

Université de Montréal

**Isolement de protéines liant les phospholipides à partir de tissus et du sérum
bovins : Évidences pour l'implication dans le transport inverse du cholestérol**

par

Jasmine Lefebvre

11587130

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.) en Biochimie

Août 2004

© Jasmine Lefebvre, 2004



W

4

U58

2004

v. 096

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

Ce mémoire intitulé:

**Isolement de protéines liant les phospholipides à partir de tissus et du sérum
bovins : Évidences pour l'implication dans le transport inverse du cholestérol**

présenté par:

Jasmine Lefebvre

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Guy Boileau, Ph.D.

Puttaswamy Manjunath, Ph.D.

Roger Sanfaçon, Ph.D.

Président-Rapporteur

Directeur de Recherche

Membre du jury

Résumé

Le transport inverse du cholestérol (RCT) protège contre l'accumulation du cholestérol en favorisant son catabolisme. L'étape limitante du RCT est l'efflux de cholestérol cellulaire vers les lipoprotéines de haute densité (HDL). Le transporteur ABCA1 est responsable de cette étape. Cependant, des évidences suggèrent l'implication d'autres molécules. Notre équipe a caractérisé une famille de protéines du plasma sérial bovin (BSP). Ces protéines stimulent l'efflux de cholestérol de la membrane spermatique lors de la capacitation. De plus, elles lient l'apolipoprotéine-AI, la protéine majeure des HDL, et peuvent stimuler l'efflux de lipides de la membrane des fibroblastes. Ces protéines pourraient donc stimuler l'efflux de cholestérol qui a lieu dans le RCT. Le but de l'étude était de montrer la présence ubiquitaire des protéines BSP afin de valider leur implication possible dans le RCT. Les protéines ont été localisées dans des tissus bovins (poumons, intestin, reins, cœur et foie), par immunohistochimie. Ensuite, elles ont été isolées et purifiées à partir des tissus et du sérum bovins. Une stratégie efficace de purification a ainsi été établie. Ces résultats montrent pour la première fois que les protéines BSP sont ubiquitaires dans l'organisme. Il est probable que ces protéines soient impliquées dans la stimulation d'efflux lipidiques lors du RCT. L'élucidation des mécanismes impliqués dans le métabolisme lipidique est importante pour le diagnostic, la prévention et le traitement de maladies cardiovasculaires telles l'athérosclérose.

Mots Clés: transport inverse du cholestérol, lipoprotéines, efflux de cholestérol, athérosclérose, protéines BSP, capacitation des spermatozoïdes.

Abstract

Reverse cholesterol transport (RCT) helps protect against excessive cholesterol accumulation by favoring its catabolism. The rate-limiting step of RCT is the efflux of cellular cholesterol to acceptor high-density lipoproteins (HDL). Although the ABCA1 transporter has been identified as the mediator of this efflux, studies suggest the involvement of other molecules. We have previously characterized a family of bovine seminal plasma proteins (BSP) that stimulate cholesterol efflux from the sperm membrane during capacitation. BSP proteins bind to apolipoprotein-AI, the major protein in HDL and are also capable of stimulating lipid efflux from fibroblasts. These proteins could therefore be involved in mediating the lipid efflux that takes place in RCT. The aim of our study was to demonstrate the ubiquitous distribution of BSP proteins in order to validate their possible involvement in RCT. They were localized to several bovine tissues (lung, intestine, kidney, heart and liver) using immunocytochemistry. The proteins were then isolated and purified from tissues and serum, which led to the establishment of an efficient means of purification. These results show, for the first time, that BSP proteins are ubiquitously distributed. It is probable that they are involved in the stimulation of lipid efflux during RCT. A better understanding of the mechanisms involved in lipid metabolism is crucial for the diagnosis, prevention and treatment of cardiovascular diseases such as atherosclerosis.

Key Words: reverse cholesterol transport, lipoproteins, cholesterol efflux, atherosclerosis, BSP proteins, sperm capacitation.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des Tableaux et Figures	vii
Liste des abréviations et des sigles	viii
Remerciements.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1. Le cholestérol.....	1
1.2. Homéostasie du cholestérol	2
1.3. Le transport du cholestérol	2
1.3.1. Les lipoprotéines et les apolipoprotéines	4
1.3.2. Le transport inverse du cholestérol	7
1.3.3. L'efflux de cholestérol cellulaire	8
1.3.3.1. L'efflux de cholestérol par diffusion aqueuse	8
1.3.3.2. L'efflux de cholestérol stimulé par les apolipoprotéines.....	9
1.4. Les protéines impliquées dans le transport inverse du cholestérol	10
1.4.1. ABCA1	11
1.4.2. LCAT	12
1.4.3. PLTP et CETP.....	13
1.4.4. Lipase hépatique	14
1.4.5. SR-B1	14
1.5. Les pathologies reliées au métabolisme des lipides.....	15
1.5.1. L'hypercholestérolémie familiale	15
1.5.2. L'athérosclérose.....	16
1.5.3. La maladie de Tangier	18
1.5.4. L'hypoalphalipoprotéïnémie familiale.....	19
1.6. Les protéines majeures du plasma sérial bovin.....	20
1.6.1. Caractéristiques biochimiques des protéines BSP	20
1.6.2. Structure des protéines BSP	21

1.6.2.1. Les domaines de type II	22
1.6.3. Propriétés de liaison des protéines BSP.....	23
1.6.4. Rôles biologiques des protéines BSP.....	24
1.6.4.1. La capacitation des spermatozoïdes.....	25
1.6.4.2. La capacitation induite par l'héparine.....	26
1.6.4.3. La capacitation induite par les HDL	26
1.6.4.4. La capacitation induite par les protéines BSP.....	28
1.6.5. Les protéines BSP-homologues chez d'autres espèces de mammifères	31
1.6.6. La distribution des protéines BSP	32
1.6.7. La stimulation d'efflux lipidiques chez les fibroblastes	33
1.6.7.1. Le mécanisme de l'efflux cellulaire BSP-dépendant.....	33
1.7. Objectifs du projet de recherche	35
2. Résultats	38
2.1. Detection of Novel Phospholipid-Binding Proteins in Bovine Tissues and Serum: A Potential Role in Reverse Cholesterol Transport? (2004) Lefebvre, J. and Manjunath, P., <i>sera soumis à J Biol Chem ou à J Lipid Res.</i>	38
3. Discussion	82
3.1. Choix du modèle animal	83
3.2. Localisation immunohistochimique des protéines BSP.....	84
3.2.1. Rôles postulés des protéines BSP dans les différents tissus	85
3.3. Isolement des protéines BSP tissulaires.....	87
3.4. Isolement des protéines BSP sériques	88
3.5. Les difficultés dans la purification des protéines BSP	90
3.5.1. Établissement d'une stratégie de purification	92
3.6. Évidences pour l'importance de l'efflux lipidique non-ABCA1-dépendant	94
3.7. Les protéines BSP fonctionnent indépendamment d'ABCA1	97
3.8. Modèle hypothétique du rôle des protéines BSP dans le RCT	98
4. Conclusions.....	100
5. Perspectives.....	102
6. Bibliographie.....	104

Liste des Tableaux et Figures

TABLEAU 1. Homologues des protéines BSP chez différentes espèces de mammifères	32
Figure 1. Structure de la molécule de cholestérol.....	1
Figure 2. Le transport du cholestérol entre le foie et les tissus périphériques.	3
Figure 3. Structure d'une lipoprotéine.....	5
Figure 4. Structure prédite du transporteur ABCA1. Tirée de [38]......	12
Figure 5. Structure des protéines BSP.	22
Figure 6. Modèle de la capacitation bovine.	31
Figure 7. Modèle postulé du rôle des protéines BSP dans le RCT.	99

Liste des abréviations

%	Pourcentage
μ	Micro (10 ⁻⁶)
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μm	Micromètre
°C	Degré Celsius
Å	Angström (10 ⁻¹⁰ m)
aa	Acide aminé
ABC	Avidin-Biotin Complex
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCA3	ATP-binding cassette transporter A3
AMP	Adénosine monophosphate
apo	Apolipoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BiSV	Protéines du plasma séminal du bison (<u>B</u> ison <u>S</u> eminal <u>V</u> esicle <u>S</u> ecretory proteins)
BSA	Albumine du sérum bovin (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
BSP	Protéines majeures du plasma séminal bovin (<u>B</u> ovine <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins)
cBSP	Protéines totales du plasma séminal bovin (<u>C</u> rude <u>B</u> ovine <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins)
CE	Cholestérol estérifié
CETP	Protéine de transfert du cholestérol estérifié (<u>C</u> holesterol <u>E</u> ster <u>T</u> ransfer <u>P</u> rotein)
CL	Cholestérol libre
ECM	Matrice extracellulaire (<u>E</u> xtracellular <u>M</u> atrix)
EDTA	Éthylènediamine tétra-acétate
FF	Fluide folliculaire

FH	Hypercholestérolémie familiale
FHA	Hypoalphalipoprotéinémie familiale
FN2	Domaines de type II de la fibronectine (<u>F</u> ibron <u>e</u> ctin Type II)
g	Accélération gravitationnelle (9,81 m/s ²)
g	gramme
GAG	Glycosaminoglycane
GSP	Protéines de plasma séminal du bouc (<u>G</u> oat <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins)
h	Heure
HDL	Lipoprotéine de haute densité (<u>H</u> igh <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein)
HEK	Cellules rénales embryonnaires humaines (<u>H</u> uman <u>E</u> mbryonic <u>K</u> idney)
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HRP	<u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase
HSP	Protéines du plasma séminal de cheval (<u>H</u> orse <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins)
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire (<u>I</u> ntermediate <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein)
IGF-II	Facteur de croissance de type insuline (<u>I</u> nsulin-Like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor II)
IgG	Immunoglobuline G
kDa	KiloDalton
LCAT	Lécithine-cholestérol acyltransférase
LDL	Lipoprotéine de faible densité (<u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein)
LpA-I	Lipoprotéines reconstituées avec l'apolipoprotéine A-I
M	Molaire (mole / litre)
mM	Millimolaire
m	Mètre
mm	Millimètre
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
MMP	Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire (<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase)

mRNA	Acide ribonucléique messenger
nm	Nanomètre
pB1	Protéine du porc 1
PB	Tampon phosphate (<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer)
PBS	Tampon phosphate salin (<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
pI	Point isoélectrique
pH	Potentiel d'hydrogène
PKA	Protéine Kinase A
PLTP	Protéine de transfert de phospholipides (<u>P</u> hospholipid <u>T</u> ransfer <u>P</u> rotein)
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
RCT	Transport inverse du cholestérol (<u>R</u> everse <u>C</u> holesterol <u>T</u> ransport)
RIA	Dosage radioimmunologique (Radioimmunoassay)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rp	Phase inverse (<u>R</u> eversed <u>P</u> hase)
RSP	Protéines du plasma séminal du bélier (<u>R</u> am <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins)
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec sodium dodécylsulfate (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>s</u> ulfate- <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
SR-B1	Récepteur « scavenger » de classe B (<u>S</u> cavenger <u>R</u> eceptor B1)
TBS	Tampon Tris salin (<u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
TFA	Acide Trifluoroacétique
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité (<u>V</u> ery <u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein)

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier le Dr P. Manjunath de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour l'accomplissement de ma maîtrise. Vous m'avez confié un projet stimulant qui m'a donné l'occasion d'acquérir beaucoup de connaissances et d'habiletés techniques. Merci de m'avoir autant encouragé à présenter mes résultats oralement et à participer aux concours de présentations. Par ces expériences, j'ai gagné de la confiance en moi et j'ai surmonté un défi personnel. De plus, les prix rattachés à ces concours sont toujours très intéressants...

Je tiens à remercier les membres du laboratoire qui m'ont côtoyé pendant les deux dernières années et qui m'ont tous apporté du support autant moral que technique : Annick Bergeron, Marie-Hélène Crête, Yanie Porlier, Dr Kempaiah Rayavara, Dr Isabelle Thérien et Michèle Villemure. J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire du Dr Louis Hermo à McGill, plus particulièrement Nadine Korah, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire au début de ma maîtrise afin d'apprendre l'immunohistochimie.

Plus que tout, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien tout au long de mes études, bien que celles-ci leur semblent interminables. Sans votre aide, je ne crois pas que je me serais rendue aussi loin. Merci à ma famille et à mes amis pour leur support continu et non seulement pendant ma maîtrise mais au cours de ma vie. Merci à Marc, qui m'a aidée dans les moments difficiles et qui a partagé les moments agréables. Thanks to Amy for an unexpected friendship that has quickly become one of my most cherished. Merci encore à tout le monde qui m'ont encouragé pendant cette épreuve.

1. Introduction

1.1. Le cholestérol

La molécule de cholestérol est formée de quatre anneaux stéroïdes fusionnés (Figure 1) qui ont une apparence plane. Le cholestérol possède aussi une fonctionnalité 3 β -hydroxyle ainsi qu'une queue hydrophobe. Tandis que la majorité de la molécule est hydrophobe, la partie 3 β -hydroxyle est hydrophile, donnant donc un caractère amphipathique au cholestérol. Cela provoque une orientation précise du cholestérol dans la bicouche lipidique d'une membrane plasmique, avec son groupement hydroxyle vers le solvant aqueux, près des têtes polaires des phospholipides et son anneau stéroïde rigide orienté parallèlement aux chaînes carbonées hydrophobes des phospholipides. Le caractère hydrophobe du cholestérol le rend très insoluble dans les milieux aqueux, mais il est facilement incorporé dans les membranes.

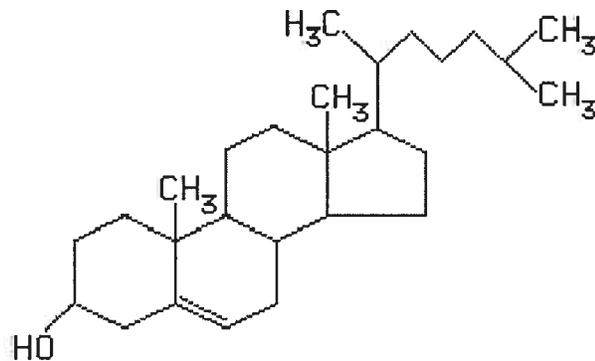


Figure 1. Structure de la molécule de cholestérol

Le cholestérol non-estérifié ou cholestérol libre est essentiel à la viabilité des cellules, ayant la fonction critique de maintenir une structure membranaire appropriée

[1]. Il est aussi nécessaire comme précurseur des acides biliaires et pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes et de la vitamine D. Les cellules peuvent utiliser des sources endogènes de cholestérol comme la synthèse de novo ou la mobilisation de pools intracellulaires et peuvent aussi utiliser des sources exogènes comme le cholestérol provenant de la diète qui est transporté par les lipoprotéines.

1.2. Homéostasie du cholestérol

L'homéostasie du cholestérol dans une cellule périphérique est la balance entre les entrées de cholestérol, par la biosynthèse et la diète, et les sorties de cholestérol, par la relâche cellulaire et le transport inverse du cholestérol (section 1.3.2.). Les termes généralement employés pour désigner l'entrée et la sortie de cholestérol d'une cellule sont influx et efflux, respectivement. L'acquisition de cholestérol par les cellules est régulée par une variété de processus impliquant ou non des récepteurs. L'efflux de cholestérol cellulaire est principalement régulé par les lipoprotéines de haute densité (HDL). Cette balance entre l'influx et l'efflux de cholestérol est très importante pour prévenir l'accumulation de cholestérol dans les parois des vaisseaux sanguins, ce qui peut entraîner le développement de maladies cardiovasculaires.

1.3. Le transport du cholestérol

Le cholestérol exogène, provenant de la diète, entre dans la circulation associé aux chylomicrons, formés par les cellules intestinales. Ces derniers deviennent des vestiges de chylomicrons (chylomicron remnants) après l'hydrolyse des triglycérides par une enzyme nommée lipoprotéine lipase [2] et sont captés par le foie via un récepteur spécifique. Le foie, organe central pour ce qui est du transport du

cholestérol et des triglycérides [3], utilise le cholestérol exogène ainsi que le cholestérol qu'il synthétise pour former des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) qui sont ensuite sécrétées dans la circulation afin d'approvisionner les tissus périphériques. Les VLDL sont aussi un substrat pour la lipoprotéine lipase, qui hydrolyse progressivement les triglycérides contenus dans la lipoprotéine, provoquant une augmentation de la densité pour former des lipoprotéines de faible densité (LDL) [4]. Le cholestérol est acheminé aux cellules périphériques qui reconnaissent les LDL grâce à un récepteur spécifique et permettent leur endocytose via des puits tapissés de clathrine.

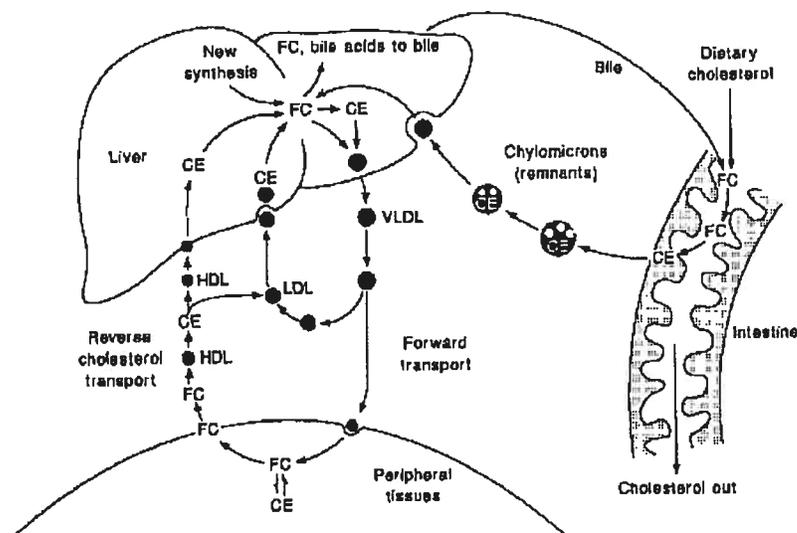


Figure 2. Le transport du cholestérol entre le foie et les tissus périphériques. FC, cholestérol libre; CE, cholestérol estérifié; VLDL, lipoprotéine de très faible densité; LDL, lipoprotéine de faible densité et HDL, lipoprotéine de haute densité. Les flèches indiquent le sens du transport net. Tirée de [5].

Ultimement, le cholestérol excédentaire des tissus périphériques est capté par les HDL qui le retourne au foie pour le catabolisme. Ce transport inverse du

cholestérol de la périphérie vers le foie sera discuté dans la section 1.3.2. Une illustration du transport du cholestérol est présenté à la Figure 2.

1.3.1. Les lipoprotéines et les apolipoprotéines

Dû à son caractère hydrophobe, la majorité du cholestérol de l'organisme se retrouve dans les membranes plasmiques des cellules. Par contre, une quantité significative de cholestérol se retrouve dans la circulation sanguine. Ce cholestérol doit donc être associé à des transporteurs qui assurent sa solubilisation en milieu aqueux, tels les lipoprotéines. Une lipoprotéine (Figure 3) est une macromolécule soluble dans l'eau qui est composée de lipides tels les triglycérides, le cholestérol et les phospholipides, ainsi que d'une ou plusieurs protéines spécifiques nommées apolipoprotéines. Le centre de la particule contient des lipides hydrophobes tels le cholestérol estérifié et les triglycérides, tandis qu'à l'extérieur de la lipoprotéine on retrouve les têtes polaires des phospholipides, le groupement hydroxyle du cholestérol libre ainsi que les apolipoprotéines.

Les lipoprotéines sont classées selon leur densité, et les différentes classes sont aussi caractérisées par leur mobilité électrophorétique, leur taille et leur composition en apolipoprotéines. D'abord, les chylomicrons sont les lipoprotéines de plus grande taille et de plus faible densité. Leur synthèse se fait au niveau des cellules intestinales et leur rôle est de transporter les triglycérides et le cholestérol alimentaire dans la circulation. Les lipoprotéines de très faible densité, VLDL, transportent les triglycérides et le cholestérol à partir du foie afin qu'ils soient redistribués aux tissus périphériques. Sous l'action de la lipoprotéine lipase, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés pour donner lieu à des lipoprotéines de

densité intermédiaire (IDL) et de faible densité (LDL), qui sont enrichis en cholestérol. Les LDL constituent les principaux transporteurs de cholestérol alimentaire dans le plasma sanguin. Les lipoprotéines de haute densité, HDL, sont les plus petites des lipoprotéines et elles proviennent de plusieurs sources dont le foie et l'intestin. Les HDL servent de transporteurs pour le retour du cholestérol de la périphérie au foie.

