a regulatory role of Rho family proteins in cholesterol efflux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:229-236.
128. Hirano, K., Matsuura, F., Tsukamoto, K., Zhang, Z., Matsuyama, A., Takaishi, K., Komuro, R., Suehiro, T., Yamashita, S., Takai, Y. *et al.* 2000. Decreased expression of a member of the Rho GTPase family, Cdc42Hs, in cells from Tangier disease - the small G protein may play a role in cholesterol efflux. *FEBS Lett.* 484:275-279.



129. Smith,J.D., Miyata,M., Ginsberg,M., Grigaux,C., Shmookler,E., and Plump,A.S. 1996. Cyclic AMP induces apolipoprotein E binding activity and promotes cholesterol efflux from a macrophage cell line to apolipoprotein acceptors. *J.Biol.Chem.* 271:30647-30655.
130. Takahashi,Y. and Smith,J.D. 1999. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:11358-11363.
131. Hokland,B.M., Slotte,J.P., Bierman,E.L., and Oram,J.F. 1993. Cyclic AMP stimulates efflux of intracellular sterol from cholesterol- loaded cells. *J.Biol.Chem.* 268:25343-25349.
132. Ikonen,E. 2000. Removal of cholesterol from the cells--a new solution to fat diseases? *Duodecim* 116:465-466.
133. Fielding,C.J. and Fielding,P.E. 2001. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 49:251-264.
134. Sviridov,D., Fidge,N., Beaumier-Gallon,G., and Fielding,C. 2001. Apolipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae). *Biochem.J.* 358:79-86.
135. Li,S., Okamoto,T., Chun,M., Sargiacomo,M., Casanova,J.E., Hansen,S.H., Nishimoto,I., and Lisanti,M.P. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol.Chem.* 270:15693-15701.
136. Schreiber,S., Fleischer,J., Breer,H., and Boekhoff,I. 2000. A possible role for caveolin as a signaling organizer in olfactory sensory membranes. *J Biol.Chem.* 275:24115-24123.
137. Kim,J.H., Han,J.M., Lee,S., Kim,Y., Lee,T.G., Park,J.B., Lee,S.D., Suh,P.G., and Ryu,S.H. 1999. Phospholipase D1 in caveolae: regulation by protein kinase Calpha and caveolin-1. *Biochemistry* 38:3763-3769.
138. Razani,B., Rubin,C.S., and Lisanti,M.P. 1999. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol.Chem.* 274:26353-26360.
139. Wu,D. and Terrian,D.M. 2002. Regulation of caveolin-1 expression and secretion by a protein kinase cepsilon signaling pathway in human prostate cancer cells. *J Biol.Chem.*277:40449-40455
140. Gustavsson,J., Parpal,S., Karlsson,M., Ramsing,C., Thorn,H., Borg,M., Lindroth,M., Peterson,K.H., Magnusson,K.E., and Stralfors,P. 1999. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J* 13:1961-1971.

141. Parpal,S., Karlsson,M., Thorn,H., and Stralfors,P. 2001. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol.Chem.* 276:9670-9678.
142. Mineo,C., Gill,G.N., and Anderson,R.G. 1999. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol.Chem.* 274:30636-30643.
143. Dean,M., Hamon,Y., and Chimini,G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 42:1007-1017.
144. Hyde,S.C., Emsley,P., Hartshorn,M.J., Mimmack,M.M., Gileadi,U., Pearce,S.R., Gallagher,M.P., Gill,D.R., Hubbard,R.E., and Higgins,C.F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346:362-365.
145. Fielding,C.J. and Fielding,P.E. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 36:211-228.
146. Oram,J.F. and Yokoyama,S. 1996. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res.* 37:2473-2491.
147. Singaraja,R.R., Brunham,L.R., Visscher,H., Kastelein,J.J., and Hayden,M.R. 2003. Efflux and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol.*
148. Vaisman,B.L., Lambert,G., Amar,M., Joyce,C., Ito,T., Shamburek,R.D., Cain,W.J., Fruchart-Najib,J., Neufeld,E.D., Remaley,A.T. *et al.* 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin.Invest* 108:303-309.
149. Singaraja,R.R., Bocher,V., James,E.R., Clee,S.M., Zhang,L.H., Leavitt,B.R., Tan,B., Brooks-Wilson,A., Kwok,A., Bissada,N. *et al.* 2001. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *J Biol.Chem.* 276:33969-33979.
150. Attie,A.D., Hamon,Y., Brooks-Wilson,A.R., Gray-Keller,M.P., MacDonald,M.L., Rigot,V., Tebon,A., Zhang,L.H., Mulligan,J.D., Singaraja,R.R. *et al.* 2002. Identification and functional analysis of a naturally occurring E89K mutation in the ABCA1 gene of the WHAM chicken. *J Lipid Res.* 43:1610-1617.
151. Cavelier,L.B., Qiu,Y., Bielicki,J.K., Afzal,V., Cheng,J.F., and Rubin,E.M. 2001. Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice. *J Biol.Chem.* 276:18046-18051.
152. Groen,A.K., Bloks,V.W., Bandsma,R.H., Ottenhoff,R., Chimini,G., and Kuipers,F. 2001. Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in Abca1-null mice lacking HDL. *J Clin.Invest* 108:843-850.