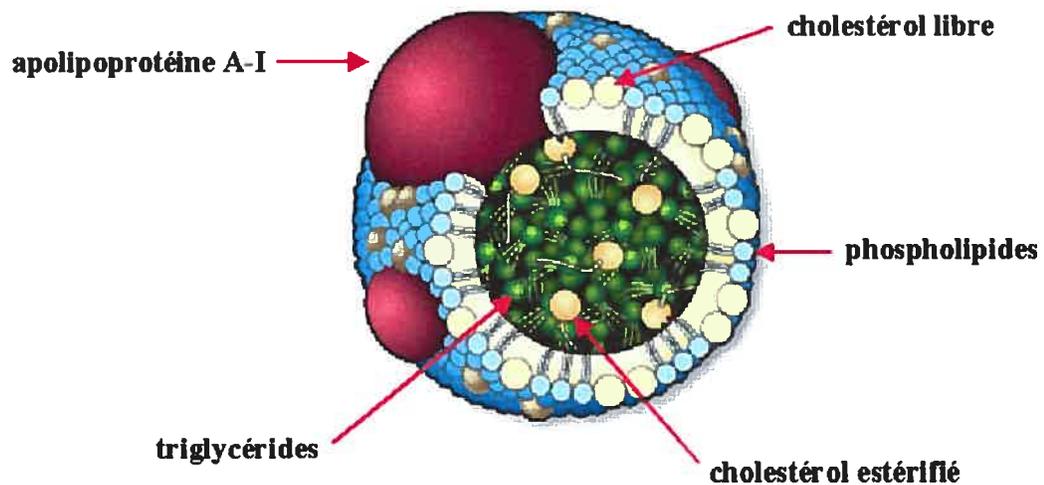


Figure 3. Structure d'une lipoprotéine

Les apolipoprotéines agissent dans le transport et la redistribution de lipides aux tissus, servent de cofacteurs pour les enzymes du métabolisme des lipides et maintiennent la structure des lipoprotéines. Les apolipoprotéines-AI, AII et AIV font partie des HDL. L'apolipoprotéine-AI (apoA-I) est la composante protéique majeure des HDL, et elle sert aussi de cofacteur activateur pour l'enzyme lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT) [6]. L'apoA-I est présente en au moins une copie (normalement deux à quatre copies) dans chaque particule de HDL dans le plasma normal. La pro-apolipoprotéine est synthétisée au niveau du foie et de l'intestin, et

elle est clivée en protéine mature par des protéases plasmatiques [7]. Sa structure contient plusieurs segments répétés qui forment des hélices-alpha amphipathiques en présence de phospholipides, avec les résidus chargés orientés vers le milieu aqueux et les résidus hydrophobes dirigés vers les chaînes carbonées des phospholipides [8]. Dans le plasma normal, il y a habituellement un petit pourcentage (2 à 5%) de petites particules de HDL qui ont une mobilité électrophorétique plus lente (pré-béta) que les HDL normaux (migration alpha) [9]. L'apolipoprotéine B (apoB) est retrouvée chez les chylomicrons, VLDL, IDL et LDL. Elle est hétérogène et existe sous deux formes; apoB-48, composante majeure des chylomicrons, qui est synthétisée par l'intestin, et apoB-100 qui est synthétisée par le foie (pour une revue, voir [10]). L'apoB-100 est la composante majeure des LDL et constitue le déterminant protéique reconnu par le récepteur des LDL (récepteur B/E), cette reconnaissance étant la première étape dans le catabolisme des LDL [11]. Les apolipoprotéines C (C-I, C-II et C-III) sont des composantes de surface des chylomicrons, des VLDL et des HDL. Ces protéines semblent être des cofacteurs de la LCAT et de la lipoprotéine lipase. Enfin, l'apolipoprotéine E (apoE) est une composante des chylomicrons, des chylomicron remnants, des VLDL et des HDL. L'apoE est synthétisée par le foie ainsi que par les macrophages dérivés de monocytes. Dans le système nerveux central, l'apoE est impliquée dans l'approvisionnement des lipides membranaires nécessaires au développement, la croissance des neurones ainsi que la réparation des lésions [12]. Des polymorphismes alléliques dans le gène de l'apoE sont associés avec la maladie d'Alzheimer [13].

1.3.2. Le transport inverse du cholestérol

Bien que le foie soit le site majeur pour la biosynthèse du cholestérol, toutes les cellules ont la capacité de le synthétiser [14]. Au contraire, la plupart des cellules somatiques sont incapables de cataboliser le cholestérol. Pour cette raison, il est essentiel que le cholestérol en excès des tissus soit relâché et transporté aux tissus responsables du catabolisme. Ces organes sont le foie et les tissus stéroïdogéniques, où le cholestérol est converti en acides biliaires et en hormones stéroïdiennes respectivement. Le transport inverse du cholestérol est défini comme étant le mouvement en sens inverse du cholestérol dans le plasma, soit des cellules périphériques vers le foie [15]. Au niveau du foie, le cholestérol est soit recyclé dans des lipoprotéines nouvellement synthétisées ou dégradé pour servir de précurseur aux acides biliaires. Glomset [16] a été le premier à suggérer le concept du transport inverse du cholestérol (RCT : Reverse Cholesterol Transport). Le RCT consiste en cinq étapes : (i) l'efflux de cholestérol des cellules vers des accepteurs spécifiques (HDL); (ii) l'estérification du cholestérol à l'intérieur des HDL par la LCAT; (iii) le transfert du cholestérol des HDL vers d'autres classes de lipoprotéines, principalement celles contenant de l'apoB; (iv) le remodelage des HDL sous l'effet de la lipase hépatique et (v) la reprise sélective du cholestérol des HDL par le foie et possiblement par le rein et l'intestin grêle, par l'intermédiaire de récepteurs aux HDL [5]. La première étape du RCT, soit l'efflux de cholestérol depuis la membrane d'une cellule périphérique vers un accepteur plasmatique, semble être l'étape limitante qui détermine le flux du RCT [17].

1.3.3. L'efflux de cholestérol cellulaire

Le mécanisme pour la relâche du cholestérol cellulaire constitue une composante intégrale de l'homéostasie du cholestérol, tout comme la régulation de la biosynthèse, la reprise de lipoprotéines extracellulaires et le trafic intracellulaire du cholestérol. L'efflux de cholestérol cellulaire est principalement stimulé par les HDL. Deux mécanismes ont été proposés pour ce processus de relâche de cholestérol des cellules [18]. Le premier mécanisme implique un efflux non-spécifique de cholestérol de la surface cellulaire à travers une phase aqueuse. Dans ce mécanisme, le relâche nette de cholestérol est stimulée par l'estérification du cholestérol par la LCAT à l'extérieur de la cellule. Le second mécanisme consiste en l'assemblage de nouvelles particules de HDL avec des phospholipides et du cholestérol cellulaires suite à l'interaction d'apolipoprotéines avec la membrane plasmique de la cellule. Ce mécanisme semble constituer la source majeure des HDL plasmatiques.

1.3.3.1. L'efflux de cholestérol par diffusion aqueuse

Bien que le cholestérol soit très peu soluble dans l'eau [19], les molécules de cholestérol peuvent diffuser à travers une phase aqueuse à une concentration au-dessous de la concentration micellaire critique [20]. La diffusion aqueuse de cholestérol se fait selon un gradient de concentration de cholestérol non-estérifié qui est maintenu par l'activité LCAT, générant un flux net de cholestérol des cellules vers les lipoprotéines. Les évidences expérimentales pour ce processus ont d'abord été proposées par Murphy [21], qui a constaté que l'incubation d'érythrocytes avec du plasma faisait diminuer le cholestérol membranaire. Glomset a proposé que l'estérification du cholestérol des HDL par la LCAT maintenait un faible contenu de

cholestérol libre sur la surface des HDL ce qui provoquait le flux de cholestérol vers les HDL, donc des tissus vers le plasma [16]. Le cholestérol peut être absorbé par divers accepteurs autres que les lipoprotéines plasmatiques, tels l'albumine [22], les liposomes [23] et les cyclodextrines [24].

Il existe deux types d'efflux de cholestérol par diffusion aqueuse; la diffusion simple et la diffusion facilitée. D'abord, la diffusion simple est un processus non-compétitif indépendant de protéines et de la disponibilité en ATP. Le transport net (influx ou efflux) se fait seulement selon un gradient pré-existant de concentration, comme ce qui a lieu avec l'estérification du cholestérol plasmatique par la LCAT. De son côté, la diffusion facilitée est protéine-dépendante mais ATP-indépendante [25]. Contrairement à la diffusion simple, le transport facilité de solutés différents par un même transporteur est de nature compétitive. De façon similaire à la diffusion simple, la diffusion facilitée se fait sans apport en ATP et selon un gradient pré-existant de concentration. Le transport lipidique régulé par le récepteur SR-B1, qui sera discuté à la section 1.4.5., présente plusieurs des propriétés de la diffusion facilitée.

1.3.3.2. L'efflux de cholestérol stimulé par les apolipoprotéines

Il a été observé que les apolipoprotéines dépourvues de lipides sont en mesure d'induire la relâche de cholestérol [26]. Les apolipoprotéines contenant des hélices-alpha amphipathiques telles apoA-I, A-II et E peuvent générer des nouvelles particules de lipoprotéines en stimulant l'efflux de cholestérol et de phospholipides des cellules. La lipoprotéine générée a les propriétés des pré- β -HDL. La différence entre ce type d'efflux et celui par diffusion aqueuse est dans la vitesse relative de

relâche du cholestérol par rapport aux phospholipides. Dans la diffusion aqueuse, la vitesse de relâche du cholestérol est beaucoup plus élevée que la vitesse pour les phospholipides dû à la différence de solubilité dans la phase aqueuse. Au contraire, la diffusion stimulée par les apolipoprotéines provoque majoritairement la relâche de phospholipides plutôt que de cholestérol [27]. Les HDL formés par ce processus contiennent principalement des phospholipides et du cholestérol non-estérifié qui sera estérifié par la LCAT pour donner une particule de HDL mature [28]. Toutefois, contrairement à la diffusion aqueuse, l'estérification du cholestérol par la LCAT n'augmente pas l'efflux de cholestérol [28]. L'efflux stimulé par les apolipoprotéines semble nécessiter un site d'interaction spécifique pour les apolipoprotéines sur la surface cellulaire [29]. Il semble aussi y avoir un mécanisme de mobilisation intracellulaire de cholestérol associé avec ce type d'efflux, et cette mobilisation serait reliée à l'activation de la protéine kinase C [30]. Le processus d'efflux par l'intermédiaire des apolipoprotéines requiert donc au moins deux facteurs cellulaires spécifiques; un site d'interaction pour les apolipoprotéines sur la surface cellulaire et un système pour mobiliser le cholestérol intracellulaire afin qu'il soit disponible pour la génération de particules de pré- β -HDL.

1.4. Les protéines impliquées dans le transport inverse du cholestérol

Le RCT est un processus à plusieurs étapes faisant intervenir de nombreuses protéines qui seront abordées en détail dans les sections 1.4.1. à 1.4.5. Lors de l'étape d'efflux de cholestérol des cellules vers des accepteurs, la protéine «ATP-binding cassette transporter A1» (ABCA1) joue un rôle important. Ensuite, le cholestérol des HDL est estérifié par l'enzyme LCAT qui donne lieu à des particules de HDL

matures. Une partie du cholestérol et des phospholipides des HDL peut ensuite être transférée aux lipoprotéines contenant de l'apoB, sous l'action de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) et la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP). Le remodelage des HDL se fait sous l'action de la lipase hépatique, et la reprise sélective du cholestérol des HDL par le foie se fait principalement par le récepteur «scavenger receptor B1» (SR-B1).

1.4.1. ABCA1

Le transporteur ABCA1, de la super-famille de transporteurs «ATP-binding cassette», est considéré comme étant le régulateur principal du RCT. L'implication de ce transporteur dans le RCT a été élucidée lorsque le gène qui l'encode a été identifié comme étant défectueux dans la maladie de Tangier, caractérisée par des niveaux très diminués de HDL circulants [31-34]. ABCA1, qui est représenté à la Figure 4, est une protéine intégrale de la membrane plasmique qui fait 2 261 acides aminés et contient deux moitiés de structure similaire [35]. Chaque moitié comprend six hélices transmembranaires et un domaine de liaison aux nucléotides qui utilise l'ATP comme source d'énergie. Un domaine régulateur de fonction inconnue relie ces deux moitiés [36]. La structure de ABCA1 est similaire à d'autres transporteurs de la famille ABC qui ont pour fonction de transloquer des lipides et d'autres métabolites d'un côté de la membrane à l'autre [37]. Cela suggère l'implication d'ABCA1 dans le transport de cholestérol et de phospholipides à travers la membrane plasmique pour leur donner accès aux apolipoprotéines comme apoA-I.

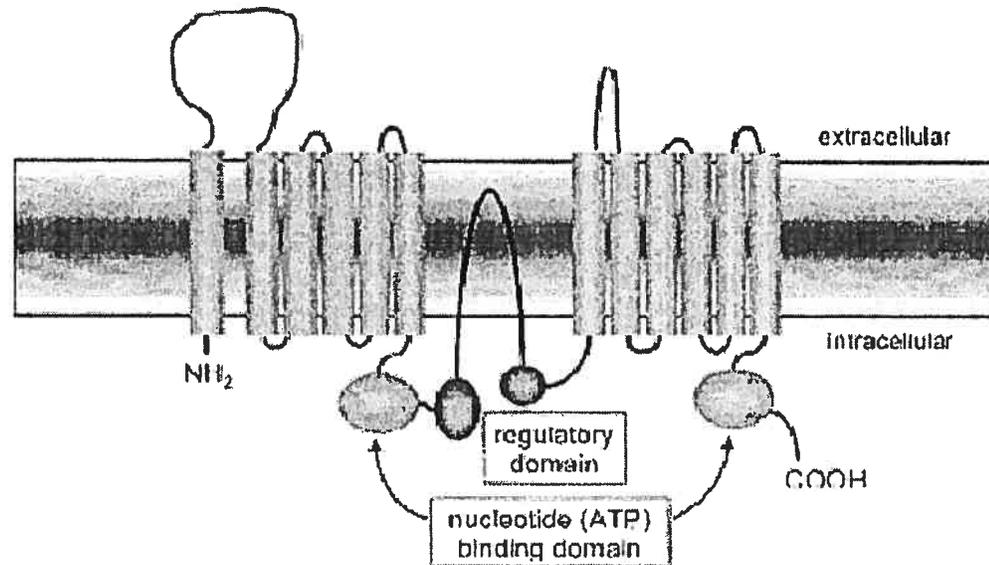


Figure 4. Structure prédite du transporteur ABCA1. Tirée de [38].

Il y a des évidences que apoA-I se lie directement à ABCA1 [39, 40]. Cependant, ce phénomène est controversé puisqu'une autre étude a suggéré que les résultats obtenus pourraient être dus à des interactions lipidiques en proximité de ABCA1 [41]. ABCA1 participe dans le RCT en facilitant l'efflux de cholestérol et de phospholipides des cellules afin qu'ils soient captés par des particules d'apoA-I pauvre en lipides. Celles-ci deviennent partiellement lipidées et passent ensuite à l'étape de HDL matures qui transportent les esters de cholestérol jusqu'au foie pour l'élimination. De cette façon, ABCA1 est le déterminant majeur des niveaux de HDL circulants puisqu'il contrôle l'étape initiale et limitante du RCT.

1.4.2. LCAT

L'enzyme LCAT est responsable de l'estérification du cholestérol des HDL, créant donc un centre hydrophobe de cholestérol estérifié dans la particule. La LCAT catalyse le transfert d'une chaîne acyle de la phosphatidylcholine au cholestérol,

formant ainsi un ester de cholestérol [16]. Contrairement au cholestérol libre, l'ester de cholestérol n'est pas amphipathique et se dirige donc vers le centre de la particule discoïdale [16]. Cela permet à la lipoprotéine d'accepter une plus grande quantité de cholestérol à partir de n'importe lequel donneur. La particule de HDL enrichie de cholestérol suite à l'action de la LCAT se nomme α -HDL. Il a été démontré chez la souris que la délétion de la LCAT provoque une diminution de plus de 90% du nombre de HDL circulants, dû à l'incapacité à produire des HDL matures et stables [42].

1.4.3. PLTP et CETP

La protéine de transfert de phospholipides (PLTP) circule associée aux HDL et régule le transfert et l'échange de phospholipides entre les différentes classes de lipoprotéines. Lors de la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL), la PLTP catalyse le transfert de leurs phospholipides vers les HDL afin de former des pré- β -HDL [43]. Tout comme la PLTP [44], la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) contribue aussi à la formation de particules de pré- β -HDL, accepteurs primaires de cholestérol dans la première étape du RCT [45]. La CETP promouvoit l'échange réciproque d'esters de cholestérol pour des triglycérides entre les HDL et les VLDL [43]. De cette façon, elle contribue au transport des esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et enfin vers le foie pour la clairance. En plus de leur implication dans l'échange de lipides entre les lipoprotéines, la PLTP et la CETP ont été impliquées dans les transferts de lipides entre les lipoprotéines et les cellules [46, 47]. La CETP peut également stimuler la capacitation des spermatozoïdes (processus abordé en 1.6.4.1.) [47].

1.4.4. Lipase hépatique

La lipase hépatique est une enzyme synthétisée en majorité par les hépatocytes [48] qui est sécrétée dans l'espace sinusoïdal où elle se lie à l'endothélium des capillaires et aux hépatocytes [49]. Elle catalyse l'hydrolyse des phospholipides et des triglycérides dans les lipoprotéines plasmatiques [48]. Étant donné la quantité élevée de phospholipides par rapport à celle des triglycérides retrouvée dans les HDL, l'activité phospholipase de la lipase hépatique est la plus importante au niveau physiologique. En déplaçant les phospholipides des HDL, elle facilite le transfert des esters de cholestérol vers les autres lipoprotéines par la CETP [50] ainsi que la reprise sélective des esters de cholestérol par les cellules [51]. L'inhibition de la lipase hépatique *in vivo* provoque l'accumulation de triglycérides, IDL, HDL, cholestérol et phospholipides [52, 53]. Il y a aussi des évidences pour un rôle non-enzymatique de la lipase hépatique qui serait de promouvoir la reprise cellulaire du cholestérol des HDL et pourrait avoir lieu avec une forme inactive de l'enzyme [54].

1.4.5. SR-B1

La livraison des esters de cholestérol des HDL aux cellules se fait via un processus nommé reprise sélective. Ce processus est dit sélectif puisque les hépatocytes reprennent beaucoup plus de HDL-cholestérol que d'apoA-I, donc le cholestérol est sélectivement repris [55]. Le récepteur scavenger de classe B-1 (SR-B1) a été identifié comme étant un récepteur aux HDL [56] qui permet la reprise sélective du HDL-cholestérol par les hépatocytes et les cellules stéroïdogéniques [57, 58]. Les souris qui surexpriment ce récepteur SR-B1 connaissent une augmentation

du transport du cholestérol des HDL vers la bile [57]. SR-B1 est fortement exprimé dans le foie, les ovaires et dans la surrénale et il est exprimé plus faiblement dans les testicules et les glandes mammaires [56]. Ceci soutient l'idée que SR-B1 serait un médiateur de la livraison du cholestérol aux tissus stéroïdogéniques (pour servir de précurseur aux hormones stéroïdiennes) et au foie dans l'étape finale du RCT. Il y a aussi des évidences que SR-B1 participe au RCT dans l'étape initiale d'efflux de cholestérol des cellules périphériques [59]. La nécessité de la liaison de SR-B1 aux particules de HDL pour promouvoir l'efflux a été un sujet controversé. Certaines équipes ont proposé que l'action de SR-B1 ne nécessiterait pas la liaison mais plutôt une redistribution du cholestérol vers un pool qui serait plus accessible aux accepteurs [60, 61]. Par contre, l'équipe de Krieger [62] a montré que la liaison des HDL à SR-B1 est nécessaire à l'efflux.

1.5. Les pathologies reliées au métabolisme des lipides

Le cholestérol, composant majeur des membranes plasmiques cellulaires et précurseur obligatoire pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes et d'acides biliaires, est essentiel à la vie. Par contre, une accumulation excessive de cholestérol constitue un facteur de risque bien établi pour les maladies cardiovasculaires. Il est généralement accepté que des niveaux élevés de LDL-cholestérol augmentent les chances de développer des maladies coronariennes, tandis que des niveaux élevés de HDL-cholestérol protègent contre le développement de ces maladies [63].

1.5.1. L'hypercholestérolémie familiale

Le récepteur aux LDL, qui se retrouve à la surface des cellules, enlève des LDL de la circulation par un processus d'endocytose [64]. On retrouve ces récepteurs

aux LDL principalement sur les hépatocytes et les cellules stéroïdogéniques. Des mutations dans le gène encodant le récepteur aux LDL mènent à l'hypercholestérolémie familiale (FH), un désordre autosomal dominant dont la forme hétérozygote affecte environ une personne sur 500 [65]. La mutation dans le récepteur réduit le catabolisme des LDL par approximativement 50%, ce qui fait doubler le niveau de LDL-cholestérol plasmatique. Le LDL-cholestérol excédentaire se dépose sur les tendons ainsi que sur les parois des artères, résultant en la formation de xanthomes au niveau des tendons et de plaques athéroscléreuses [65]. La FH non-traitée est caractérisée par le développement d'athérosclérose prématurée (entre 30 et 40 ans) et extensive, menant à la maladie coronarienne. La FH homozygote est beaucoup moins fréquente mais plus sévère, affectant environ une personne sur un million. Chez les patients atteints de la forme homozygote, les niveaux plasmatiques de LDL-cholestérol sont 4 à 5 fois plus élevés que la normale. Ces individus expriment très peu sinon aucun récepteur fonctionnel dû à la présence de mutations dans les deux allèles et meurent habituellement d'infarctus du myocarde avant l'âge de vingt ans [65].

1.5.2. L'athérosclérose

La maladie d'athérosclérose est responsable de la majorité des décès dans les pays occidentaux. Cette maladie naît de l'interaction entre les lipoprotéines oxydées, les monocytes-macrophages et des éléments de la paroi artérielle. Les lésions athéroscléreuses mènent à une réduction progressive de la lumière artérielle ce qui occasionne une baisse significative du flux sanguin. Chez la souris comme chez l'humain, l'athérosclérose est définie par la prolifération des cellules de l'intima des

artères ainsi que par l'accumulation de lipides [66]. L'étape d'initiation de la maladie est une perturbation de l'endothélium artériel, provoquant une expression à la hausse des molécules d'adhésion cellulaire [67]. Ceci provoque l'attachement et la transmigration des monocytes à l'intérieur de l'intima artériel. Les monocytes s'activent et se différencient en macrophages qui internalisent des débris cellulaires, des lipoprotéines ainsi que des lipoprotéines modifiées, telles les LDL-oxydés. Lorsqu'ils deviennent gorgées de lipoprotéines, les macrophages forment des cellules spumeuses (foam cells) qui relâchent leurs propres cytokines et facteurs de croissance, stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses. Les cellules spumeuses subissent la nécrose cellulaire dû à un excès lipidique, et forment un centre nécrotique au niveau de l'endothélium vasculaire. Cette accumulation lipidique sur l'endothélium est encapsulée par une chape fibreuse de cellules musculaires lisses qui sécrètent une matrice extracellulaire, stabilisant ainsi la lésion [68]. Dans les plaques avancées, il y a néo-vascularisation en réponse à l'angiogénèse [69]. Une fois initiée, une plaque athéroscléreuse peut rester stable pendant des années, mais certains facteurs peuvent mener à une plaque instable qui peut se détacher et causer un infarctus.

L'efflux efficace du cholestérol des macrophages vers les HDL est critique pour la prévention de la formation de cellules spumeuses et pour protéger contre l'athérosclérose. En fait, des études épidémiologiques ont établi une forte corrélation négative entre les niveaux de HDL circulants et le risque de développer une athérosclérose prématurée [70, 71]. Par contre, il existe des situations où une augmentation de l'incidence de l'athérosclérose est accompagnée de niveaux élevés

de HDL circulants. Par exemple, lorsque SR-B1 est déficient, la quantité de HDL est augmentée due à un défaut de reprise sélective [72]. Malgré cela, le processus de transport inverse du cholestérol joue un rôle crucial dans la protection contre l'athérosclérose.