153. Kiss,R.S., McManus,D.C., Franklin,V., Tan,W.L., McKenzie,A., Chimini,G., and Marcel,Y.L. 2003. The lipidation by hepatocytes of human apolipoprotein A-I occurs by both ABCA1-dependent and -independent pathways. *J Biol.Chem.* 278:10119-10127.
154. Alam,K., Meidell,R.S., and Spady,D.K. 2001. Effect of up-regulating individual steps in the reverse cholesterol transport pathway on reverse cholesterol transport in normolipidemic mice. *J Biol.Chem.* 276:15641-15649.
155. Fielding,P.E., Russel,J.S., Spencer,T.A., Hakamata,H., Nagao,K., and Fielding,C.J. 2002. Sterol efflux to apolipoprotein A-I originates from caveolin-rich microdomains and potentiates PDGF-dependent protein kinase activity. *Biochemistry* 41:4929-4937.
156. Drobnik,W., Borsukova,H., Bottcher,A., Pfeiffer,A., Liebisch,G., Schutz,G.J., Schindler,H., and Schmitz,G. 2002. Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic.* 3:268-278.
157. Sun,Y., Hao,M., Luo,Y., Liang,C.P., Silver,D.L., Cheng,C., Maxfield,F.R., and Tall,A.R. 2003. Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol.Chem.* 278:5813-5820.
158. Chambenoit,O., Hamon,Y., Marguet,D., Rigneault,H., Rosseneu,M., and Chimini,G. 2001. Specific Docking of Apolipoprotein A-I at the Cell Surface Requires a Functional ABCA1 Transporter. *J Biol.Chem.* 276:9955.
159. Fielding,P.E., Nagao,K., Hakamata,H., Chimini,G., and Fielding,C.J. 2000. A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 39:14113-14120.
160. Smit,J.J., Schinkel,A.H., Oude Elferink,R.P., Groen,A.K., Wagenaar,E., van Deemter,L., Mol,C.A., Ottenhoff,R., van der Lugt,N.M., van Roon,M.A. *et al.* 1993. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451-462.
161. Tabas,I., Marathe,S., Keesler,G.A., Beatini,N., and Shiratori,Y. 1996. Evidence That the Initial Up-regulation of Phosphatidylcholine Biosynthesis in Free Cholesterol-loaded Macrophages Is an Adaptive Response That Prevents Cholesterol-induced Cellular Necrosis. PROPOSED ROLE OF AN EVENTUAL FAILURE OF THIS RESPONSE IN FOAM CELL NECROSIS IN ADVANCED ATHEROSCLEROSIS. *J Biol.Chem.* 271:22773-22781.
162. Lawn,R.M., Wade,D.P., Garvin,M.R., Wang,X., Schwartz,K., Porter,J.G., Seilhamer,J.J., Vaughan,A.M., and Oram,J.F. 1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J.Clin.Invest* 104:25-31.

163. Langmann,T., Klucken,J., Reil,M., Liebisch,G., Luciani,M.F., Chimini,G., Kaminski,W.E., and Schmitz,G. 1999. 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.
164. Costet,P., Luo,Y., Wang,N., and Tall,A.R. 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol.Chem.* 275:28240-28245.
165. Schwartz,K., Lawn,R.M., and Wade,D.P. 2000. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 274:794-802.
166. Janowski,B.A., Grogan,M.J., Jones,S.A., Wisely,G.B., Kliewer,S.A., Corey,E.J., and Mangelsdorf,D.J. 1999. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:266-271.
167. Repa,J.J., Turley,S.D., Lobaccaro,J.A., Medina,J., Li,L., Lustig,K., Shan,B., Heyman,R.A., Dietschy,J.M., and Mangelsdorf,D.J. 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289:1524-1529.
168. Venkateswaran,A., Laffitte,B.A., Joseph,S.B., Mak,P.A., Wilpitz,D.C., Edwards,P.A., and Tontonoz,P. 2000. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:12097-12102.
169. Klucken,J., Buchler,C., Orso,E., Kaminski,W.E., Porsch-Ozcurumez,M., Liebisch,G., Kapinsky,M., Diederich,W., Drobnik,W., Dean,M. *et al.* 2000. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:817-822.
170. Oram,J.F., Mendez,A.J., Lymp,J., Kavanagh,T.J., and Halbert,C.L. 1999. Reduction in apolipoprotein-mediated removal of cellular lipids by immortalization of human fibroblasts and its reversion by cAMP: lack of effect with Tangier disease cells. *J.Lipid Res.* 40:1769-1781.
171. Rechsteiner,M. and Rogers,S.W. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem.Sci.* 21:267-271.
172. Feng,B. and Tabas,I. 2002. 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.
173. Tanaka,A.R., Abe-Dohmae,S., Ohnishi,T., Aoki,R., Morinaga,G., Okuhira,K.i., Ikeda,Y., Kano,F., Matsuo,M., Kioka,N. *et al.* 2003. Effects of Mutations of ABCA1 in the First Extracellular Domain on Subcellular Trafficking and ATP Binding/Hydrolysis. *J Biol.Chem.* 278:8815.

174. Chinetti,G., Lestavel,S., Bocher,V., Remaley,A.T., Neve,B., Torra,I.P., Teissier,E., Minnich,A., Jaye,M., Duverger,N. *et al.* 2001. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat.Med.* 7:53-58.
175. Chawla,A., Boisvert,W.A., Lee,C.H., Laffitte,B.A., Barak,Y., Joseph,S.B., Liao,D., Nagy,L., Edwards,P.A., Curtiss,L.K. *et al.* 2001. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol.Cell* 7:161-171.
176. Gan,X., Kaplan,R., Menke,J.G., MacNaul,K., Chen,Y., Sparrow,C.P., Zhou,G., Wright,S.D., and Cai,T.Q. 2001. Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol.Chem.* 276:48702-48708.
177. Porsch-Ozcurumez,M., Langmann,T., Heimerl,S., Borsukova,H., Kaminski,W.E., Drobnik,W., Honer,C., Schumacher,C., and Schmitz,G. 2001. The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux. *J Biol.Chem.* 276:12427-12433.
178. Langmann,T., Porsch-Ozcurumez,M., Heimerl,S., Probst,M., Moehle,C., Taher,M., Borsukova,H., Kielar,D., Kaminski,W.E., Dittrich-Wengenroth,E. *et al.* 2002. Identification of sterol-independent regulatory elements in the human ATP-binding cassette transporter A1 promoter: role of Sp1/3, E-box binding factors, and an oncostatin M-responsive element. *J Biol.Chem.* 277:14443-14450.
179. Yang,X.P., Freeman,L.A., Knapper,C.L., Amar,M.J., Remaley,A., Brewer,H.B., Jr., and Santamarina-Fojo,S. 2002. The E-box motif in the proximal ABCA1 promoter mediates transcriptional repression of the ABCA1 gene. *J Lipid Res.* 43:297-306.
180. Panousis,C.G. and Zuckerman,S.H. 2000. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP- binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:1565-1571.
181. Wang,Y. and Oram,J.F. 2002. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol.Chem.* 277:5692-5697.
182. Oram,J.F. 2003. HDL Apolipoproteins and ABCA1: Partners in the Removal of Excess Cellular Cholesterol. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23:720-727.
183. Expert Panel on Detection,E.a.T.o.H.B.C.i.A. 2001. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 285:2486-2497.
184. Stein,O. and Stein,Y. 1999. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 144:285-301.