1.5.3. La maladie de Tangier

Le premier cas de maladie de Tangier a été identifié en 1960, lorsque l'équipe de Fredrickson [73] a découvert que l'un de leurs patients avait des grosses amygdales jaune-orangées. Ce patient habitait l'île de Tangier, d'où provient le nom de la maladie, et sa sœur présentait les mêmes caractéristiques. Des analyses subséquentes ont révélé que leurs amygdales étaient gorgées d'esters de cholestérol et que leur plasma ne contenait presque pas de HDL. La maladie de Tangier est un défaut génétique autosomal récessif avec moins de 100 cas répertoriés jusqu'à présent. Cette maladie est caractérisée par de grosses amygdales orangées, des neuropathies, la splénomégalie, l'hépatomégalie, l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires [74]. Il y a accumulation de cholestérol estérifié dans les cellules réticulo-endothéliales de certains tissus tels les amygdales, le thymus, les ganglions, la moelle osseuse, la rate, la vésicule biliaire et la muqueuse intestinale. Plusieurs patients ont aussi des dépôts lipidiques dans les cellules de Schwann, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. En plus des très bas niveaux de HDL et d'apoA-I, les personnes atteintes de la maladie de Tangier ont une réduction d'environ 50% en LDL. Les patients âgés de plus de 30 ans connaissent une incidence six fois plus élevée de maladies coronariennes [75]. Ce risque modérément élevé

n'est pas aussi dramatique que ce qui était attendu en quasi-absence de HDL. Cela pourrait être attribuable en partie à la diminution des niveaux de LDL athérogènes.

En 1999, le défaut génétique responsable de la maladie de Tangier a été identifié comme étant une mutation homozygote dans le gène encodant le transporteur ABCA1 [31-34]. Comme il a été mentionné dans la section 1.4.1., ABCA1 contrôle la première étape du transport inverse du cholestérol, soit l'efflux de cholestérol cellulaire. Il n'est donc pas surprenant que sa mutation mène à une accumulation de cholestérol dans les cellules. Par contre, certaines études ont montré que l'efflux de cholestérol vers les HDL en absence d'ABCA1 est diminué de seulement 50% [76-78]. De plus, l'accumulation de cholestérol n'est pas observée dans tous les tissus mais est limitée aux cellules des organes du système réticulo-endothélial. Cela laisse croire que des mécanismes d'efflux ABCA1-indépendants doivent entrer en jeu, particulièrement à l'extérieur du système réticulo-endothélial.

1.5.4. L'hypoalphalipoprotéïnémie familiale

Le gène encodant ABCA1 est aussi muté dans la maladie d'hypoalphalipoprotéïnémie familiale (FHA). Tandis que la maladie de Tangier est causée par une mutation homozygote dans ce gène, la FHA résulte de la mutation hétérozygote [31-34]. Les patients atteints de FHA ont une diminution significative dans l'efflux de cholestérol cellulaire [77, 79, 80]. Malgré des études par l'équipe de Genest Jr [81] qui ont rapporté des défauts d'efflux lipidique dans 50% des cas étudiés et des mutations dans ABCA1 dans 29% des cas, une étude publiée par Hovingh *et al.* [82] a montré que seulement 4,5% des cas étudiés présentaient des défauts dans l'efflux de cholestérol ABCA1-dépendant. Cela a fortement suggéré que

des mécanismes d'efflux non-ABCA1-dépendants pourraient être importants dans l'établissement des niveaux plasmatiques de HDL chez ces patients.

1.6. Les protéines majeures du plasma séminal bovin

Le plasma séminal est un liquide biologique contenant les sécrétions des testicules, des épидидymes et des glandes accessoires sexuelles. Il contient de nombreuses protéines qui représentent une concentration moyenne de 68 mg/ml [83]. La fraction protéique majeure du plasma séminal bovin est constituée d'une famille de protéines acides étroitement apparentées nommées BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30kDa, collectivement appelées protéines BSP. Ces protéines constituent environ 65% des protéines totales du plasma séminal bovin, leur concentration se retrouvant entre 30 et 50 mg/ml dans ce liquide [84]. Elles sont synthétisées et secrétées par les vésicules séminales du taureau [84] et jouent un rôle crucial dans la capacitation des spermatozoïdes bovins. Les protéines BSP-A1 et BSP-A2 ne diffèrent l'une de l'autre que par leur degré de glycosylation, alors elles sont considérées comme une seule entité chimique nommée BSP-A1/-A2. Ces deux protéines ensemble sont aussi connues comme PDC-109, où P désigne protéine, D et C sont l'abréviation des acides aminés aux extrémités N- et C- terminales, respectivement et 109 représente la taille en acides aminés de la protéine [85].

1.6.1. Caractéristiques biochimiques des protéines BSP

Les propriétés biochimiques de ces protéines ont été largement étudiées [84]. Les protéines BSP-A1, -A2 et -A3 ont toutes des poids moléculaires entre 15 et 16,5 kDa, tandis que BSP-30kDa a un poids moléculaire qui se situe entre 28 et 30 kDa [86, 87]. Leur taille en acides aminés (aa) est de 109 aa pour BSP-A1/-A2, 115 aa

pour BSP-A3 et 158 aa pour BSP-30kDa. Les points isoélectriques (pI) des protéines BSP varient entre 4,7 et 5,0 pour BSP-A1, entre 4,9 et 5,2 pour BSP-A2, entre 4,8 et 5,2 pour BSP-A3 et entre 3,9 et 4,6 pour BSP-30kDa [88]. À pH alcalin, les protéines BSP-A1 et BSP-A2 s'auto-associent mais se dissocient en monomères en conditions acides [89]. Toutes les protéines de la famille des BSP sont des glycoprotéines, à l'exception de BSP-A3; et la protéine BSP-30kDa est la plus fortement glycosylée. La protéine BSP-A1 contient des sucres neutres, de la galactosamine ainsi que de l'acide sialique tandis que BSP-A2 ne contient que la galactosamine et l'acide sialique. BSP-30kDa, de son côté, contient les trois types de sucres mais en quantité beaucoup plus élevée [84].

1.6.2. Structure des protéines BSP

Les protéines BSP-A1/-A2, BSP-A3 et BSP-30kDa ont des séquences en acides aminés similaires mais non-identiques [84]. En fait, elles partagent une homologie de séquence entre 60 et 80%. La plus grande différence est notée dans la portion amino-terminale dont la longueur varie entre chacune des protéines. C'est la protéine BSP-30kDa qui possède la plus longue extension amino-terminale parmi les protéines BSP. Bien que leurs structures primaires diffèrent, la structure secondaire des protéines BSP est très similaire. Elle est caractérisée par la présence de deux domaines de type II, semblables à ceux retrouvés chez la fibronectine, arrangés en tandem [90, 91]. Ces domaines, qui contiennent chacun deux ponts disulfures reliant les cystéines 1-3 et 2-4, sont ceux responsables de la plupart des propriétés de liaison des protéines BSP. Contrairement aux autres accepteurs lipidiques, tel apoA-I, les protéines BSP ne contiennent pas d'hélices amphipathiques mais sont plutôt

composées de feuillets- β [92]. Les structures des protéines BSP sont représentées à la Figure 5.

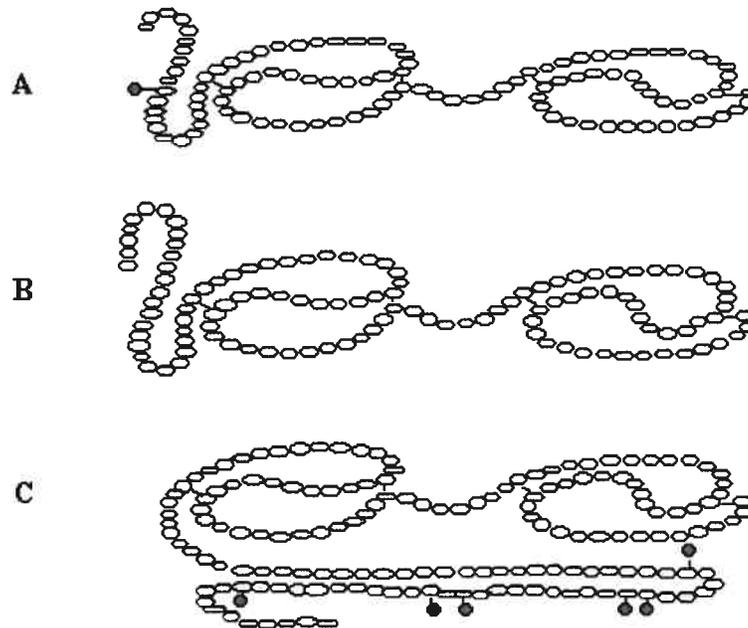


Figure 5. Structure des protéines BSP. A) BSP-A1/-A2 [85], B) BSP-A3 [90], C) BSP-30kDa [93]. Les sites de glycosylation sont représentés par un rond rouge.

1.6.2.1. Les domaines de type II

Les domaines extracellulaires des protéines membranaires sont souvent caractérisés par des patrons spécifiques de résidus cystéine, qui forment des ponts disulfure et stabilisent la protéine repliée. Les domaines de type II, aussi appelés FN2 (fibronectin type II) sont des petits domaines d'environ 40 acides aminés contenant deux ponts disulfure. Ils ont d'abord été identifiés dans la protéine de la matrice extracellulaire appelée fibronectine [94]. Les domaines de type II de la fibronectine sont des sites de liaison au collagène [91]. Des domaines semblables sont aussi retrouvés dans les portions cytoplasmiques de protéines associées à la membrane

protéines associées à la membrane plasmique, telles les membres de la famille des récepteurs au mannose et à la phospholipase A2 [95, 96] et des récepteurs au facteur de croissance semblable à l'insuline-II (IGF-II) [97, 98]. On retrouve aussi des domaines FN2 chez les metalloprotéinases de la matrice extracellulaire, MMP-2 et MMP-9 [99, 100] ainsi que dans le facteur XII du plasma humain [101] et dans l'activateur du facteur de croissance des hépatocytes [102]. Constantine *et al.* [103] ont caractérisé la conformation en solution d'un domaine de type II de BSP-A1/A2 par ^1H -RMN et ils ont conclu que plusieurs résidus aromatiques et acides sont impliqués dans la liaison au collagène/gélatine. Ces résidus sont extrêmement bien conservés dans les structures primaires des récepteurs à l'IGF-II séquencés à partir de tissus de différentes espèces [97, 98, 104, 105]. Les quatre résidus cystéines qui forment les ponts disulfures à l'intérieur du domaine de type II sont également très conservés. Les domaines FN2 sont similaires au motif kringle retrouvé chez les protéases, qui ont aussi deux feuillets- β antiparallèles avec un site de liaison au ligand riche en résidus aromatiques [106], ainsi que deux ponts disulfures rapprochés en position quasi-orthogonale [103]. Étant donné la présence de motifs kringle mais l'absence de domaines FN2 chez les invertébrés, il est proposé que le motif kringle soit l'ancêtre du domaine FN2.

1.6.3. Propriétés de liaison des protéines BSP

Les protéines BSP sont en mesure d'interagir avec une panoplie de molécules, ces interactions se faisant souvent par l'entremise de leurs domaines de type II. D'abord, elles peuvent lier les collagènes de type I, II, IV et V, soit dans leur forme native ou dénaturée. L'affinité pour la forme dénaturée appelée gélatine est plus

grande que pour le collagène [84]. Ensuite, les domaines de type II sont aussi responsables de la liaison des protéines aux glycosaminoglycanes (GAGs) tels l'héparine, l'héparan sulfate et la chondroïtine sulfate B [107, 108]. De plus, les protéines BSP sont en mesure de se lier à la membrane plasmique des spermatozoïdes et des autres cellules via une interaction spécifique avec les phospholipides portant un groupement choline tels la phosphatidylcholine, la sphingomyéline et la lysophosphatidylcholine [109]. Une interaction avec le fibrinogène [84], avec la calmoduline [110] ainsi qu'avec l'IGF-II [111] ont aussi été démontrées. Comme il a été mentionné dans la section précédente, le récepteur à l'IGF-II contient lui aussi des domaines de type II [97]. Les protéines BSP sont également en mesure de se lier aux HDL par l'entremise de l'apoA-I [112], quoique cette interaction ne semble pas se faire par l'intermédiaire des domaines de type II. Finalement, il a récemment été démontré que les protéines BSP lient la fraction des lipoprotéines de faible densité du jaune d'œuf utilisé dans les diluants pour la cryopréservation des spermatozoïdes [113] et que cette liaison serait à la base de l'effet protecteur de ces diluants [114].

1.6.4. Rôles biologiques des protéines BSP

Lors de leur découverte, les protéines BSP ont d'abord été caractérisées comme des protéines capables de stimuler la relâche de gonadotropines (hormone lutéinisante et hormone folliculo-stimulante) à partir de cellules hypophysaires en culture [89]. Par la suite, il a été démontré que ces protéines interagissent avec la membrane plasmique des spermatozoïdes et jouent un rôle crucial dans le phénomène de capacitation.

1.6.4.1. La capacitation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes de mammifères, fraîchement éjaculés, sont inaptes à la fécondation de l'ovocyte. Ils acquièrent cette capacité lors de leur transit dans le tractus génital femelle où ils subissent une série de modifications. Ce processus de maturation nommé capacitation a été découvert de façon indépendante par les équipes de Chang [115] et Austin [116]. La capacitation est un processus à plusieurs étapes qui n'est toujours pas très bien compris et qui comprend de nombreuses modifications biochimiques et structurales dans la membrane du spermatozoïde. Cela lui permet de s'engager dans la réaction de l'acrosome, mécanisme final de maturation qui mène à la fusion des gamètes. La capacitation engendre de nombreux changements chez le spermatozoïde tels la perte de composantes originaires du plasma séminal, la modification de la composition lipidique de la membrane plasmique, l'augmentation de la perméabilité au calcium, l'augmentation du pH intracellulaire, la redistribution des composantes de surface, l'augmentation de la motilité, l'élévation de l'AMP cyclique et la phosphorylation sur tyrosine des protéines du spermatozoïde [117-122].

L'équipe de Davis [123] a proposé que la capacitation implique une diminution dans le ratio cholestérol/phospholipide membranaire. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes ont un ratio cholestérol/phospholipide élevé tandis que ce ratio diminue lors de la capacitation puisqu'il y a un mouvement du cholestérol de la membrane vers des accepteurs lipidiques solubles. Ce processus de transfert de cholestérol de la part de la membrane vers un accepteur se nomme efflux de cholestérol, contrairement à un influx qui serait caractérisé par le transfert de cholestérol d'un donneur vers la membrane. Puisque le cholestérol a un effet

stabilisant sur les membranes [1], son efflux provoquerait une déstabilisation de la membrane plasmique afin de permettre la réaction de l'acrosome.

1.6.4.2. La capacitation induite par l'héparine

Les fluides oviductal et folliculaire contiennent tous les éléments nécessaires à la capacitation, soient les ions Ca^{2+} , HCO_3^- et K^+ ainsi que des facteurs capacitants. Chez le bovin, ces facteurs sont les GAGs semblables à l'héparine et les accepteurs de cholestérol tels les HDL.

L'équipe de Parrish [124] a montré que l'héparine fait augmenter l'incidence de la réaction de l'acrosome en favorisant la capacitation des spermatozoïdes. Il semblerait que l'héparine se lie au spermatozoïde par un processus récepteur-ligand [125]. Le mécanisme de capacitation établi par Parrish [126] propose que lors de la liaison de l'héparine, il y ait perte des facteurs décapacitants à la surface du spermatozoïde, activation de canaux à protons engendrant une alcalinisation du cytoplasme et une entrée de calcium. L'augmentation du calcium intracellulaire ainsi que l'élévation du pH entraînerait l'activation de l'adénylate cyclase provoquant une augmentation de la quantité d'AMP cyclique intracellulaire ce qui mènerait à la régulation de l'activité de protéines grâce à un processus de phosphorylation dépendant de protéines kinases A.

1.6.4.3. La capacitation induite par les HDL

Des évidences indiquent qu'il y aurait des molécules présentes dans l'appareil génital féminin qui faciliteraient l'efflux du cholestérol de la membrane spermatique en agissant comme des accepteurs lipidiques. Plusieurs études ont tenté d'identifier

ces facteurs et les résultats ont montré que l'albumine [127, 128] et les HDL [129, 130] sont des accepteurs de cholestérol présents dans l'oviducte. Chez le bovin et l'humain, les HDL semblent être des accepteurs de cholestérol plus efficaces que l'albumine [130, 131]. Les HDL, probablement dérivés du plasma, sont la seule classe de lipoprotéines présente dans les fluides oviductal et folliculaire bovins [130, 132], leur concentration étant élevée pendant la période d'ovulation et basse pendant le reste du cycle oestral [133]. Dans la capacitation induite par les HDL, il y a diminution du ratio cholestérol/phospholipide engendré par l'efflux du cholestérol vers l'accepteur. Cette altération de la composition lipidique est un phénomène réversible [134, 135] qui entraînerait une augmentation de la fluidité membranaire provoquant une augmentation de la perméabilité aux ions, induisant ainsi la capacitation [123, 129, 136]. Des études ont montré que les HDL sériques ou les HDL du fluide folliculaire (FF-HDL) seuls sont en mesure d'induire la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires, mais que ce processus requiert plusieurs heures [137, 138]. Les FF-HDL sont de meilleurs stimulateurs de la capacitation que les HDL sériques [138]. Comparativement aux HDL sériques, les FF-HDL contiennent une proportion plus élevée de pré- β -HDL [139], qui ont été démontrés comme étant des accepteurs primaires de cholestérol [9]. Il semblerait que l'apoA-I des HDL serait un facteur important dans la stimulation de la capacitation. En fait, des liposomes contenant l'apoA-I stimulent la capacitation plus rapidement que les HDL, soit en 2-5 h comparativement à 8 h avec les HDL [137]. Les autres classes de lipoprotéines, LDL et VLDL, ne sont pas en mesure de stimuler la capacitation des spermatozoïdes [137].

1.6.4.4. La capacitation induite par les protéines BSP

La capacitation de spermatozoïdes épидидymaires induite par l'héparine ou les autres GAGs requiert environ 22 h, tandis que dans le cas des spermatozoïdes éjaculés le temps est diminué à 9 h [140-142]. Le contact des spermatozoïdes avec le plasma séminal réduirait donc le temps nécessaire pour la capacitation. En fait, lorsque les spermatozoïdes épидидymaires sont d'abord incubés avec le plasma séminal avant l'incubation avec les GAGs, le temps nécessaire au processus diminue de plus de la moitié [143, 144]. Il semblerait que les spermatozoïdes bovins épидидymaires possèdent moins de sites de liaison à l'héparine que les spermatozoïdes éjaculés [143, 144]. Étant donné que les protéines BSP constituent la fraction majeure du plasma séminal bovin et qu'elles sont en mesure de lier l'héparine [107], il avait été proposé que ces protéines soient impliquées dans la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires induite par l'héparine. En effet, il a été démontré qu'une pré-incubation avec les protéines BSP purifiées précédant l'incubation avec l'héparine permet aux spermatozoïdes épидидymaires de capaciter et ce, de manière dose-dépendante [145]. À l'éjaculation, les protéines BSP agiraient donc en liant la membrane plasmique du spermatozoïde via leur interaction avec les phospholipides portant un groupement choline [109]. Grâce à leur propriété de lier l'héparine, les protéines BSP augmenteraient le nombre de sites de liaison à l'héparine sur la surface spermatique, conduisant ainsi à une accélération de la capacitation induite par l'héparine.

Le processus de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires par les HDL seuls demande au moins 8 h [137, 138]. Par contre, lorsqu'il y a pré-incubation des

spermatozoïdes avec les protéines BSP purifiées avant l'ajout des HDL, le pourcentage de spermatozoïdes capités augmente et le temps nécessaire à la capacitation diminue à 5 h [137, 138]. Les protéines BSP accélèrent donc la capacitation induite par les HDL. Il a aussi été montré que les HDL et les protéines BSP sont en mesure de stimuler l'efflux de cholestérol de la membrane spermatique [131]. Les protéines BSP seules peuvent induire cet efflux et mener à la capacitation des spermatozoïdes si la période d'incubation des spermatozoïdes avec les protéines BSP est longue. Par contre, cette situation n'est pas physiologique puisque *in vivo*, le plasma séminal qui contient les protéines BSP est dilué et perdu lors de la progression des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle [146]. *In vitro*, les particules d'efflux obtenues suite à l'incubation avec les protéines BSP sont homogènes, contiennent des protéines BSP et ont une densité comparable à celle des HDL [131].

En considérant tous ces détails, deux mécanismes distincts ont été proposés afin d'expliquer la capacitation impliquant les protéines BSP (Figure 6). Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes entrent en contact avec le plasma séminal contenant les protéines BSP pour une courte durée d'environ 20 à 30 min. Ceci provoquerait un premier efflux de cholestérol ainsi que la relâche de phospholipides. Cet efflux lipidique pourrait légèrement déstabiliser la membrane spermatique. Dû à l'interaction des protéines BSP avec les phospholipides de la membrane, les spermatozoïdes se feraient aussi enrober de protéines BSP. Les protéines BSP pourraient prévenir le mouvement libre des phospholipides membranaires, restabilisant ainsi un peu la membrane. Les spermatozoïdes, enrobés de protéines BSP, voyageraient alors dans le tractus génital femelle où ils pourraient être capités

par deux mécanismes différents. D'abord, dans le cas de la capacitation induite par l'héparine, la liaison des protéines BSP à la membrane spermatique ferait augmenter le nombre de sites de liaison à l'héparine sur la surface du spermatozoïde. Suite à la liaison de l'héparine sur la membrane, les spermatozoïdes subiraient toute la série d'événements énumérés dans la section 1.5.4.2. Dans le cas de la capacitation induite par les HDL, les spermatozoïdes enrobés de protéines BSP pourraient interagir avec les HDL présents dans le fluide folliculaire et subir un second efflux de cholestérol membranaire au niveau du tractus génital femelle. Ceci provoquerait une diminution encore plus importante du ratio cholestérol/phospholipide menant à la capacitation. La perte de cholestérol déstabiliserait la membrane davantage, menant à l'expression membranaire spermatique de récepteurs pour la zone pellucide de l'ovocyte [147]. L'adhésion à la zone pellucide engendrerait alors la réaction de l'acrosome.

Malgré que *in vitro* les protéines BSP seules semblent être capables de provoquer la capacitation des spermatozoïdes, la situation physiologique doit être différente due à la perte des composantes du plasma séminal lors du passage des spermatozoïdes à travers le mucus cervical [146]. *In vivo*, les protéines BSP qui restent liés à la membrane spermatique ne seraient pas en mesure de stimuler la capacitation par elles-mêmes mais nécessiteraient la présence de facteurs capacitants présents dans le tractus génital femelle. Cela permettrait que la capacitation ait lieu au bon moment et au bon endroit.

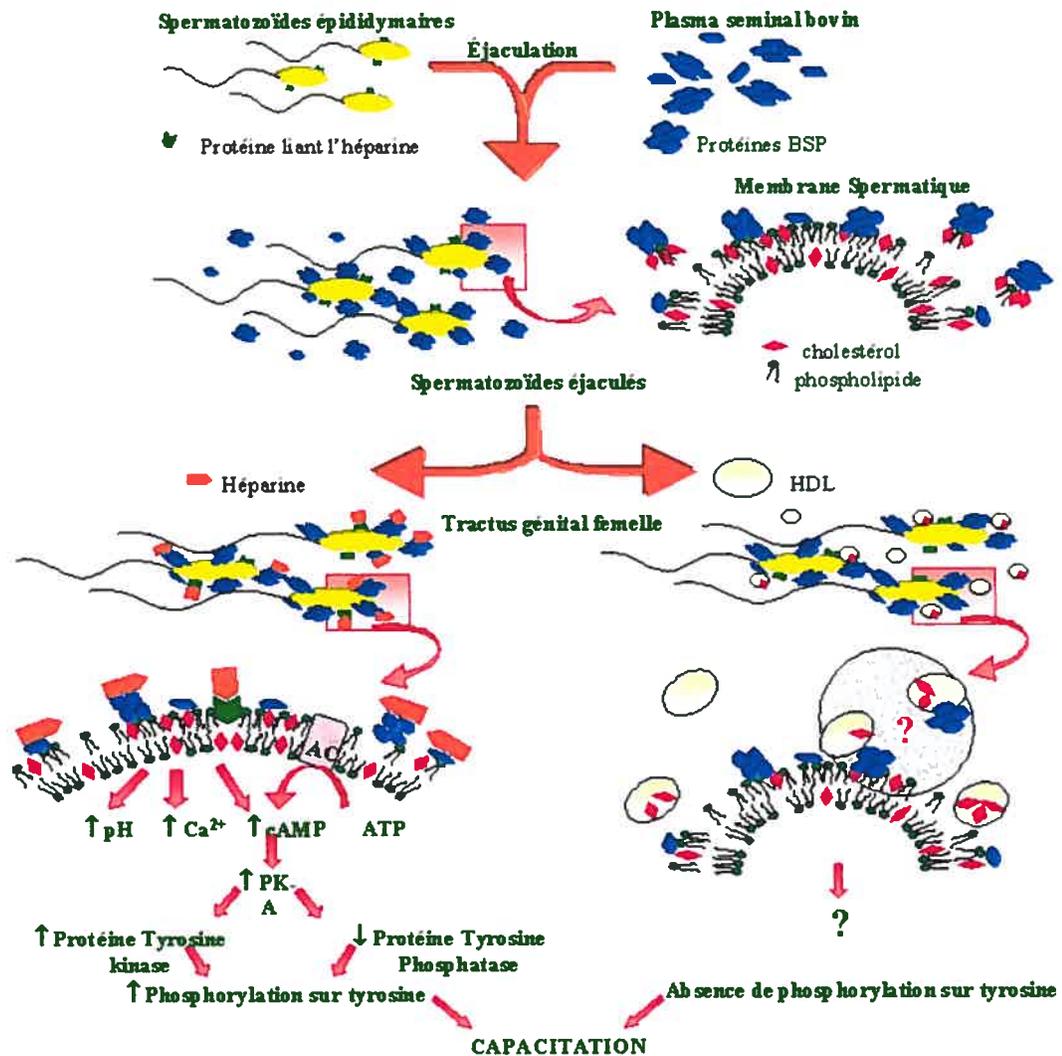


Figure 6. Modèle de la capacitation bovine. Tirée de [148].

1.6.5. Les protéines BSP-homologues chez d'autres espèces de mammifères

Étant donné le rôle crucial des protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes bovins, il n'est pas surprenant que des protéines homologues se retrouvent dans le plasma séminal de d'autres espèces de mammifères. Lors d'essais radioimmunologiques (RIA), les protéines BSP ont été détectées dans le plasma séminal du bovin, de l'humain, du porc, du cheval, du bélier, du rat et du singe [84].

Depuis ce temps, ces protéines analogues ont été isolées à partir du plasma séminal de bouc [149], de bison [150], de cheval [151-153] et de bélier [154]. Le tableau 1 énonce tous les homologues aux protéines BSP retrouvées chez ces différentes espèces. Les protéines BSP seraient donc ubiquitaires dans le plasma séminal des mammifères.

TABLEAU 1. Homologues des protéines BSP chez différentes espèces de mammifères

Espèce	Protéines	Référence
Bovin	BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, BSP-30kDa	[86, 87]
Porc	pB1	[152]
Cheval	HSP-1, HSP-2 HSP-14	[151-153]
Bouc	GSP-14kDa, GSP-15kDa GSP-20kDa, GSP-22kDa	[149]
Bélier	RSP-15kDa, RSP-16kDa RSP-22kDa, RSP-24kDa	[154]
Bison	BiSV-16kDa, BiSV-17kDa BiSV-18kDa, BiSV-28kDa	[150]

1.6.6. La distribution des protéines BSP

Il est évident que la concentration la plus importante de protéines BSP se retrouve au niveau du plasma séminal. Par contre, des RIA ont montré la présence de ces protéines, en concentrations beaucoup plus faibles, dans d'autres liquides biologiques ainsi que dans le tissu testiculaire [84]. Chez le bovin, les protéines BSP ont été détectées dans le fluide des vésicules séminales, le plasma séminal, le sérum ainsi que dans les testicules. Chez l'espèce porcine, des protéines BSP ont été

détectées au niveau du sérum par RIA. D'autres études ont montré qu'une protéine nommée pB1 se retrouve au niveau du plasma séminal porcine et que cette protéine a une structure similaire à celle des protéines BSP [152, 155]. Chez le rat, les protéines BSP ont été détectées dans le sérum, les vésicules séminales ainsi que les testicules. Le sérum, plasma et plasma séminal de l'humain contiennent aussi des BSP, ainsi que le sérum du cheval, du mouton et du singe [84].

1.6.7. La stimulation d'efflux lipidiques chez les fibroblastes

Les spermatozoïdes sont un type cellulaire avec lequel il peut s'avérer très difficile de travailler puisqu'ils ne peuvent être en culture pour de longues périodes et ont une viabilité limitée. De plus, les spermatozoïdes éjaculés sont déjà en contact avec les protéines BSP ce qui rend difficile d'effectuer des études sur l'effet de ces protéines. Cela requiert l'obtention de spermatozoïdes épидидymaires qui peut être difficile. Des études de notre laboratoire ont donc tenté d'évaluer le potentiel de l'utilisation du fibroblaste comme modèle pour étudier l'efflux lipidique stimulé par les protéines BSP. Il a été démontré que les protéines BSP sont en mesure de stimuler des efflux de cholestérol et de phospholipides à partir de fibroblastes humains [156]. Ce type cellulaire a donc été considéré comme étant un bon modèle pour l'étude du mécanisme d'efflux lipidique BSP-dépendant.

1.6.7.1. Le mécanisme de l'efflux cellulaire BSP-dépendant

L'efflux lipidique provoqué par les protéines BSP a été comparé avec des accepteurs de cholestérol connus tels l'apoA-I, les lipoprotéines reconstituées contenant l'apoA-I (LpA-I) et les HDL, et cette étude a révélé des différences mécanistiques. La vitesse de l'efflux stimulé par les protéines BSP est rapide pendant

les vingt premières minutes du contact entre les fibroblastes et les protéines BSP, et diminue ensuite pour atteindre un plateau après 90 minutes. Cet efflux est différent de l'efflux généré par les autres accepteurs qui lui, est relativement constant [156]. Une autre différence est que l'efflux stimulé par les protéines BSP est inhibé si les protéines sont préalablement incubées avec de la choline, ce qui n'est pas observé avec apoA-I. Il semblerait donc que l'interaction des phospholipides portant un groupement choline dans la membrane cellulaire avec les sites de liaison au groupement choline des protéines BSP est nécessaire à l'efflux. Les particules d'efflux générées suite à l'incubation des fibroblastes avec les protéines BSP ont une densité entre 1,12 et 1,14 g/ml, ce qui est comparable aux lipoprotéines de haute densité [157]. À titre de comparaison, les particules générées avec l'apoA-I ont une densité de 1,10 g/ml [26]. Les particules obtenues en présence de protéines BSP ont une taille égale ou supérieure à celle des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et sont composées de cholestérol, de phospholipides portant un groupement choline ainsi que de protéines BSP. Ces particules ont un ratio cholestérol : phospholipide de 1,5 : 1 comparativement aux lipoprotéines LpA-I [158] et aux HDL [159] qui génèrent des particules ayant un ratio inférieur à un. De plus, il a été montré que l'apoA-I délipidé provoque un efflux équimolaire de cholestérol et de phospholipides [160]. Les BSP provoquent donc la formation de particules d'efflux qui ont une composition différente de celles générées par les lipoprotéines. De plus, lors d'études d'efflux avec des protéines BSP et du cholestérol marqué, il n'y a pas atteinte d'un équilibre entre le cholestérol marqué retrouvé dans les cellules et dans le milieu de culture. Il y a plutôt une saturation des particules d'efflux avec le cholestérol, ce qui

indique un efflux unidirectionnel [161] différent de la diffusion passive où un équilibre est généralement atteint. Cet efflux en un seul sens est corrélé avec ce qui est observé chez le spermatozoïde, où l'acquisition du potentiel de fécondation est un processus irréversible. Aussi, lorsque la température est diminuée au-dessous de 22°C, l'efflux de cholestérol régulé par apoA-I est inhibé tandis que l'efflux BSP-dépendant a toujours lieu [161]. Cela indique que la mobilisation intracellulaire de cholestérol n'est peut-être pas impliquée car celle-ci est abolie sous 22°C [162]. La mobilisation intracellulaire du cholestérol est une caractéristique de l'efflux lipidique stimulé par des récepteurs tel ABCA1 [163]. L'efflux BSP-dépendant n'est pas inhibé par la progestérone, agent qui diminue le nombre de microdomaines membranaires nommés cavéoles à la surface cellulaire, indiquant que les cavéoles ne sont probablement pas impliquées dans le phénomène [161]. Au contraire, les cavéoles sont les sites majeurs pour l'efflux stimulé par les lipoprotéines [164]. Le mécanisme d'efflux lipidique par les protéines BSP ne semble donc pas se faire par diffusion passive, ni via un mécanisme récepteur-dépendant mais plutôt par une interaction spécifique des protéines BSP avec les phospholipides portant un groupement choline de la membrane plasmique des cellules.

1.7. Objectifs du projet de recherche

Les efflux lipidiques observés lors de la première étape du transport inverse du cholestérol et dans le processus de capacitation des spermatozoïdes semblent très similaires. Les deux processus impliquent un efflux de cholestérol et de phospholipides depuis une membrane cellulaire vers des particules de HDL. La différence majeure réside dans la protéine médiatrice de l'efflux. Jusqu'à présent,

ABCA1 est la protéine qui a été identifiée comme étant responsable de la majeure partie de l'efflux lipidique des cellules périphériques dans le RCT. Par contre, l'efflux significatif de cholestérol en absence d'ABCA1 amène la possibilité de l'existence de voies alternatives pour la relâche cellulaire de cholestérol, qui pourraient faire intervenir d'autres protéines médiatrices. Ces voies alternes pourraient partiellement compenser l'absence d'ABCA1 dans la maladie de Tangier et expliquer le taux relativement bas d'incidents cardiovasculaires dans la population atteinte.

Les protéines BSP peuvent lier la membrane plasmique des spermatozoïdes et stimuler un efflux de cholestérol et de phospholipides. Elles lient aussi l'apoA-I ainsi que les HDL, accepteurs de cholestérol dans la première étape du RCT. Leur effet de stimulation d'efflux lipidiques n'est pas spécifique seulement aux spermatozoïdes puisqu'elles peuvent aussi stimuler l'efflux lipidique à partir de fibroblastes humains. En considérant tous ces détails, les protéines BSP pourraient constituer une nouvelle classe de stimulateurs d'efflux lipidiques dans une voie alternative du RCT.

Afin de valider cette hypothèse, il est essentiel de vérifier que les protéines BSP sont véritablement retrouvées dans les tissus périphériques et le sang, puisque c'est à cet endroit qu'a lieu le transport du cholestérol. Le premier objectif de mon projet était **de localiser les protéines BSP dans différents tissus périphériques bovins à l'aide de la technique d'immunohistochimie**. Ces études permettraient de proposer que les BSP puissent être ubiquitaires dans l'organisme, ainsi que d'identifier les tissus propices pour l'isolement ultérieur de protéines BSP tissulaires.

Étant donné que les protéines BSP n'ont jamais été isolées ailleurs que dans le système reproducteur mâle, il était important d'utiliser plus d'une approche expérimentale afin de montrer leur présence ubiquitaire. Le deuxième objectif du projet était donc **d'isoler les protéines BSP à partir des tissus ayant été identifiés positifs par immunohistochimie et d'établir la meilleure stratégie de purification des protéines BSP à partir des tissus bovins.** Cela permettrait l'isolement d'une grande quantité de ces protéines pour des caractérisations ultérieures.

Puisque le cholestérol est transporté par le sang, il était primordial de vérifier si les protéines BSP se retrouvaient dans ce liquide biologique. Notre troisième objectif était donc **d'isoler les protéines BSP à partir du sérum bovin et d'établir la meilleure stratégie de purification des protéines BSP à partir du sérum bovin.**

L'accomplissement de ces études permettrait d'identifier les protéines BSP comme médiateurs d'efflux lipidiques à partir des cellules périphériques dans le transport inverse du cholestérol. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le RCT permettrait, à long terme, d'améliorer le diagnostic et le traitement des maladies associées au métabolisme lipidique, telle l'athérosclérose.

2. Résultats

2.1. Detection of Novel Phospholipid-Binding Proteins in Bovine Tissues and Serum: A Potential Role in Reverse Cholesterol Transport? (2004) Lefebvre, J. and Manjunath, P., *sera soumis à J Biol Chem ou à J Lipid Res.*

Préambule:

Malgré de nombreuses études, la première étape du RCT, soit l'efflux cellulaire de lipides, demeure mal comprise. L'implication du transporteur ABCA1 a été très bien établie, mais des évidences suggèrent l'existence de voies alternatives. Des études antérieures du laboratoire ont démontré que les protéines BSP stimulent l'efflux de cholestérol et de phospholipides de la membrane des spermatozoïdes et des fibroblastes. Les protéines BSP pourraient aussi être impliquées dans la stimulation d'efflux lipidiques à partir des tissus périphériques dans une voie alternative du RCT. Dans la présente étude, nous avons démontré que les protéines BSP sont présentes dans les tissus périphériques ainsi que dans le sérum bovin. Par immunohistochimie, nous avons détecté ces protéines dans les poumons, l'intestin, le cœur, les reins et le foie bovins. Nous avons établi une stratégie d'isolement et de purification de ces protéines à partir des sources mentionnées. Dans le cas des tissus, la meilleure stratégie a été l'utilisation d'une chromatographie d'affinité sur colonne GAG-agarose, suivie d'une purification par HPLC. Pour le sérum, une chromatographie d'affinité gélatine-agarose suivie de la purification par HPLC s'est avérée plus efficace. La présence des protéines BSP dans les tissus et le sérum démontre que ce sont des protéines ubiquitaires. Ainsi, les protéines BSP sont de très bons candidats pour la stimulation d'efflux lipidiques dans le RCT.

**Detection of Novel Phospholipid-Binding Proteins in Bovine Tissues and Serum:
A Potential Role in Reverse Cholesterol Transport?***

Jasmine Lefebvre† and Puttaswamy Manjunath†**

*From the ‡Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and
Department of Medecine, University of Montreal, Montreal, Quebec, HIT 2M4
Canada*

Running Title: Phospholipid-binding proteins in tissues and serum

* This work is supported by the Canadian Institutes of Health Research.

** To whom correspondence should be addressed: Centre de Recherche Guy-Bernier,
Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boulevard de l'Assomption, Montréal,
Québec, Canada HIT 2M4 Tel.: 514-252-3562 or 514-252-3400 (ext. 3329). Fax:
514-252-3430.

SUMMARY

Reverse cholesterol transport is a process whereby excess cholesterol is transported from peripheral cells to the liver for catabolism. Despite extensive studies, the mechanism underlying cholesterol removal from cells remains unclear. Although recent reports have shown the involvement of the ATP-binding cassette transporter A1 in cholesterol efflux, alternative pathways may be operating. We have previously characterized a family of phospholipid-binding proteins from bovine seminal plasma (BSP proteins) that stimulates cholesterol and phospholipid efflux from the sperm membrane, a process required for capacitation. BSP proteins also bind to gelatin, glycosaminoglycans and high-density lipoproteins. Furthermore, they are capable of stimulating lipid efflux from human fibroblasts. In view of these properties, BSP-like proteins could be involved in an alternative pathway for cellular cholesterol removal. To address this hypothesis, we have immunocytochemically examined bovine tissues using affinity-purified antibodies. Results indicate the presence of BSP-immunoreacting proteins in bovine lung, intestine, heart, kidney and liver. Using affinity chromatography, we have isolated gelatin- and glycosaminoglycan-binding proteins from the above tissues. These proteins reacted with BSP-specific antibodies in western blot assays. BSP-immunoreacting proteins were also detected in bovine serum using gelatin-agarose affinity chromatography and western blotting. Tissue and serum BSPs were further purified by high performance liquid chromatography. Taken together, our results indicate that BSP proteins are ubiquitously distributed and may play a role in reverse cholesterol transport.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the leading cause of mortality in most industrialised countries. It is a progressive disease characterized by the formation of lesions that cause a thickening of the arterial wall, leading to vessel obstruction and ultimately to heart attacks. Many studies have shown that elevated levels of circulating HDL¹ predict a lower risk of developing atherosclerosis.

The biological process that promotes an elevation in HDL-cholesterol levels is reverse cholesterol transport (RCT). RCT is a process whereby extra-hepatic cholesterol is transported to the liver for elimination in bile acids (1,2). Cholesterol is first effluxed from the plasma membrane of peripheral cells and then accepted by lipoproteins such as HDL. Certain molecules, such as the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), have been shown to play a role in mediating this first efflux step in the RCT pathway, by transferring cholesterol from the plasma membrane to the lipoprotein acceptors. Alternatively, in some pathological conditions such as Tangier disease, which is characterized by very low levels of circulating HDL, the ABCA1 transporter is either absent or non-functional (3-6). However, there remains a significant basal level of cholesterol efflux even in the absence of ABCA1. Studies have demonstrated that efflux to HDL is decreased only by half in the absence of ABCA1 (7-9). Moreover, patients suffering from Tangier disease do not develop cardiovascular conditions to an extent that would be expected if the RCT pathway was completely inhibited (10,11). In fact, a study showed that only half the Tangier disease cases over 35 years of age were found to develop cardiovascular disease (11). This brings forth the possibility that alternative, non-ABCA1-dependent efflux

mechanisms could also be operating, and that these alternate pathways could at least partially compensate for the absence of ABCA1 in Tangier disease.

We have previously characterized a family of phospholipid binding proteins from bovine seminal plasma (BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30kDa). They are a family of four acidic proteins that constitute approximately 60% of total bovine seminal plasma proteins. BSP-A1 and -A2 differ only in their degree of glycosylation and are therefore considered as one chemical entity. These two proteins together are also called PDC-109 (12). With the exception of BSP-A3, all members of the BSP family are glycoproteins. The biochemical properties and structure of these proteins has been thoroughly characterized (13-16). BSP-A1, -A2 and -A3 have molecular masses of 15-16 kDa whereas BSP-30kDa has a molecular mass of 28-30 kDa. Each BSP protein contains two homologous type II domains similar to those found in the gelatin-binding domains of fibronectin (17,18) and an amino-terminal extension that is variable between each protein. In contrast to other lipid acceptors such as apoA-I, BSP proteins do not contain amphipathic helices but are rather mostly composed of β -sheet structures (19).

BSP proteins are secreted by the seminal vesicle epithelial cells and have been shown to play a crucial role in sperm capacitation; a post-testicular maturation event (20-22). They bind to the sperm membrane via choline phospholipids (23), an interaction that is made possible by the two type II domains (24). At the sperm membrane, they mediate significant cholesterol and phospholipid efflux that ultimately leads to capacitation (21) (22). The type II domains are also responsible for the binding of these proteins to glycosaminoglycans (GAGs) (25,26), collagen and

its denatured counterpart, gelatin (13). BSP proteins can also bind to HDL via the apoA-I moiety (27), as well as to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk used in sperm cryopreservation (28).

Our previous studies have shown that all of the seminal plasma BSP proteins are capable of stimulating cholesterol and choline phospholipid efflux from normal human skin fibroblasts (29). The lipid efflux particles thus generated were shown to contain BSP proteins, cholesterol and choline phospholipids and to have a density in the range of high-density lipoproteins (30). The mechanism of lipid efflux by BSP proteins is unidirectional and apparently quite different from the efflux mediated by apoA-I (31).

The first step of RCT and the process of BSP-mediated sperm capacitation are seemingly very similar events. Both processes are dependent on cholesterol and phospholipid efflux to HDL particles. The only difference resides in the protein that mediates the lipid efflux. Until now, ABCA1 has been considered to be the only mediator of lipid efflux from peripheral cells in RCT. In view of the details presented above, we believe that the BSP family of proteins may comprise a novel group of lipid efflux stimulators during the first step of reverse cholesterol transport. Previous studies have detected BSP cross-reacting proteins in tissue extracts and biological fluids such as serum (15). BSP proteins are widely distributed and are potent stimulators of lipid efflux from sperm and fibroblasts; therefore they represent interesting candidate proteins for an alternative RCT pathway.