185. Laffont,I., Takahashi,M., Shibukawa,Y., Honke,K., Shuvaev,V.V., Siest,G., Visvikis,S., and Taniguchi,N. 2002. Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform- specific manner. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 292:83-87.
186. Dietschy,J.M., Turley,S.D., and Spady,D.K. 1993. 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.
187. Mendez,A.J. 1995. Monensin and Brefeldin A Inhibit High Density Lipoprotein-mediated Cholesterol Efflux from Cholesterol-enriched Cells. *J Biol.Chem.* 270:5891-5900.
188. Zha,X., Gauthier,A., Genest,J., and McPherson,R. 2003. Secretory Vesicular Transport from the Golgi Is Altered during ATP-binding Cassette Protein A1 (ABCA1)-mediated Cholesterol Efflux. *J Biol.Chem.* 278:10002-10005.
189. Neufeld,E.B., Remaley,A.T., Demosky,S.J., Stonik,J.A., Cooney,A.M., Comly,M., Dwyer,N.K., Zhang,M., Blanchette-Mackie,J., Santamarina-Fojo,S. *et al.* 2001. Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1 Transporter. *J Biol.Chem.* 276:27584-27590.
190. Pentchev,P.G., Kruth,H.S., Comly,M.E., Butler,J.D., Vanier,M.T., Wenger,D.A., and Patel,S. 1986. Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts. *J Biol.Chem.* 261:16775-16780.
191. Kruth,H.S., Comly,M.E., Butler,J.D., Vanier,M.T., Fink,J.K., Wenger,D.A., Patel,S., and Pentchev,P.G. 1986. Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *J Biol.Chem* 261:16769-16774.
192. Wojtanik,K.M. and Liscum,L. 2003. The Transport of Low Density Lipoprotein-derived Cholesterol to the Plasma Membrane Is Defective in NPC1 Cells. *J Biol.Chem* 278:14850-14856.
193. Garver,W.S., Krishnan,K., Gallagos,J.R., Michikawa,M., Francis,G.A., and Heidenreich,R.A. 2002. Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae. *J Lipid Res* 43:579-589.
194. Choi,H.Y., Karten,B., Chan,T., Vance,J.E., Greer,W.L., Heidenreich,R.A., Garver,W.S., and Francis,G.A. 2003. Impaired ABCA1-dependent Lipid Efflux and Hypoalphalipoproteinemia in Human Niemann-Pick type C Disease. *J Biol.Chem* 278:32569-32577.
195. Karten,B., Vance,D.E., Campenot,R.B., and Vance,J.E. 2003. Trafficking of Cholesterol from Cell Bodies to Distal Axons in Niemann Pick C1-deficient Neurons. *J Biol.Chem* 278:4168-4175.

196. Reid,P.C., Sugii,S., and Chang,T.Y. 2003. Trafficking defects in endogenously synthesized cholesterol in fibroblasts, macrophages, hepatocytes, and glial cells from Niemann-Pick type C1 mice. *J Lipid Res* 44:1010-1019.
197. Marcil,M., Yu,L., Krimbou,L., Boucher,B., Oram,J.F., Cohn,J.S., and Genest,J.Jr. 1999. Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:159-169.
198. Slotte JP, Hedstrom G, Rannstrom S, and Ekman S. 1989. Effects of sphingomyelin degradation on cell cholesterol oxidizability and steady-state distribution between the cell surface and the cell interior. *Biochim Biophys Acta.* 985:90-96.
199. Lund-Katz, S., Laboda, H. M., McLean, L. R., and Phillips, M. C. 1998. Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry* 27:3416-3423.
200. Zhao, Y., Sparks, D. L., and Marcel, Y. L. 1996. Effect of the Apolipoprotein A-I and Surface Lipid Composition of Reconstituted Discoidal HDL on Cholesterol Efflux from Cultured Fibroblasts. *Biochemistry* 35:16510-16518.
201. Zhao,Y., Sparks,D.L., and Marcel,Y.L. 1996. Specific Phospholipid Association with Apolipoprotein A-I Stimulates Cholesterol Efflux from Human Fibroblasts. STUDIES WITH RECONSTITUTED SONICATED LIPOPROTEINS. *J Biol.Chem* 271:25145.
202. Huwiler,A., Kolter,T., Pfeilschifter,J., and Sandhoff,K. 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1485:63-99.
203. Witting,S.R., Maiorano,J.N., and Davidson,W.S. 2003. Ceramide enhances cholesterol efflux to apolipoprotein A-I by increasing the cell surface presence of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol.Chem* 278:193200.
204. Luo,X., Zeng,W., Xu,X., Popov,S., Davignon,I., Wilkie,T.M., Mumby,S.M., and Muallem,S. 1999. Alternate Coupling of Receptors to Gs and Gi in Pancreatic and Submandibular Gland Cells. *J Biol.Chem.* 274:17684-17690.
205. Hannun,Y.A., Loomis,C.R., Merrill,A.H., Jr., and Bell,R.M. 1986. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol.Chem.* 261:12604-12609.
206. Mendez,A.J., Oram,J.F., and Bierman,E.L. 1991. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor- dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol.Chem.* 266:10104.
207. Qianqian Li, Maki Tsujita, and Shinji Yokoyama. 1997. Selective Down-Regulation by Protein Kinase C Inhibitors of Apolipoprotein-Mediated Cellular Cholesterol Efflux in Macrophages. *Biochemistry* 36:12045-12052.