In this study, we have localized BSP proteins in numerous bovine tissues as well as detected them in bovine serum. Using immunocytochemistry and western

blotting, these proteins have been detected in bovine lung, intestine, kidney, heart and liver. They were also isolated from bovine tissues and serum using affinity chromatography and purified by high performance liquid chromatography.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials- Bouin's fixative was purchased from Lab Chem Inc. Bovine serum albumin (fraction V), goat anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate (immunocytochemistry) and leupeptin were purchased from Sigma. Diaminobenzidine was from BioFX laboratories. The Vectastain Universal ABC kit was from Vector Laboratories. *p*-methyl sulphonyl fluoride was from ICN biomedical. Goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (western blotting) and Affi-Gel 15, electrophoresis reagents were from Bio-Rad. The Western Lightning Chemiluminescence reagent plus was purchased from Perkin-Elmer. The PVDF and YM-3 ultrafiltration membranes were from Millipore. All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Immunocytochemistry- Tissue sections were collected from freshly killed animals at a local slaughterhouse, immersed in Bouin's fixative for 24 h, dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. 5 μ m sections were cut and mounted onto microscope slides. Sections were deparaffinized with xylene and hydrated in graded ethanol solutions (from 100% to 50%). Residual picric acid was neutralized in 70% ethanol containing 1% lithium carbonate. Endogenous peroxidase activity was inactivated in 70% ethanol containing 1% (vol/vol) H₂O₂. Sections were then incubated in a 300 mM glycine solution to block free aldehyde groups. Lung, intestine and kidney tissues were blocked with 100 μ l of 5% BSA in TBS (20 mM Tris-HCl-saline containing 0.1% BSA) for 30 minutes at 37°C. Slides were incubated for 2 h at 37°C with the primary antibody diluted in TBS (lung, 1:250; intestine, 1:250; kidney, 1:500). After washing in TBS containing 0.1% Tween-20),

slides were blocked with 5% BSA for 30 minutes at 37°C, then incubated with secondary antibody (goat anti-rabbit IgG) (1:250 in TBS) for 30 minutes at 37°C. The final reaction product was achieved by incubation with a diaminobenzidine solution, after which the sections were counterstained with methylene blue, dehydrated in ethanol, permeated with xylene and mounted with coverslips using Permount.

For heart and liver, the Vectastain Universal ABC kit was used. Slides underwent the same treatments described above until the blocking step. Treatments were then carried out according to manufacturer's instructions. Primary antibody dilutions were 1:750 for both heart and liver. Staining was achieved as described above.

Isolation of proteins from bovine tissues (1st method)- Bovine tissues were obtained from freshly killed animals at a local slaughterhouse and immediately frozen. Approximately 20 g of tissue was used for each experiment. Tissue was homogenized in 5 times the volume of homogenization buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 5 mM benzamidine hydrochloride, 10 µM leupeptin, 100 µM *p*-methyl sulphonyl fluoride) using an Ultra-Turrax homogenizer. Homogenate was centrifuged at 10 000 x *g* for 30 minutes (4°C). A cloudy top layer was removed with a pasteur pipet and stored for further analysis. Supernatant was ultracentrifuged at 100 000 x *g* for 3 hours (4°C), whereas pellet was incubated with a solution of 150 mM choline and 7 M urea in homogenization buffer for 2 h at 4°C. After incubation, the pellet fraction was centrifuged at 10 000 x *g* for 30 minutes (4°C). The pellet obtained after ultracentrifugation of the first supernatant was also incubated with the

choline-urea solution under the same conditions. After incubation, the solution was centrifuged at 10 000 x g for 30 minutes (4°C). Supernatants and top layers were dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. Lyophilized material was delipidated using the chloroform-methanol procedure (32), and delipidated material was then resuspended in 50 mM phosphate buffered saline (PBS) containing 7 M urea and dialyzed against 50 mM phosphate buffer (PB).

Isolation of proteins from bovine tissues (2nd method)- Approximately 30 g of tissue was used for each experiment. Tissue was homogenized as described in the first method. Homogenate was centrifuged at 10 000 x g for 30 minutes (4°C). A cloudy top layer was removed with a pasteur pipet and stored for further analysis. Supernatant was ultracentrifuged at 100 000 x g for 1 hour (4°C). After ultracentrifugation, supernatant was cleared of all particles and immediately loaded onto a heparan sulfate- or chondroitin sulfate B-agarose column.

Bovine serum ultracentrifugation- Bovine blood was collected from a local slaughterhouse, transported to the lab within one hour and left to clot at 4°C for 4 to 5 hours. Serum was separated from the clot, centrifuged at 10 000 x g for 10 minutes and frozen at -80°C. For analysis, serum was thawed and brought to room temperature after which the refractive index was measured and serum density calculated. Density was increased to 1.25 with potassium bromide and serum was ultracentrifuged at 60 000 rpm for 16 h (20°C). The top lipoprotein-rich and bottom lipoprotein-depleted layers obtained after ultracentrifugation were separated and extensively dialyzed against 50 mM PB before loading onto a heparan sulfate-agarose column.

Gelatin-agarose affinity chromatography

Bovine tissue samples- Gelatin was previously coupled to Affi-Gel 15 as described earlier (13). All purification steps were conducted at 4°C. Protein samples, which were dialyzed against 50 mM PB, were loaded onto a gelatin-agarose column that had been previously equilibrated with the same buffer. Sample was recycled onto the column (3 times) before fractions were collected at a flow rate of 30 ml/hour. Unadsorbed proteins were washed with PB and bound proteins were eluted with a solution of 7 M urea in PBS. Protein-containing fractions were collected, pooled and dialyzed against ammonium bicarbonate.

Bovine Serum- Bull and cow blood were obtained from a local slaughterhouse and serum was separated as described above. 100 ml was thawed, centrifuged at 10 000 x g for 10 minutes then diluted with 200 ml milli-Q water. Diluted serum was loaded onto a gelatin-agarose affinity column that had been previously equilibrated with 50 mM PB at 4°C. Loading was performed overnight at a flow rate of 15 ml/h, and flow rate was increased to 30 ml/h during washing and elution. Unbound proteins were washed with PB whereas bound proteins were eluted successively with PBS followed by PBS containing 7 M urea and 100 mM choline. Five ml fractions were collected and protein-containing fractions were pooled. Pooled fractions were then concentrated to a volume inferior to 5 ml by ultrafiltration. The protein content of each concentrated fraction was estimated and a volume equivalent to one mg protein was analyzed by HPLC.

Coupling GAGs to agarose- 10 ml of Affi-Gel 15 was transferred to a Buchner funnel and washed with 3 volumes cold isopropanol (-20°C). The gel was

then washed with 3 volumes of cold distilled water (4°C) and with 1 volume of cold MES buffer (0.1 M MES, pH 6.7). The moist gel cake was then transferred to a 50 ml Falcon centrifuge tube and 10 ml of a heparan sulfate solution (1 mg/ml in MES buffer) was added. The tube was kept on an end-over-end shaker for 1 hour at room temperature. Remaining reactive esters were blocked with 1 M ethanolamine-HCl (pH 8.0; 0.1 ml/ml gel) by shaking overnight at 4°C. Gel was then transferred to a small column and washed successively with 5 bed volumes of distilled water, 50 mM PB and PBS 7 M urea. Column was equilibrated with PB before use. Coupling efficiency was over 95% (equivalent to approximately 1 mg GAG bound per ml of gel).

Heparan sulfate chromatography- All purification steps were performed at 4°C. Tissue homogenates obtained with the second isolation method or serum samples were loaded onto the column previously equilibrated with 50 mM PB. Loading was performed overnight at a flow rate of approximately 7 ml/h whereas flow was increased to 30 ml/h for elution. Unadsorbed proteins were washed with PB and bound proteins were eluted successively either with 5 M NaCl in PBS and 7 M urea in PBS (tissues) or with the same buffers but with an added step of 100 mM choline before 7 M urea (serum). Protein-containing fractions were collected, pooled and dialyzed against ammonium bicarbonate.

rp-HPLC- After affinity chromatography, proteins were further purified by rp-HPLC using a Vydac C₁₈ column (250 X 4.6 mm, 5 μm, 300 Å; Mandel Scientific) or a Jupiter 5u C₁₈ column (250 X 4.6 mm, 5 μm, 300 Å, Phenomenex) connected to a Beckman-Coulter Gold system (Beckman). This system uses a 168 detector equipped

with a deuterium lamp as well as 32 Karat analysis software and an external injector from Rheodyne. The buffer system used was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A) and 0.1% TFA in acetonitrile (solvent B). Two elution gradients were used depending on the experiment. The first was a 5 minute isocratic elution at 25% B followed by an increase from 25 to 65% B over 120 minutes. The second was the same except the increase of buffer B from 25 to 65% was done in 60 minutes. The flow rate was constant at 1 ml/min. Eluting proteins were monitored at 235 nm, collected in 1 ml fractions and dried under vacuum (Speedvac).

Analytical methods- SDS-PAGE in 15% gels was performed according to Laemmli (33) using the Mini Protean 3 apparatus from Bio-Rad. Protein was determined using the modified Lowry procedure (34). Tissue or serum proteins were reduced and denatured prior to electrophoretic separation. Gels were transferred electrophoretically to Immobilon-P PVDF membranes as described by Towbin et al. (35). Immunodetection was performed using affinity-purified antibodies against BSP proteins and by using a chemiluminescence reagent.

RESULTS

Immunocytochemical localization of BSP proteins in bovine tissues- In order to demonstrate the presence of BSP or BSP-like proteins in peripheral tissues, we immunocytochemically examined several bovine tissues using the indirect peroxidase technique and the avidin-biotin complex method. Figure 1A shows staining of the bull seminal vesicle with anti-BSP-A1/-A2 polyclonal antibodies. Seminal vesicle was used as a positive control for staining. Immunoreaction can be seen in the seminal vesicle epithelial cells as well as in the luminal secretions. Results with peripheral tissues show the presence of BSP-A1/-A2 in bovine lung, intestine, heart, kidney and liver. An intense reaction was observed in the bronchioles of the lung (Fig. 1B), specifically along the apical and basolateral plasma membranes of ciliated columnar cells. In the intestine (Fig. 1C), strong reaction was observed in the smooth muscle cells of the tunica muscularis and in columnar epithelial cells. Figure 1D shows a granular staining in cardiac muscle cells. In the kidney (Fig. 1E), the reaction was cytoplasmic in the epithelial cells of most tubules, except collecting ducts where the staining was along plasma membranes. Finally, hepatocytes also showed a positive reaction (Fig. 1F). In all cases, the negative control used was omission of primary antibody (Fig. 1A-F).

Isolation of BSP proteins from bovine tissues- Following the positive results obtained with immunocytochemistry, BSP proteins were isolated from tissues as a means of confirmation. Tissue extracts were prepared by the two methods described in Experimental Procedures, then subjected to either gelatin-agarose affinity chromatography (1st method) or glycosaminoglycan-agarose affinity chromatography

(2nd method). Figure 2A shows the gelatin-agarose chromatography pattern for bull lung extracts prepared by the 1st method. Column was washed to remove unadsorbed proteins (fraction a) and adsorbed proteins were eluted with 7 M urea (fraction b). A positive control containing crude bovine seminal plasma proteins (cBSP), starting material, unadsorbed and urea-eluted proteins were analyzed by western blotting with anti-BSP antibodies (Fig. 2B). Western blots revealed the presence of BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30kDa in the urea-eluted fractions. Reversed-phase HPLC was employed to further purify the isolated proteins. The urea-eluted proteins obtained after gelatin-agarose affinity chromatography of lung extracts were separated on a C₁₈ analytical column using a gradient of 25-65% acetonitrile (Fig. 2C). After subjecting each peak to western blotting (Fig. 2D), BSP cross-reacting proteins were detected in peaks VI and VII, which eluted with approximately 37% solvent B.

Our recent studies have demonstrated that BSP proteins have a very strong affinity for follicular fluid GAGs such as heparan sulfate and chondroitin sulfate B (26). In an effort to develop the best method for retrieving BSP proteins from tissue extracts, we coupled GAGs to agarose for our second method of isolation. Figure 3A is a representative GAG-agarose chromatography pattern for bovine tissue extracts (lung, intestine, heart, kidney and liver). The pattern shown is for lung extracts, but very similar patterns were observed for each of the other tissues. Fraction a corresponds to unbound proteins, whereas fractions b and c correspond to 5 M NaCl-eluted and 7 M urea-eluted proteins, respectively. Once again, each fraction was analyzed by western blotting, along with starting material (sm) and the cBSP control (Fig. 3B). BSP cross-reacting proteins were indeed detected in the above-mentioned

tissues. BSP-A1/-A2 antibody cross-reacted with four proteins of apparent molecular masses 15 kDa, 28 kDa, 35 kDa and 45 kDa. The former two proteins have molecular weights similar to BSP proteins, whereas the latter two are larger than BSPs. With anti-BSP-30kDa antibodies, the major bands observed were the low molecular weight forms. BSPs were further purified by HPLC using the same gradient described above. After HPLC separation, each peak was subjected to western blotting (Fig. 3D) and four BSP cross-reacting proteins (15 kDa, 28 kDa, 35 kDa and 45 kDa) were detected in peak V, eluted with approximately 37% solvent B.

Isolation of BSPs from bovine serum- If BSP proteins are indeed involved in lipid transport, they should also be present in serum. We therefore proceeded with the isolation of BSP proteins from both bull and cow serum, though the results presented are those obtained for cow serum. The first technique employed was ultracentrifugation in order to float the lipoproteins. The density of the serum was increased with potassium bromide, and then it was ultracentrifuged giving rise to a lipoprotein-rich fraction (top) and a lipoprotein-depleted fraction (bottom). Both fractions were subjected to GAG-agarose affinity chromatography. Figure 4A depicts the GAG-agarose pattern for the lipoprotein layer. Fraction a contains unbound proteins that were washed from the column with PB, and fractions b, c and d correspond to 5 M NaCl-eluted, 100 mM choline-eluted and 7 M urea-eluted proteins respectively. The cBSP control as well as proteins from peak a to d were analyzed in western blots using anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies (Fig. 4B). The results revealed the presence of BSP cross-reacting proteins in choline and urea-eluted peaks, the quantity being higher in the urea-eluted fraction. The lipoprotein-

depleted layer was also passed through the GAG-agarose column and eluted in the same manner (Fig. 4C). Once again, cBSP proteins along with proteins from each peak were subjected to western blotting with anti-BSP antibodies. The results show that BSP cross-reacting proteins are present in column peaks c and d, the highest amount being in the choline-eluted peak (Fig. 4D). These choline-eluted proteins from the lipoprotein-depleted layer were further purified by HPLC (Fig. 4E) and the peaks obtained were analyzed in western blots with anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies (Fig. 4F). BSP cross-reacting proteins were detected in HPLC peak V and faintly in peak VI, eluted between 35 and 37% solvent B.

With the aim of developing an optimal method for isolating BSP proteins from serum, a second isolation technique was also employed. After diluting with water, serum was loaded onto a gelatin-agarose affinity column. Figure 5A depicts the chromatography pattern, in which fractions a and b correspond to unadsorbed proteins eluted with PB, fractions c and d are proteins eluted with PBS and fractions e and f are urea/choline-eluted proteins. Peaks b to f were pooled separately and concentrated with an ultrafiltration membrane before HPLC purification. HPLC peaks for each of the fractions (b to f) were analyzed by western blots using a mixture of anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies. Results showed the presence of BSP proteins in gelatin-agarose peaks c, e and f, the strongest immunoreaction being in peaks c and f. Once again, BSP proteins eluted from the HPLC column between 35 and 40% solvent B.

DISCUSSION

BSP proteins (BSP-A1/-A2, -A3 and -30kDa) represent the major proteins of bovine seminal plasma. They play a crucial role in bovine sperm capacitation where they bind to the sperm membrane via their interaction with phosphatidylcholine and stimulate the release of cholesterol and phospholipid from the sperm membrane. This process is comparable to the lipid efflux observed in the first step of reverse cholesterol transport. In order to study the possible involvement of BSP proteins in the RCT process, it was necessary to first demonstrate the presence of these proteins in peripheral tissues as well as in serum. The current work was therefore aimed at revealing the ubiquitous distribution of BSP proteins as well as developing an efficient means of isolating these proteins from bovine tissues and serum.

Using immunocytochemistry, BSP-A1/-A2 protein was detected in bovine lung, intestine, heart, kidney and liver (Fig. 1). Similar results were also obtained with anti-BSP-A3 and -30kDa antibodies (data not shown) albeit with lower intensity. BSP-A3 and -30kDa may be present in lower concentrations than BSP-A1/-A2, or antigen retrieval techniques could be necessary for their detection. The staining pattern observed was localized to specific cell types in the case of seminal vesicle, lung, intestine and kidney, whereas liver and heart tissues seemed to exhibit a more diffuse stain. For seminal vesicle, lung, intestine and kidney, the major immunoreaction was seen in epithelial cells, which was expected seeing as how BSP proteins are secreted (15). In the case of the liver and the heart one might assume that the observed staining is due to non-specific reaction of the secondary antibody, although this is unlikely considering that the negative controls did not stain at all.

Furthermore, a study conducted by Wellington *et al.*, displayed very similar protein and mRNA localization for ABCA1 (36). In this study, ABCA1 protein was localized to the intestinal lining epithelia, epithelium of small bronchioles in the lung, cardiomyocytes in the heart, epithelia of proximal and distal convoluted tubules as well as collecting ducts in the kidney and in liver hepatocytes. Similar to our findings with BSPs (data not shown), kidney glomeruli appeared negative for ABCA1. Seeing as how ABCA1 was also detected in the brain, adipose tissue, testes and adrenal gland, it would be interesting to verify if BSP proteins are expressed there as well.

BSP protein isolation from tissues (Fig. 2-3) confirms the immunocytochemistry results and eliminates the possibility that the observed immunocytochemical reaction could be non-specific. The isolation of tissue BSPs using gelatin- and glycosaminoglycan-agarose affinity columns indicates that these proteins share similar binding properties with seminal plasma BSPs. Since BSP proteins have the ability to bind gelatin and GAGs because of their two fibronectin type II domains (17,18), we can deduce that the isolated proteins almost certainly contain tandem type II domains. Using GAG-affinity chromatography, two high molecular weight forms of BSPs (35 and 45 kDa) were detected with the anti-BSP-A1/-A2 antibodies (Fig. 3). These proteins could represent precursor forms of BSP proteins or simply larger isoforms, which may be susceptible to proteolytic degradation. The 2nd isolation method allowed for much less time between tissue homogenisation, chromatographic separation and western blotting, thus greatly reducing exposure to proteases. It is also possible that the multiple bands observed correspond to differing degrees of BSP glycosylation. In the case of anti-BSP-30kDa,

the two lower bands were predominant. The polyclonal anti-BSP antibodies have been shown to be specific (37), therefore the lowest band probably corresponds to a 14 kDa proteolytic fragment of BSP-30kDa, whereas the 28 kDa band would be BSP-30kDa. On the other hand, a new 14 kDa BSP-like protein was recently reported (38) and may correspond to the low molecular weight immunoreactive band. Given the low intensity of the 35 and 45 kDa bands, it is possible that the larger forms observed with anti-BSP-A1/-A2 are precursors of BSP-A1/-A2 but not of BSP-30kDa.

After efflux from cells to lipoprotein acceptors, cholesterol is transported through the bloodstream in order to reach the liver where specific uptake takes place. Consequently, BSP proteins would be expected to be present in serum given their postulated role in RCT. As anticipated, BSPs were in fact detected in bull and cow serum (Fig. 4-5). The results for female serum were presented because the identification of BSPs in female serum is of greater significance, due to the impossibility of seminal vesicle origin. Although there is a blood barrier between the peripheral circulation and the male reproductive tract (39), one might suspect leakage of proteins produced by the seminal vesicles into the general circulation.

In the first method employed, serum lipoproteins were floated using ultracentrifugation. Owing to the known interaction of BSPs with apoA-I and HDL, it was expected that they would be found in the lipoprotein-rich layer. Indeed, after GAG-agarose chromatography of the lipoprotein fraction, BSP proteins were detected in the urea-eluted peak and to a lesser extent in the choline-eluted peak (Fig. 4B). This was surprising since choline is a specific ligand of BSP proteins (23). It is possible that the choline concentration was not high enough to displace all the BSP

proteins from the column, especially in the presence of lipoproteins that could also be interacting with our proteins. Urea, on the other hand, elutes in a non-specific manner, therefore removed all bound proteins from the column. Alternatively, the BSP proteins detected in serum may be different in structure and/or in carbohydrate composition from the seminal plasma BSP proteins. This would imply differences in binding properties and could affect affinity towards gelatin and choline.

Another unanticipated result was the detection of BSPs in the lipoprotein-depleted serum fraction. After GAG-agarose affinity chromatography, BSP cross-reacting proteins were detected in choline and urea-eluted peaks (Fig. 4D). In this case, the highest amount of BSPs was detected in the choline-eluted fraction. This may be due to the absence of lipoproteins, allowing for the specific elution of the BSPs with choline. As for the rationalization of the presence of BSP proteins in the lipoprotein-depleted fraction, it is likely that their strong interaction with GAGs can be held accountable. GAGs remain in the lipoprotein-depleted layer after serum ultracentrifugation and therefore, BSPs could be retained in this layer as well.

The second method used for the isolation of BSP proteins from bovine serum was gelatin-agarose affinity chromatography, followed by HPLC purification. Using this method, BSP cross-reacting proteins were detected in the PBS and urea/choline peaks (Fig. 5C, fractions c, e and f). It is possible that the interaction of BSPs with serum lipoproteins somewhat weakens the force of their binding to the column, therefore allowing a portion of the BSPs to be detached by a weak eluting agent like PBS. On the other hand, the free BSP proteins would have bound to the column more firmly and would only have been removed with a strong agent such as the

urea/choline combination. Once again, there is the possibility of BSP isoforms and glycoforms that could have altered affinities for ligands. It also seems that most of the BSP proteins were eluted after many volumes of the urea/choline buffer. They eluted mostly in fraction f, which corresponds to the trailing end of the urea/choline peak. This may be due to a very strong interaction of these proteins to the column, requiring a large quantity of eluent for removal. The bands seen in the western blots for fractions b and d most probably correspond to non-specific reaction given the high quantity of protein seen on the membrane after staining (not shown).

BSP proteins are known to interact with several molecules such as GAGs, lipoproteins, phospholipids, fibrinogen (15) and collagen; thus rendering their isolation and purification quite complex. It is difficult to develop a simplified method, which is why we explored two different methods for the isolation of these proteins from both tissues and serum. Interestingly, the use of a second technique for tissues allowed us to discover two higher molecular weight BSP cross-reacting proteins. In the case of serum, the second method employed gave rise to a higher amount of protein and was much less time-consuming. Our long-term objectives are to characterize the tissue and serum BSPs and to elucidate their role in RCT; therefore the development of a rapid and efficient purification strategy is important.

The choice of animal model may seem somewhat uncommon and unusual, but many reasons justify our choice. First, BSP proteins were originally discovered in bovine seminal plasma and their characteristics have been extensively studied and documented in this species. Second, the only antibodies available against the BSP family of proteins are those directed against the bovine proteins. Finally, sufficient

evidence is lacking as of yet for the presence of tissue and serum BSP-homologs in frequently used animal models such as mouse and rat. It will, however, be necessary to employ a mouse model in the future to study how deleting or overexpressing BSPs affects lipid metabolism.

Based on the known interaction of BSP proteins with: the cell surface via choline phospholipids, lipoproteins and apolipoproteins, collagen, fibrinogen and GAGs; we postulate that they could be mainly localized in the extracellular matrix (ECM). They would therefore be present at or near the cell surface, in ECM, and could interact with the plasma membrane in response to unknown signals in order to mediate the removal of cellular phospholipid and cholesterol. Lipid could then be accepted by HDL, or by BSP proteins themselves. This last hypothesis arises from the observation that in the absence of lipoprotein/apolipoprotein acceptors, BSP proteins are capable of stimulating phospholipid and cholesterol efflux from sperm cells (21,22) as well as from fibroblasts (29), suggesting that they may be serving as lipid acceptors. The efflux particles obtained when sperm or fibroblasts are incubated with BSP proteins are homogeneous with a density comparable to that of HDL, and contain cholesterol, choline phospholipids and BSP proteins (21,30). It was also shown that BSP-mediated efflux from fibroblasts is not inhibited at low temperatures (31). It is therefore unlikely that the binding of BSP proteins to the cell membrane would induce intracellular cholesterol mobilization, a process that is abolished under 22°C (40). After accepting cholesterol and phospholipid, BSPs could then transfer lipid to HDL particles that would go through the known RCT pathway, or they could transport lipids through the bloodstream themselves. Given the low concentration of

BSP proteins in serum and tissues, it is probable that a recycling mechanism exists within the ECM.

The detection of BSP proteins in serum brings forth an interesting debate regarding the use of serum in cell media during lipid efflux studies. The presence of a cholesterol acceptor such as BSP proteins in serum could potentially influence the results of such studies. It would be interesting to see if cholesterol efflux studies from fibroblasts as well as other cells would give rise to different results if cells were grown in BSP-depleted serum.

This is not the first time that a protein involved in sperm maturation has been postulated to play a role in reverse cholesterol transport. Apolipoprotein J, also known as Clusterin, is a multifunctional glycoprotein which is thought to be involved in sperm maturation (41-43), regulation of complement function (44-46) as well as lipid transport (44,47,48). It is therefore seemingly quite possible for the same protein to play different roles in distinct cell types and tissues.

In summary, we have shown, for the first time, that BSP proteins are present in peripheral tissues and in serum. We have also developed efficient methods for isolating these proteins from the mentioned sources. Work still remains to be done in order to elucidate the functions carried out by BSP proteins in tissues and serum. It is likely that these proteins could be involved in a multitude of processes requiring lipid efflux, including reverse cholesterol transport. There apparently exist lipid efflux mediators or carriers that function independently from ABCA1 and that could be part of the cause underlying defects in lipid metabolism. It is of therapeutic interest to

investigate these alternate mechanisms of cholesterol removal in order to better diagnose and treat these diseases.

REFERENCES

1. Glomset, J. A. (1968) *J Lipid Res* **9**, 155-167
2. Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (1991) in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (D.E. Vance ed.), pp.427-459, Elsevier, Amsterdam.
3. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Deneffe, P., and Assmann, G. (1999) *Nat Genet* **22**, 352-355
4. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., and Schmitz, G. (1999) *Nat Genet* **22**, 347-351
5. 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 et al. (1999) *Nat Genet* **22**, 336-345
6. 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) *J Clin Invest* **104**, R25-31
7. Remaley, A. T., Schumacher, U. K., Stonik, J. A., Farsi, B. D., Nazih, H., and Brewer, H. B., Jr. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1813-1821

8. Rogler, G., Trumbach, B., Klima, B., Lackner, K. J., and Schmitz, G. (1995) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 683-690
9. Mendez, A. J., and Uint, L. (1996) *J Lipid Res* **37**, 2510-2524
10. Schaefer, E. J., Zech, L. A., Schwartz, D. E., and Brewer, H. B., Jr. (1980) *Ann Intern Med* **93**, 261-266
11. Serfaty-Lacrosniere, C., Civeira, F., Lanzberg, A., Isaia, P., Berg, J., Janus, E. D., Smith, M. P., Jr., Pritchard, P. H., Frohlich, J., Lees, R. S., and et al. (1994) *Atherosclerosis* **107**, 85-98
12. Esch, F. S., Ling, N. C., Bohlen, P., Ying, S. Y., and Guillemin, R. (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **113**, 861-867
13. Manjunath, P., Sairam, M. R., and J., U. (1987) *Biosciences Reports* **7**, 231-238
14. Manjunath, P., and Sairam, M. R. (1987) *Biochem. J.* **241**, 685-692
15. Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y. L., Seidah, N. G., Chretien, M., and Chapdelaine, A. (1988) in *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic systems* (McKerns, K.W., and Chretien. M., eds.), pp. 259-273, Plenum, New York.
16. Desnoyers, L., Therien, I., and Manjunath, P. (1994) *Mol Reprod Dev* **37**, 425-435
17. Seidah, N. G., Manjunath, P., Rochemont, J., Sairam, M. R., and Chretien, M. (1987) *Biochem J* **243**, 195-203
18. Baker, M. E. (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **130**, 1010-1014
19. Constantine, K. L., Ramesh, V., Banyai, L., Trexler, M., Patthy, L., and Llinas, M. (1991) *Biochemistry* **30**, 1663-1672

20. Therien, I., Soubeyrand, S., and Manjunath, P. (1997) *Biol Reprod* **57**, 1080-1088
21. Therien, I., Moreau, R., and Manjunath, P. (1998) *Biol Reprod* **59**, 768-776.
22. Therien, I., Moreau, R., and Manjunath, P. (1999) *Biol Reprod* **61**, 590-598.
23. Desnoyers, L., and Manjunath, P. (1992) *J Biol Chem* **267**, 10149-10155
24. Moreau, R., Therien, I., Lazure, C., and Manjunath, P. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 148-154
25. Chandonnet, L., Roberts, K. D., Chapdelaine, A., and Manjunath, P. (1990) *Mol Reprod Dev* **26**, 313-318
26. Therien, I., Bergeron, A., Bousquet, D., and Manjunath, P. (2004) *Biol Reprod* *under revision.*
27. Manjunath, P., Marcel, Y. L., Uma, J., Seidah, N. G., Chretien, M., and Chapdelaine, A. (1989) *J Biol Chem* **264**, 16853-16857
28. Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., and Menard, M. (2002) *Biol Reprod* **67**, 1250-1258
29. Moreau, R., Frank, P. G., Perreault, C., Marcel, Y. L., and Manjunath, P. (1999) *Biochimica et biophysica acta* **1438**, 38-46
30. Moreau, R., and Manjunath, P. (1999) *Biochimica et biophysica acta* **1438**, 175-184
31. Moreau, R., and Manjunath, P. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1487**, 24-32
32. Mills, G., Lane, P., and Weech, P. (1984) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, (Burdon, RH., van Kippenberg, PH. eds.) pp. 470-471, Elsevier, Amsterdam.
33. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685

34. Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978) *Anal Biochem* **87**, 206-210
35. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992) *Biotechnology* **24**, 145-149
36. Wellington, C. L., Walker, E. K., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y. Z., Zhang, L. H., James, E., Wilson, J. E., Francone, O., McManus, B. M., and Hayden, M. R. (2002) *Lab Invest* **82**, 273-283
37. Nauc, V., and Manjunath, P. (2000) *Biol Reprod* **63**, 1058-1066
38. Liberda, J., Ryslava, H., Jelinkova, P., Jonakova, V., and Ticha, M. (2002) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **780**, 231-239
39. Setchell, B. P., and Brooks, D. E. (1988) in *The Physiology of Reproduction, 1st edition* (Knobil E, Neill J eds.), pp. 753-836, New York : Raven Press.
40. Mendez, A. J. (1997) *J Lipid Res* **38**, 1807-1821
41. Collard, M. W., and Griswold, M. D. (1987) *Biochemistry* **26**, 3297-3303
42. Sylvester, S. R., Morales, C., Oko, R., and Griswold, M. D. (1991) *Biol Reprod* **45**, 195-207
43. Atlas-White, M., Murphy, B. F., and Baker, H. W. (2000) *Pathology* **32**, 258-261
44. Jenne, D. E., and Tschopp, J. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7123-7127
45. Murphy, B. F., Kirszbaum, L., Walker, I. D., and d'Apice, A. J. (1988) *J Clin Invest* **81**, 1858-1864
46. Choi, N. H., Mazda, T., and Tomita, M. (1989) *Mol Immunol* **26**, 835-840
47. de Silva, H. V., Stuart, W. D., Park, Y. B., Mao, S. J., Gil, C. M., Wetterau, J. R., Busch, S. J., and Harmony, J. A. (1990) *J Biol Chem* **265**, 14292-14297

48. Jenne, D. E., Lowin, B., Peitsch, M. C., Bottcher, A., Schmitz, G., and Tschopp, J. (1991) *J Biol Chem* **266**, 11030-11036

FOOTNOTES

¹The abbreviations used are: HDL, high density lipoprotein(s); RCT, reverse cholesterol transport; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; BSP, bovine seminal plasma; apo, apolipoprotein; GAG; glycosaminoglycan; TBS, Tris-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; ABC, avidin-biotin complex; EDTA, ethylenediamine tetraacetate; PBS, phosphate-buffered saline; PB, phosphate buffer; MES, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; rp-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PVDF, polyvinylidene fluoride; cBSP, crude bovine seminal plasma proteins; ECM, extracellular matrix.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Immunocytochemical localization of BSP proteins in bovine tissues. Bovine seminal vesicle (A), lung (B), intestine (C), heart (D), kidney (E) and liver (F) sections were immunostained with affinity purified rabbit-anti-BSP-A1/-A2 antibodies (left) or with omission of primary antibody (right), followed by goat-anti-rabbit-horseradish peroxidase and the chromogenic substrate diaminobenzidine. The tissue sections were counterstained using methylene blue.

Fig. 2. Isolation and partial purification of BSP proteins from bovine lung using gelatin-agarose affinity chromatography. (A) Bovine lung extracts were passed through a gelatin-agarose affinity column previously equilibrated with 50 mM PB. After washing the column free of unadsorbed proteins (fraction a), the adsorbed proteins (fraction b) were eluted with 7 M urea. Fractions were collected at a flow rate of 30 ml/h and absorbance was monitored at 280 nm. (B) Crude bovine seminal plasma proteins (cBSP), starting material (sm) and gelatin-agarose fractions a and b were separated by SDS-PAGE on a 15% gel, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP antibodies. (C) Gelatin-agarose urea-eluted proteins (fraction b) were dissolved in 0.1% TFA in water and injected onto a Vydac C₁₈ HPLC column as described in Experimental Procedures, using the 120 minute gradient. (D) cBSP and proteins from HPLC peaks I to IX were separated by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP-A1/-A2 antibodies.

Fig. 3. Isolation and partial purification of BSP proteins from bovine lung using heparan-sulfate-agarose affinity chromatography. (A) Bovine lung extracts were passed through a heparan-sulfate-agarose affinity column previously

equilibrated with 50 mM PB. Column was washed free of unadsorbed proteins (fraction a), then adsorbed proteins were eluted successively with 5 M NaCl (fraction b) and 7 M urea (fraction c). Fractions were collected at a flow rate of 30 ml/h and absorbance was monitored at 280 nm. (B) cBSP, starting material (sm) and heparan-sulfate-agarose fractions a to c were separated by SDS-PAGE on a 15% gel, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies. (C) Urea-eluted proteins from the heparan-sulfate-agarose column (fraction c) were dissolved in 0.1% TFA in water and subjected to HPLC as described in Figure 2C. (D) cBSP and proteins from HPLC peaks I to V were separated by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP-A1/-A2 antibodies.

Fig. 4. Isolation of BSP proteins from bovine serum by ultracentrifugation and GAG-agarose affinity chromatography. (A) Bovine serum was separated into top bottom layers as described in Experimental Procedures. Top layer was loaded onto a heparan-sulfate-agarose column previously equilibrated with 50 mM PB. Column was washed with 50 mM PB (fraction a), then eluted successively with 5 M NaCl (fraction b), 100 mM choline (fraction c) and 7 M urea (fraction d). Fractions were collected at a flow rate of 30 ml/h and absorbance was monitored at 280 nm. (B) cBSP and heparan-sulfate-agarose fractions a to d were separated by SDS-PAGE on a 15% gel, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies. (C) Bottom layer was passed onto the heparan-sulfate-agarose column as described in (A). (D) cBSP, starting material (sm) and heparan-sulfate-agarose fractions a to d were separated by SDS-PAGE on a

15% gel, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies. (E) Bottom layer choline-eluted proteins (Fig. 4C-fraction c) were dissolved in 0.1% TFA in water, injected onto a Vydac C₁₈ HPLC column and eluted using the 60 minute gradient described in Experimental Procedures. (F) cBSP and proteins from HPLC peaks I to VII were separated by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies.

Fig.5. Isolation of BSP proteins from bovine serum using gelatin-agarose affinity chromatography. (A) Diluted bovine serum was loaded onto a gelatin-agarose column previously equilibrated with 50 mM PB. Column was washed with 50 mM PB (fractions a and b), and then eluted successively with 50 mM PBS (fractions c and d) and PBS containing 100 mM choline and 7 M urea (fractions e and f). Fractions were collected at a flow rate of 30 ml/h and absorbance was monitored at 280 nm. (B) Fractions b to f were concentrated and 1 mg of each was solubilized in a 6 M guanidine hydrochloride solution before loading onto a Phenomenex Jupiter 5u C₁₈ HPLC column. Elution was performed as in Figure 4E. C) After HPLC of fractions b to f, each HPLC peak along with cBSP proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P and probed with anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30kDa antibodies.

Fig. 1

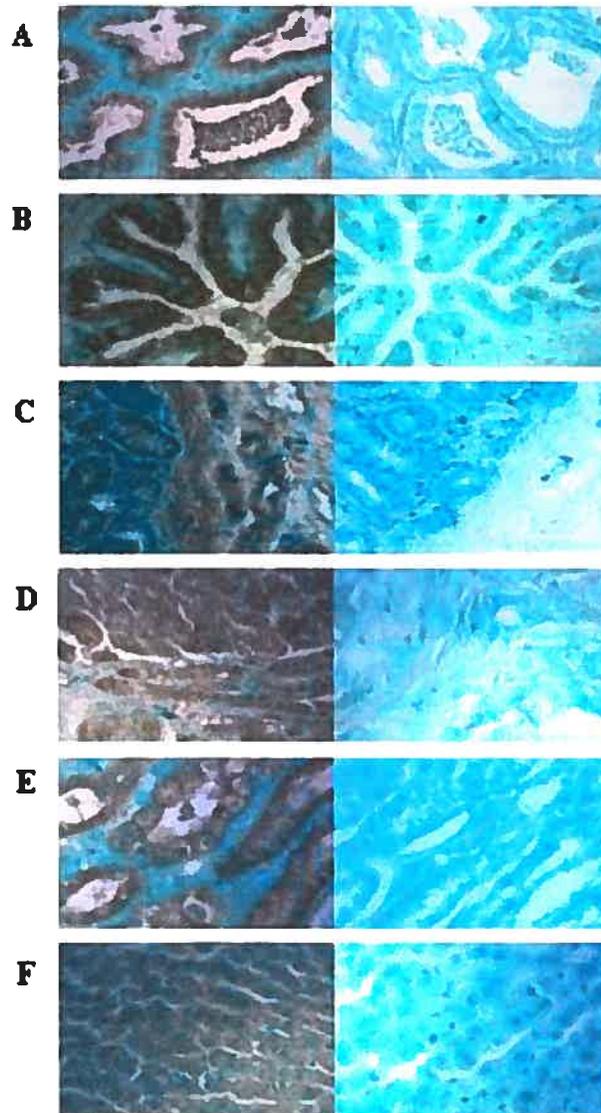


Fig.2

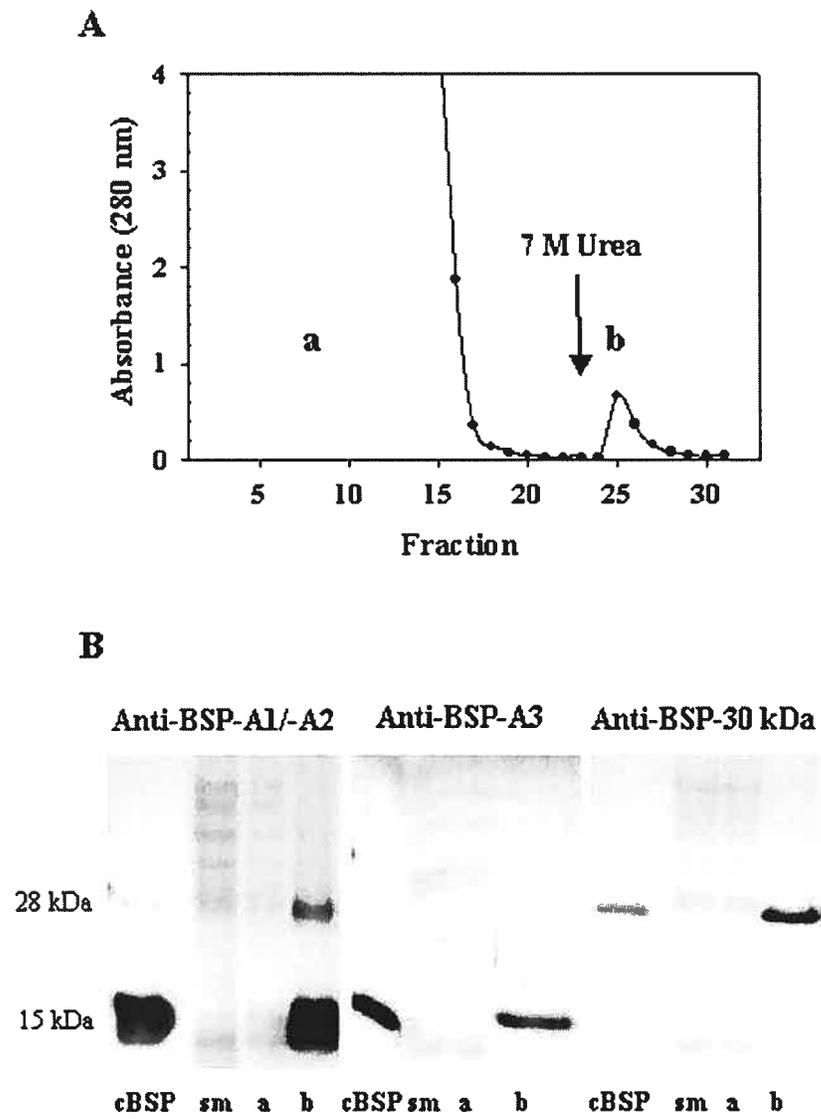


Fig. 2

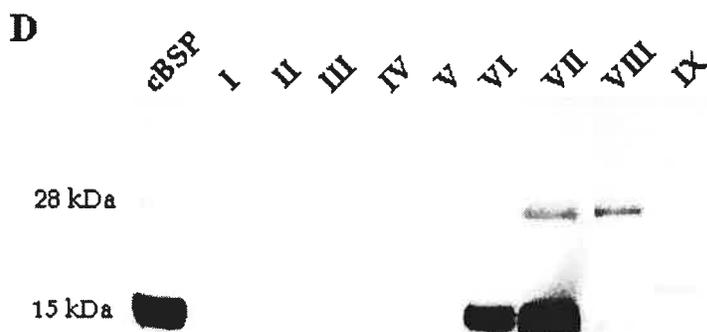
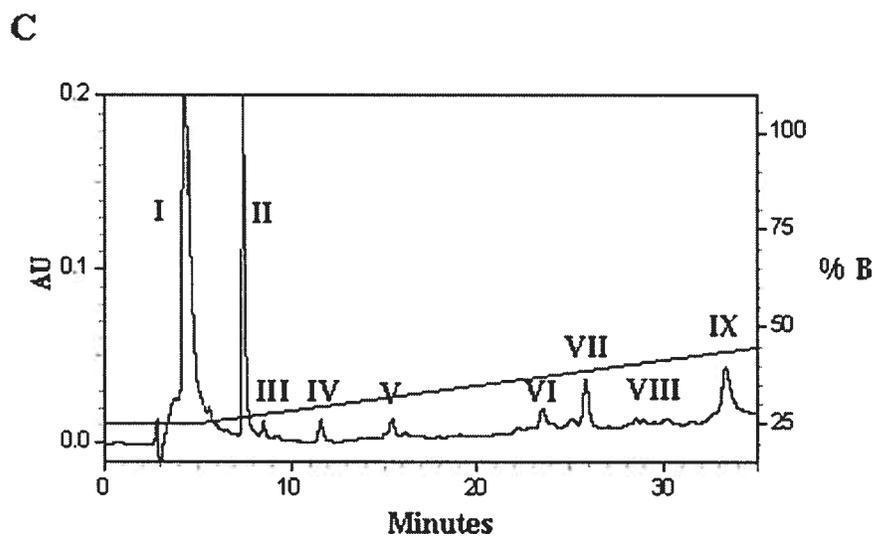
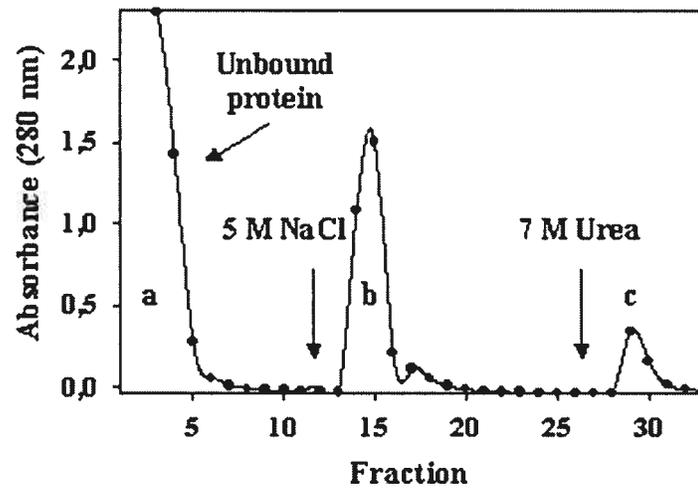