208. Exton, J.H. 1999. Regulation of phospholipase D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1439:121-133.
209. Moolenaar, W.H. 1995. Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. *J Biol. Chem.* 270:12949-12952.
210. Bernard, D.W., Rodriguez, A., Rothblat, G.H., and Glick, J.M. 1991. cAMP stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J7774 macrophages. *J. Biol. Chem.* 266:710-716.
211. Dean, M. and Allikmets, R. 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:779-785.
212. Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15:430-434.
213. Picciotto, M.R., Cohn, J.A., Bertuzzi, G., Greengard, P., and Nairn, A.C. 1992. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 267:12742-12752.
214. Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol. Chem* 266:15555-15558.
215. See, R.H., Caday-Malcolm, R.A., Singaraja, R.R., Zhou, S., Silverston, A., Huber, M.T., Moran, J., James, E.R., Janoo, R., Savill, J.M. *et al.* 2002. Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol. Chem.* 277:41835-41842.
216. Goodfellow, H.R., Sardini, A., Ruetz, S., Callaghan, R., Gros, P., McNaughton, P.A., and Higgins, C.F. 1996. Protein Kinase C-mediated Phosphorylation Does Not Regulate Drug Transport by the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein. *J Biol. Chem* 271:13668-13674.
217. Tanaka, A.R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K.i., Ikeda, Y., Kano, F., Matsuo, M., Kioka, N. *et al.* 2003. Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/ hydrolysis. *J Biol. Chem* 278:8815-8819.
218. Gelman, M.S. and Kopito, R.R. 2002. Rescuing protein conformation: prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110:1591.
219. Ito, K., Oleschuk, C.J., Westlake, C., Vasa, M.Z., Deeley, R.G., and Cole, S.P. 2001. Mutation of Trp1254 in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J Biol. Chem.* 276:38108-38114.
220. Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B., and Chimini, G. 1997. ABC1, an ATP Binding Cassette Transporter Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells, Generates a Regulated Anion Flux after Expression in *Xenopus laevis* Oocytes. *J Biol. Chem* 272:2695-2699.



221. Dahan D, Evagelidis A, Hanrahan JW, Hinkson DA, Jia Y, Luo J, and Zhu T. 2001. Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Eur J Physiol* 443:S92-S96.
222. Hepler, J.R. and Gilman, A.G. 1992. G proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 17:383-387.
223. Perry, S.J., Baillie, G.S., Kohout, T.A., McPhee, I., Magiera, M.M., Ang, K.L., Miller, W.E., McLean, A.J., Conti, M., Houslay, M.D. *et al.* 2002. Targeting of Cyclic AMP Degradation to beta 2-Adrenergic Receptors by beta-Arrestins. *Science* 298:834-836.
224. Rigot, V., Hamon, Y., Chambenoit, O., Alibert, M., Duverger, N., and Chimini, G. 2002. Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids. *J Lipid Res.* 43:2077-2086.
225. Cypess, A.M., Unson, C.G., Wu, C.R., and Sakmar, T.P. 1999. Two Cytoplasmic Loops of the Glucagon Receptor Are Required to Elevate cAMP or Intracellular Calcium. *J Biol. Chem* 274:19455-19464.
226. Arora, K.K., Krsmanovic, L.Z., Mores, N., O'Farrell, H., and Catt, K.J. 1998. Mediation of Cyclic AMP Signaling by the First Intracellular Loop of the Gonadotropin-releasing Hormone Receptor. *J Biol. Chem* 273:25581-25586.
227. Joseph, S.B. and Tontonoz, P. 2003. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Current Opinion in Pharmacology* 3:192-197.
228. Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N. *et al.* 2002. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *PNAS* 99:7604-7609.
229. Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14:2819-2830.
230. Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J. *et al.* 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14:2831-2838.
231. STRACHER, A.L.F.R. 1999. Calpain Inhibitors as Therapeutic Agents in Nerve and Muscle Degeneration. *Ann NY Acad Sci* 884:52-59.