Fig.3

A



B

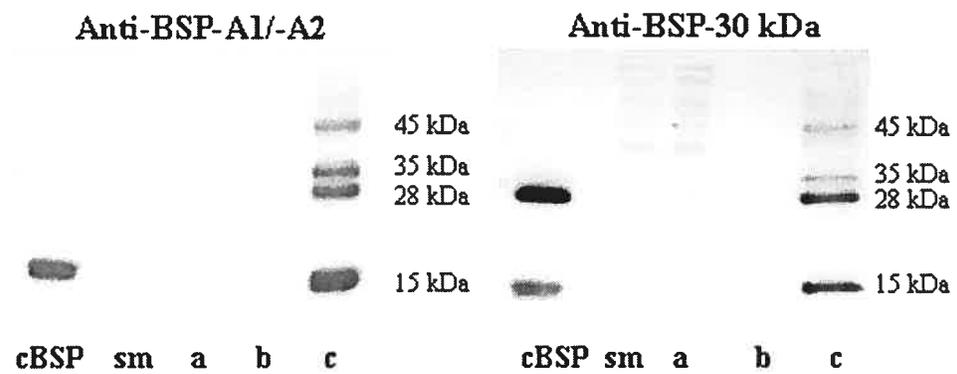


Fig. 3

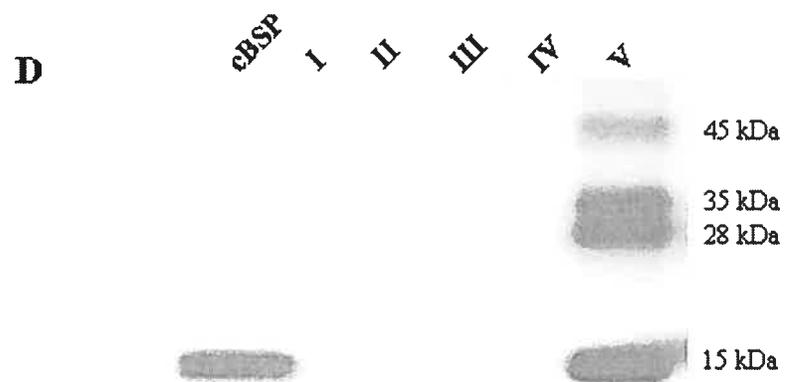
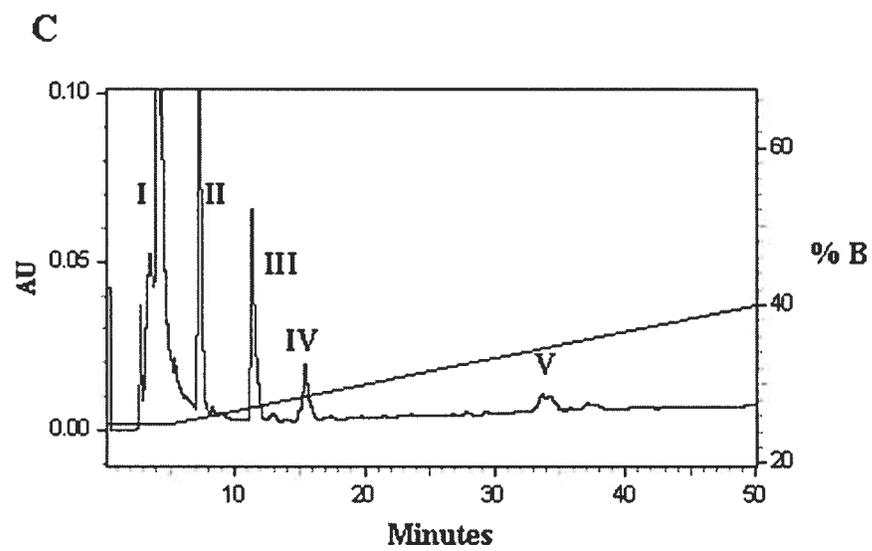


Fig. 4

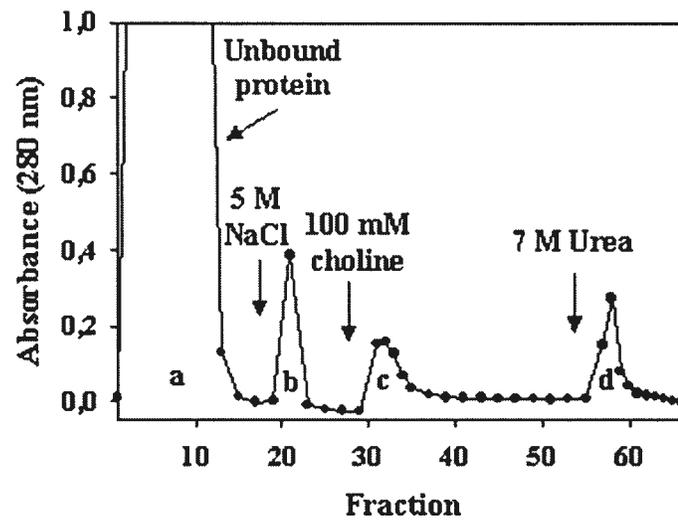
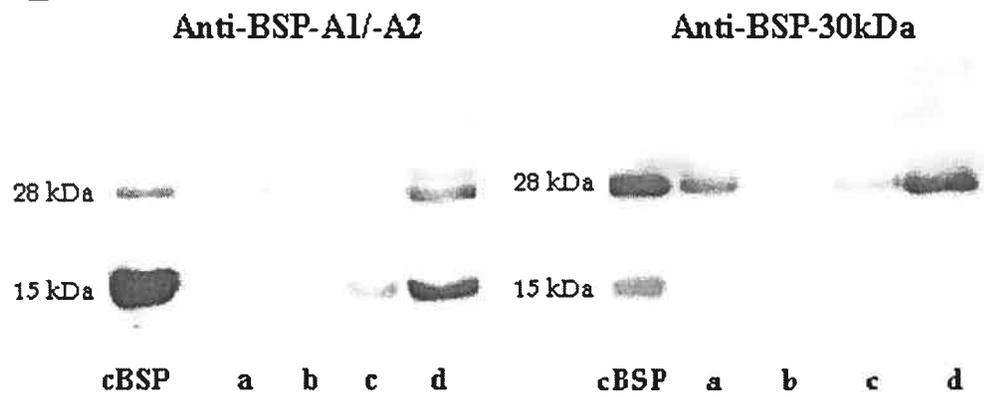
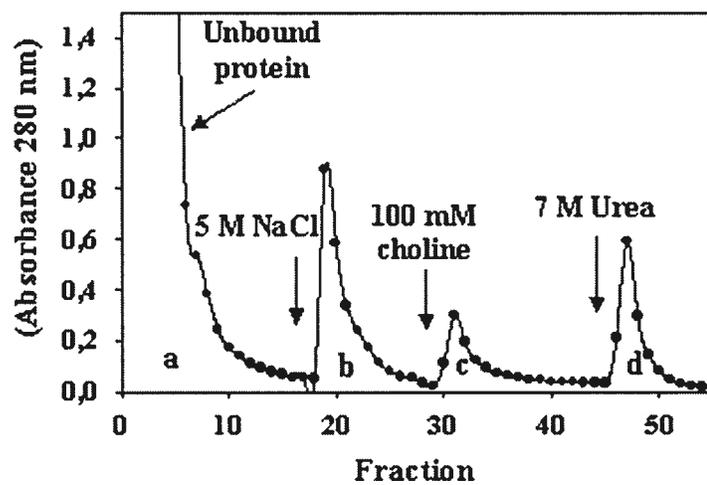
A**B**

Fig. 4

C



D

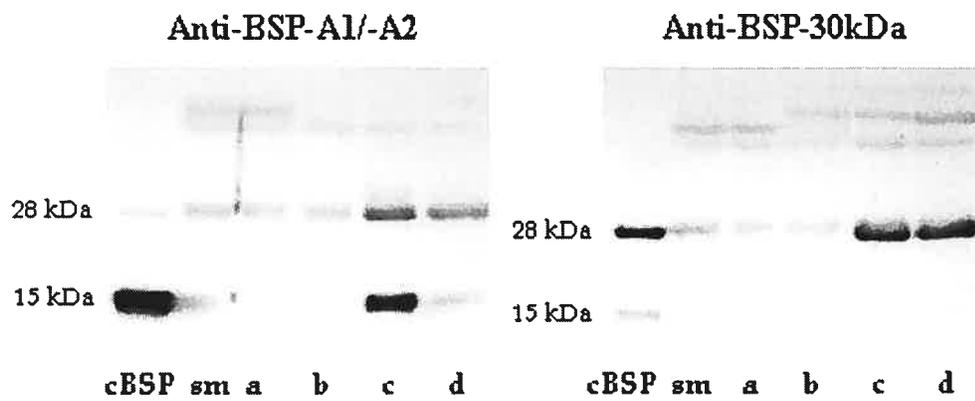


Fig. 4

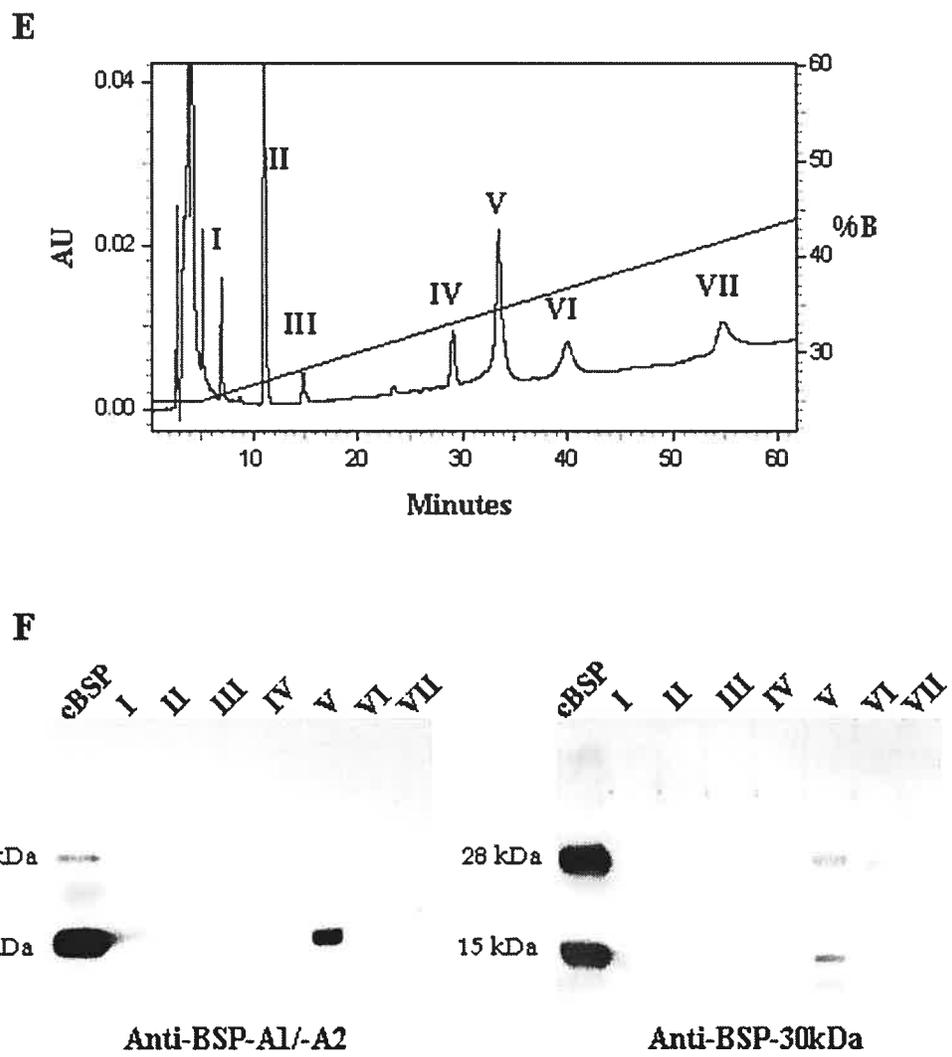


Fig. 5

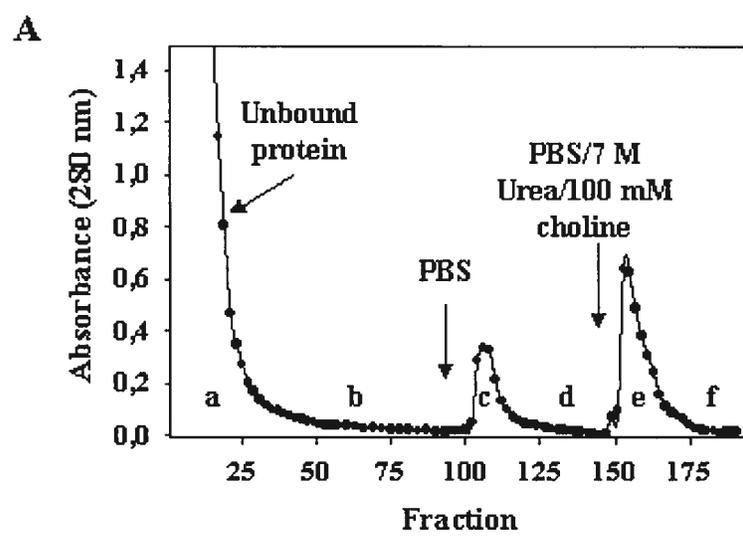
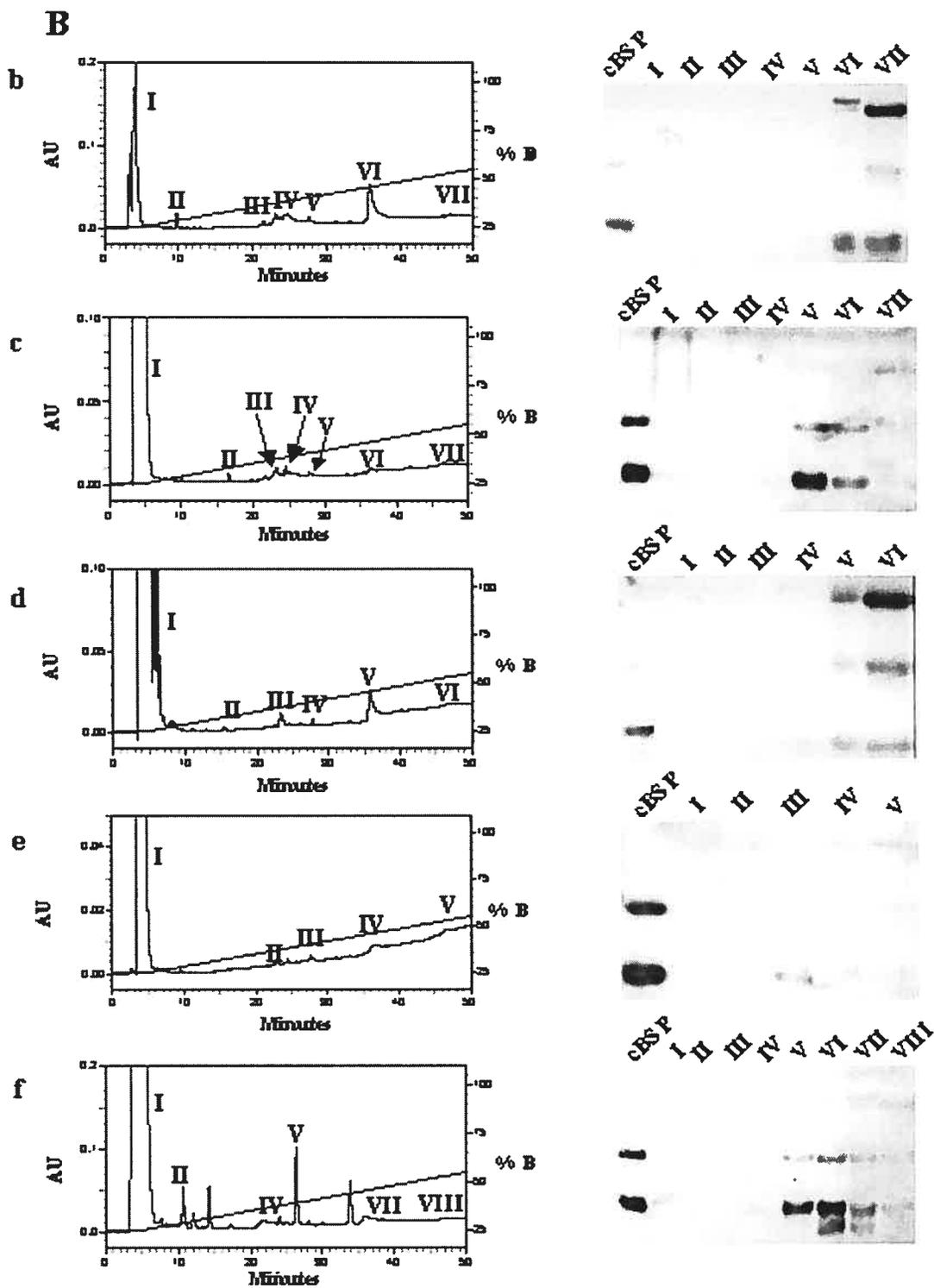


Fig. 5



3. Discussion

Malgré de nombreuses études, les mécanismes impliqués dans le RCT ne sont pas complètement élucidés. Plus particulièrement, l'étape limitante de ce processus, soit l'efflux de cholestérol cellulaire, est encore mal comprise. Au cours des dernières années, beaucoup d'attention a été portée sur le rôle du transporteur ABCA1 dans la régulation de l'efflux lipidique. Par contre, il serait surprenant qu'une seule molécule contrôle un processus si important. Si c'était le cas, on s'attendrait à des conséquences dramatiques dans le cas de la mutation de ce transporteur, comme par exemple dans la maladie de Tangier. Au contraire, les personnes atteintes de cette maladie n'ont qu'un risque modéré de développer des maladies cardiovasculaires. Il serait donc probable qu'il existe des mécanismes compensatoires à l'efflux lipidique contrôlé par ABCA1.

Un mécanisme compensatoire pourrait faire intervenir la famille de protéines BSP (BSP-A1/-A2, BSP-A3 et BSP-30kDa). Ces protéines remplissent une fonction cruciale dans le processus de capacitation des spermatozoïdes bovins. Elles interagissent avec les phospholipides portant un groupement choline de la membrane spermatique afin d'induire l'efflux concomitant de cholestérol et de phospholipides. Cet efflux lipidique est similaire à celui qui est observé lors de la première étape du RCT. Afin d'étudier l'implication possible de ces protéines dans le RCT, il était d'abord nécessaire de démontrer leur présence au niveau des tissus périphériques et du sérum. Les objectifs de cette étude étaient donc de démontrer la distribution ubiquitaire des protéines BSP ainsi que d'établir une stratégie efficace pour leur isolement et purification.

3.1. Choix du modèle animal

Le bovin n'est pas couramment utilisé comme modèle animal en recherche. Malgré cela, ce modèle était le plus approprié pour nos recherches pour plusieurs raisons. D'abord, les protéines BSP ont été découvertes dans le plasma séminal du bovin [89] et leurs caractéristiques ont été étudiées et documentées chez cette espèce [84]. Il est possible que les homologues de ces protéines présents chez d'autres espèces animales n'aient pas exactement les mêmes propriétés, ce qui rendrait plus difficile leur purification. De plus, seuls les anticorps dirigés contre les protéines du plasma séminal bovin sont disponibles. Ces anticorps n'ont pas une réactivité croisée adéquate avec les BSP-homologues du plasma séminal des espèces animales fréquemment utilisées comme modèles en recherche, soient la souris et le rat. L'étude des protéines BSP-homologues chez ces espèces nécessiterait donc plusieurs étapes préalables afin de générer des anticorps. Jusqu'à aujourd'hui, il y a peu d'évidences démontrant la présence de BSP-homologues tissulaires et sériques chez la souris et le rat. Par contre, il est clair qu'une fois les bases établies chez le bovin, il sera nécessaire de trouver les homologues présents chez la souris et le rat afin d'utiliser ces derniers comme modèles. Ceci nous permettrait d'étudier les effets de la mutation, délétion et surexpression des gènes encodant les protéines BSP sur le métabolisme lipidique. Si notre hypothèse voulant que les protéines BSP soient impliquées dans l'efflux de cholestérol cellulaire est valide, nous nous attendrions à ce que l'absence ou la mutation de ces protéines provoque une accumulation faible, modérée ou sévère de cholestérol dans les artères due à une baisse de

clairance. À l'inverse, la surexpression des protéines BSP devrait conférer un certain niveau d'athéroprotection.

3.2. Localisation immunohistochimique des protéines BSP

À l'aide de la technique d'immunohistochimie avec des anticorps anti-BSP, nous avons détecté la présence des protéines BSP dans plusieurs tissus bovins. D'abord, dans la vésicule séminale qui servait de contrôle positif, les protéines BSP étaient localisées au niveau des cellules épithéliales ainsi que dans les sécrétions luminales. Ce résultat était attendu puisque les protéines BSP sont sécrétées dans le plasma séminal [84]. Une localisation semblable a aussi été observée dans le cas des poumons, de l'intestin et des reins. Il semblerait donc que ces protéines soient sécrétées à partir des cellules épithéliales de ces tissus. De manière différente, la coloration obtenue pour le foie et le cœur était beaucoup plus diffuse. À première vue, il pourrait sembler que la coloration observée dans le foie et le cœur soit due à la réaction non-spécifique de l'anticorps secondaire, mais plusieurs raisons portent à croire qu'il s'agit d'une véritable immunoréaction. D'abord, si la réaction était non-spécifique, on s'attendrait à ce que les contrôles négatifs soient colorés eux aussi, ce qui n'était pas le cas. De plus, les expériences ultérieures ont permis d'isoler les protéines BSP à partir du cœur et du foie, confirmant leur présence réelle dans ces deux tissus. Une dernière preuve à l'appui provient de travaux réalisés par Wellington *et al.* [165], où la localisation d'ABCA1 a été étudiée. D'abord, dans le cœur et le foie, l'ARN messager et la protéine ABCA1 étaient surtout localisés au niveau des cardiomyocytes et des hépatocytes, respectivement. L'immunoréaction au niveau

du foie est très semblable à ce que l'on a observé pour les protéines BSP. Dans le cas du cœur, les images de la localisation d'ABCA1 n'étaient pas montrées mais les auteurs affirment avoir observé une coloration diffuse. De plus, dans l'intestin, le rein et les poumons, l'ARN messager et la protéine ABCA1 étaient principalement localisés au niveau des cellules épithéliales, tout comme ce qui a été observé pour les protéines BSP. Étant donné que nous soupçonnons un rôle pour les protéines BSP dans la même étape du RCT qui fait intervenir ABCA1, il n'est pas surprenant que ces deux protéines localisent aux mêmes endroits. La présence d'ABCA1 a aussi été détectée dans l'épithélium de l'œsophage, de l'estomac, et de la vessie, ainsi qu'au niveau du cerveau, de la rate, de la surrénale et des tissus adipeux [165]. Des résultats préliminaires semblent indiquer la présence des protéines BSP dans la surrénale, mais il serait aussi intéressant de vérifier si elles se retrouvent dans tous les tissus où est retrouvé ABCA1.

3.2.1. Rôles postulés des protéines BSP dans les différents tissus

Notre hypothèse principale quant au rôle des protéines BSP dans chacun des tissus énumérés ci-haut est bien sûr dans la stimulation de l'efflux du cholestérol cellulaire excédentaire. ABCA1 joue aussi ce rôle dans ces tissus, mais remplit des fonctions supplémentaires dans certains d'entre eux. Il serait alors possible que les protéines BSP soient impliquées dans ces processus de manière indépendante.

Par exemple, les poumons possèdent un transporteur étroitement relié à ABCA1, soit ABCA3, qui est localisé dans les cellules alvéolaires. ABCA3 joue un rôle crucial dans la production du surfactant [166, 167], processus qui requiert

l'efflux de cholestérol et de phospholipides. Le surfactant pulmonaire a pour rôle de réduire la tension de surface à l'interface air/liquide alvéolaire, empêchant ainsi que les poumons se referment sur eux-mêmes [168]. Une production adéquate de surfactant est essentielle pour assurer la fonction pulmonaire. Il serait donc probable que d'autres protéines, telles les protéines BSP, soient impliquées dans ce processus.

L'intestin est le site principal de l'absorption du cholestérol alimentaire, de la réabsorption du cholestérol contenu dans la bile et il est possiblement impliqué dans la reprise sélective du HDL-cholestérol dans l'étape finale du RCT. Il a été suggéré que ABCA1 jouerait un rôle dans l'efflux de cholestérol des cellules intestinales vers la lumière intestinale afin de prévenir l'absorption excessive de cholestérol exogène [169, 170]. Étant donné la capacité des protéines BSP à induire l'efflux de cholestérol, il serait envisageable qu'elles puissent être impliquées à ce niveau. De plus, des résultats récents ont montré qu'ABCA1 est impliqué dans le transport des lipides au travers la membrane basolatérale des hépatocytes et des entérocytes ainsi que dans l'efflux basolatéral de cholestérol du foie et de l'intestin vers l'apoA-I et les HDL [171-173]. ABCA1 semble aussi être impliqué dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol au niveau du rein, puisque des dommages au rein qui provoquent une accumulation de cholestérol dans les tubules proximaux sont accompagnés de l'altération des niveaux d'expression d'ABCA1 [174, 175]. Il a aussi été proposé que le rein soit impliqué dans le métabolisme de l'apoA-I et des HDL [176, 177]. Des résultats préliminaires en biologie moléculaire semblent indiquer que la plus

forte expression de l'ARN messager des BSP, après la vésicule séminale, serait au niveau du rein. Il serait alors probable que les BSP aient aussi un rôle important à jouer dans cet organe. Pour ce qui est du cœur, il a été montré que les HDL influencent le rythme cardiaque [178]. Il existe donc possiblement un lien fonctionnel entre le métabolisme des HDL et l'expression des protéines BSP dans le muscle cardiaque.

3.3. Isolement des protéines BSP tissulaires

Puisque les protéines BSP n'avaient jamais été localisées dans des tissus périphériques, il était important de s'assurer que les résultats obtenus en immunohistochimie étaient bel et bien spécifiques. Les résultats montrés pour cette partie du travail ne sont que pour le poumon mais les protéines BSP ont été isolées et purifiées à partir de tous les tissus mentionnés dans la section 3.2. Ceci confirme que la coloration observée en immunohistochimie était spécifique.

Avec la chromatographie d'affinité GAG-agarose, deux nouvelles formes des protéines BSP ont été détectées dans les extraits tissulaires des cinq tissus mentionné précédemment. Ces protéines, qui sont fortement reconnues par les anticorps anti-BSP-A1/-A2, possèdent des poids moléculaires de 35 et 45 kDa. Le poids moléculaire élevé (35 et 45 kDa) pourrait être expliqué par une forte glycosylation de BSP-A1/-A2, quoiqu'il serait surprenant que le poids moléculaire d'une protéine triple à cause de la glycosylation. Une autre explication possible est que ces protéines de haut poids moléculaire seraient des précurseurs de la protéine BSP-A1/-A2 sensibles à la dégradation par les protéases. Ceci expliquerait pourquoi nous n'avons détecté ces protéines qu'avec

la seconde méthode d'isolement qui était de plus courte durée et diminuait ainsi la période d'exposition des protéines aux enzymes protéolytiques. Avec cette seconde stratégie d'isolement, deux protéines reconnues par l'anticorps anti-BSP-30kDa ont aussi été détectées. Puisque les anticorps anti-BSP sont spécifiques [179], ces protéines de 14 et 28 kDa correspondent probablement à un fragment de dégradation et à la protéine BSP-30kDa intacte, respectivement. La protéine de 14 kDa pourrait aussi correspondre à une nouvelle protéine BSP-homologue du même poids moléculaire qui a récemment été isolée du plasma sérial bovin [180].

3.4. Isolement des protéines BSP sériques

La détection des protéines BSP dans le sérum soutient l'idée qu'elles pourraient être impliquées dans le RCT, processus qui emprunte la voie circulatoire. Contrairement aux résultats obtenus dans le cas des tissus, seules les formes de 15 et 28 kDa des protéines BSP ont été retrouvées dans le sérum. Ceci est en accord avec l'hypothèse que les protéines de haut poids moléculaire qui ont été détectées seraient des précurseurs de BSP-A1/-A2. Ces précurseurs, synthétisés et sécrétés par les tissus, seraient clivés par des enzymes afin de donner la forme de 15 kDa de BSP-A1/-A2 que l'on retrouve au niveau du sérum.

Bien que les protéines BSP aient été détectées dans le sérum de bœuf et de vache, les résultats présentés dans ce mémoire sont ceux obtenus pour la femelle. Dans le cas du mâle, les protéines détectées pourraient provenir de l'entrée des protéines BSP présentes dans les sécrétions des vésicules séminales dans la circulation générale. Les résultats obtenus chez la vache sont donc plus

significatifs puisqu'il est impossible que les protéines isolées proviennent des vésicules séminales. Il est tout de même peu probable que les protéines BSP détectées dans le sérum du mâle proviennent des vésicules séminales puisqu'il existe une barrière entre la circulation du système reproducteur mâle et la circulation générale [181].

La détection des protéines BSP au niveau du sérum pourrait, à long terme, mener au développement d'outils diagnostiques. Des études présentement en cours dans notre laboratoire indiquent que des homologues des protéines BSP seraient présents au niveau du sérum et du plasma sanguin chez l'humain. Puisque nous croyons que ces protéines seraient impliquées dans l'efflux de cholestérol cellulaire du RCT, il serait probable que les personnes souffrant de troubles cardiovasculaires aient une altération dans la concentration des protéines BSP sériques. Il serait donc possible d'envisager l'utilisation d'un test RIA afin de doser la concentration de ces protéines chez les patients, ce qui pourrait être utile pour le diagnostic et le suivi des maladies du métabolisme du cholestérol.

La plupart des travaux effectués dans le but d'étudier l'efflux de cholestérol des cellules utilisent le sérum comme milieu de culture cellulaire. Le fait que les protéines BSP, qui ont la capacité de fortement stimuler l'efflux lipidique cellulaire, soient présentes au niveau du sérum, pourrait potentiellement influencer les résultats de ces études. Par exemple, lorsque l'efflux ABCA1-dépendant vers les HDL est mesuré, une partie de cet efflux pourrait être due à la présence de protéines BSP dans le sérum. Bien évidemment, les protéines BSP seraient aussi présentes dans les conditions contrôle où un efflux serait lui aussi

observé. Par contre, comme le mécanisme par lequel les protéines BSP stimulent l'efflux lipidique des cellules périphériques n'est pas encore élucidé, on ne connaît pas l'importance des interactions possibles entre les protéines BSP et les autres régulateurs du RCT. Il serait donc intéressant de répéter certaines de ces expériences avec du milieu de culture contenant du sérum dépourvu de protéines BSP afin de vérifier si les résultats seraient différents.

3.5. Les difficultés dans la purification des protéines BSP

Comme il a été mentionné dans la section 1.6.3., les protéines BSP peuvent lier de nombreuses molécules telles la gélatine, le collagène, les GAGs, la phosphatidylcholine, le fibrinogène et l'apoA-I. À première vue, il semblerait que la multitude de ligands rendrait la purification de ces protéines relativement facile mais le grand nombre d'interactions entretenues par les protéines BSP vient plutôt compliquer la tâche.

L'interaction avec le collagène, les GAGs et le fibrinogène suggère que les protéines BSP pourraient se retrouver dans la matrice extracellulaire (ECM). L'ECM, n'étant pas très soluble, demeure dans la fraction insoluble lors de l'homogénéisation des tissus. Il se peut donc qu'une bonne partie des protéines BSP tissulaires ait été perdue dans cette fraction insoluble. Lors de la séparation du sérum bovin par ultracentrifugation, l'interaction avec les GAGs semble aussi avoir causé des problèmes dans la purification des protéines BSP. Nous avons employé cette méthode afin de séparer la fraction sérique riche en lipoprotéines (qui devait contenir les protéines BSP dû à leur interaction avec l'apoA-I et les lipoprotéines) de la fraction sérique pauvre en lipoprotéines. Par contre, nos

résultats ont montré la présence de protéines BSP dans les deux fractions. Il est possible que les protéines BSP se soient retrouvées dans la fraction pauvre en lipoprotéines à cause de leur affinité pour les GAGs. Ces derniers seraient demeurés dans la fraction pauvre en lipoprotéines suite à l'ultracentrifugation et auraient retenu une partie des protéines BSP. Une façon possible d'éliminer cette interférence serait d'ajouter au sérum des enzymes qui hydrolysent les GAGs telle la chondroitinase ABC. Les protéines BSP interagissent aussi avec le fibrinogène, une protéine faisant partie de la cascade de coagulation. Lors de la coagulation, le fibrinogène est clivé par la thrombine afin de former la fibrine qui solidifie le caillot sanguin. Cette interaction peut être problématique lorsque l'on veut isoler les protéines BSP à partir du sérum. Afin de préparer le sérum bovin, nous avons laissé coaguler le sang. Il est donc possible qu'une partie des protéines BSP ait été incorporée dans le caillot grâce à leur liaison au fibrinogène. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences d'isolement des protéines BSP à partir du plasma sanguin bovin sont présentement en cours. Si les protéines BSP sont véritablement incorporées dans le caillot sanguin, leur concentration devrait être plus élevée dans le plasma. Un autre problème fréquent qui est rencontré dans la purification des protéines BSP provient de leur interaction avec les lipides. Cette interaction peut empêcher ou diminuer la liaison des protéines à une colonne d'affinité en masquant les sites d'interaction de la protéine. Un moyen de remédier à ce problème est de délipider les échantillons avant de les passer sur la colonne. Cependant, la procédure de délipidation mène à la perte de protéines et

nécessite l'utilisation de plusieurs solvants organiques qui ont tendance à dénaturer les protéines.

Étant donné toutes ces difficultés, la purification des protéines BSP peut s'avérer très difficile. Donc, lorsqu'on tente d'isoler ces protéines à partir d'une nouvelle source il est souvent nécessaire d'essayer plus d'une méthode afin d'établir la stratégie la plus efficace.

3.5.1. Établissement d'une stratégie de purification

Lorsqu'on veut purifier une protéine, une des meilleures stratégies est d'exploiter les propriétés de liaison de cette protéine en utilisant la chromatographie d'affinité. Cette technique est l'une des plus puissantes dû à sa grande spécificité. Dans le cas des protéines BSP, il y a plusieurs choix quant au ligand à utiliser. Nous avons eu recours à deux de ces propriétés de liaison afin d'isoler les protéines BSP à partir des tissus et du sérum. Pour chaque source, nous avons utilisé deux approches d'isolement différentes.

Afin d'isoler les protéines BSP des tissus bovins, nous avons d'abord eu recours à une colonne d'affinité gélatine-agarose. Brièvement, cette méthode consistait en l'homogénéisation des tissus suivie d'une série de centrifugations après lesquelles les surnageants ont été lyophilisés, délipidés, dialysés et passés sur la colonne d'affinité. Cette méthode a permis l'isolement d'une petite quantité de protéines BSP qui ont ensuite été purifiées par HPLC. Par contre, le nombre élevé d'étapes a certainement mené à une perte protéique importante. De plus, cette stratégie demandait trop de temps entre l'homogénéisation initiale et la purification finale ce qui pouvait entraîner la dégradation des protéines. La

seconde méthode élaborée avait donc pour but d'être de plus courte durée et contenir moins d'étapes afin d'obtenir un rendement supérieur. Étant donné des résultats récents de notre laboratoire indiquant une forte affinité entre les protéines BSP et les GAGs semblables à l'héparine (heparan sulfate, chondroïtine sulfate B) [108], nous avons choisi de passer nos extraits tissulaires sur une colonne d'affinité GAG-agarose. Afin de diminuer le nombre d'étapes et surtout d'éviter la délipidation qui a tendance à causer beaucoup de problèmes, nous avons tenté de directement passer le surnageant de l'homogénat tissulaire sur la colonne. Cette approche s'est avérée très efficace puisque suite à la chromatographie d'affinité, nous avons détecté deux nouvelles formes de protéines immunoréactives avec les anticorps anti-BSP. Il s'agissait de deux formes de poids moléculaire supérieure à celui des protéines BSP connues. La seconde stratégie de purification des protéines BSP tissulaires était donc préférable puisqu'elle était plus de plus courte durée et a permis de retirer plus d'informations sur les protéines BSP tissulaires.

Nous avons aussi eu recours à deux méthodes différentes pour l'isolement des protéines BSP sériques. Étant donné la forte concentration protéique dans le sérum, notre première approche était de séparer les lipoprotéines du reste des protéines sériques par ultracentrifugation. Puisque les protéines BSP interagissent avec l'apoA-I et les HDL, nous nous attendions à retrouver les protéines BSP dans la fraction sérique riche en lipoprotéines. Suite à cette séparation, nous avons utilisé une colonne d'affinité GAG-agarose afin d'isoler les protéines BSP de la fraction sérique riche en lipoprotéines. Contrairement à nos attentes, les

protéines BSP ont été détectées dans les deux fractions sériques, probablement à cause d'une interaction avec les GAGs présents dans le sérum. L'étape d'ultracentrifugation s'est donc avérée inutile puisqu'elle n'a pas mené à l'enrichissement des protéines BSP dans une seule des deux fractions sériques. Une seconde stratégie d'isolement a donc été entreprise afin d'isoler les protéines BSP du sérum. Cette fois, le sérum a été dilué afin de réduire sa viscosité et il a été directement déposé sur une colonne d'affinité gélatine-agarose. Ceci a permis l'isolement d'une plus grande quantité de protéines BSP qui ont ensuite été purifiées par HPLC. Cette seconde stratégie pour l'isolement des protéines BSP sériques s'est donc avérée plus efficace que la première.

Nos objectifs à long terme sont de caractériser les protéines BSP tissulaires et sériques et d'élucider leur rôle dans le RCT. Ces études vont nécessiter une grande quantité de protéines purifiées et une stratégie de purification rapide et efficace pourra nous éviter du travail et nous sauver beaucoup de temps.

3.6. Évidences pour l'importance de l'efflux lipidique non-ABCA1-dépendant

Une étude récente sur l'hypoalphalipoprotéïnémie familiale (maladie discutée dans la section 1.5.4.) a fortement suggéré que l'efflux lipidique indépendant d'ABCA1 puisse aussi être important pour le maintien des niveaux de HDL plasmatiques [82]. Cette étude, ainsi que plusieurs autres [39, 40, 182], soutiennent l'idée que l'efflux de cholestérol vers l'apoA-I faiblement lipidé est principalement régulé par ABCA1. Cependant, certaines études ont suggéré que l'efflux de lipides vers les particules de HDL matures dépende aussi d'autres

facteurs non-identifiés. Il a été démontré que les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Tangier présentent un défaut complet dans l'efflux vers l'apoA-I, tandis que l'efflux vers les HDL était diminué de seulement 50% [76, 77]. Il a aussi été démontré que des vésicules composées de phospholipides stimulent l'efflux de cholestérol avec la même efficacité à partir de cellules normales ou de cellules des patients atteints de la maladie de Tangier (mutées dans ABCA1) [76]. Donc, avec ce type de vésicule comme accepteur, l'efflux de cholestérol à partir de cellules ABCA1-déficientes est relativement normal. Étant donné leur forte affinité pour les phospholipides portant un groupement choline et leur capacité à stimuler l'efflux de phospholipides ainsi que de les accepter, les protéines BSP pourraient agir comme des particules enrobées de phospholipides et stimuler l'efflux de cholestérol indépendamment d'ABCA1.

La prévalence de défauts dans l'efflux lipidique cellulaire et de mutations dans le locus du gène encodant ABCA1 chez des patients atteints d'hypoalphalipoprotéïnémie a été déterminée dans une étude de Marcil *et al.* [183]. Leurs résultats ont démontré que 33% des patients analysés présentaient un défaut dans l'efflux de cholestérol et que 16% portaient une mutation dans le gène encodant ABCA1. Ce qui est intéressant est que dans deux des familles de patients atteints d'hypoalphalipoprotéïnémie, le locus du gène ABCA1 a été exclu comme étant la cause du défaut d'efflux de cholestérol. Ceci suggère que d'autres protéines pourraient être impliquées dans le processus d'efflux de cholestérol cellulaire et dans la formation de particules de HDL matures dans le plasma sanguin humain.

Une étude de Kiss *et al.* [184] a aussi rapportée des évidences en faveur de l'existence de mécanismes ABCA1-indépendants pour l'efflux lipidique. Ils ont remarqué que la déficience en ABCA1 faisait diminuer significativement la quantité de HDL formée et que cette diminution était due à un défaut dans le gain de lipides par l'apoA-I. Cependant, les auteurs ont remarqué qu'il y avait un niveau basal significatif de gain de lipides par l'apoA-I en l'absence d'ABCA1. Leurs expériences ont indiqué que l'apoA-I peut acquérir des lipides au niveau intracellulaire ou péri-cellulaire (efflux) et que ces deux processus sont distincts et pourraient être régulés de manière indépendante. Ils ont remarqué que la quantité de HDL formée à partir de l'apoA-I endogène était plus fortement réduite par une déficience en ABCA1 que celle des HDL formés à partir d'apoA-I ajouté de manière exogène. Or, ABCA1 est impliqué dans le transfert de lipides sur l'apoA-I par le mécanisme péri-cellulaire d'efflux lipidique, mais contribue de manière plus significative au gain de lipides intracellulaire de l'apoA-I nouvellement synthétisé. De plus, ils ont démontré que les HDL formés à partir de l'apoA-I endogène étaient différents de ceux formés par l'apoA-I exogène, suggérant que des voies ainsi que des protéines différentes seraient nécessaires afin que l'apoA-I puisse s'enrichir en lipides. L'ensemble de leurs travaux ont démontré l'existence d'une voie ABCA1-indépendante pour le transfert de lipides sur l'apoA-I. Ces résultats sont en accord avec ceux de Remaley *et al.* discutés au début de cette section [76], montrant que le transfert de lipides sur l'apoA-I pauvre en lipides (endogène) serait principalement régulé par ABCA1 mais que

l'efflux vers des HDL matures (pouvant être exogènes à la cellule qui subit l'efflux) dépendrait aussi d'autres facteurs.

3.7. Les protéines BSP fonctionnent indépendamment d'ABCA1

Des résultats non-publiés provenant d'un collaborateur (Dr Cheryl Wellington, University of British Columbia) supportent l'hypothèse que les protéines BSP stimulent l'efflux de cholestérol par une voie distincte de celle empruntée par ABCA1. D'abord, ces résultats ont montré qu'un mélange des trois protéines BSP (isolées du plasma sérial) stimule l'efflux de cholestérol de manière aussi efficace que ce soit à partir de fibroblastes normaux ou de fibroblastes de patients atteints de la maladie de Tangier, i.e. cellules chez lesquelles ABCA1 est muté. Ce résultat ressemble beaucoup à ce qui avait été observé par Remaley *et al.* [76] avec les vésicules de phospholipides (section 3.6.). Par contre, ces mêmes fibroblastes ABCA1-déficients avaient un défaut important dans l'efflux de cholestérol vers l'apoA-I. Des résultats similaires ont aussi été obtenus lorsqu'ils utilisaient des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK 293); les protéines BSP pouvaient aussi bien stimuler l'efflux de cholestérol dans des cellules ABCA1-proficientes ou ABCA1-déficientes. Encore une fois, l'apoA-I n'était pas en mesure de stimuler un efflux significatif de cholestérol lorsque ABCA1 était absent. Ces résultats suggèrent que l'efflux de cholestérol stimulé par les protéines BSP serait indépendant d'ABCA1, supportant l'idée que les protéines BSP pourraient partiellement compenser pour l'absence d'ABCA1 dans la maladie de Tangier. Afin de confirmer ces observations, il serait intéressant de vérifier si des inhibiteurs de l'efflux de

cholestérol ABCA1-dépendant, tels le glyburide [185], ont un effet sur l'efflux lipidique stimulé par les protéines BSP.

3.8. Modèle hypothétique du rôle des protéines BSP dans le RCT

Les protéines BSP sont en mesure d'interagir avec une panoplie de molécules dont les phospholipides portant un groupement choline présents dans les membranes cellulaires, les lipoprotéines, les apolipoprotéines, le fibrinogène, le collagène et les GAGs qui constituent les chaînes latérales des protéoglycanes. L'interaction entre les protéines BSP et toutes ces molécules suggère fortement que les BSP sont présentes dans l'ECM. Cet emplacement dans l'environnement immédiat des membranes cellulaires serait optimal afin de permettre la stimulation de l'efflux de cholestérol. Les protéines BSP pourraient donc interagir avec la surface cellulaire en réponse à des stimuli encore inconnus, afin de promouvoir l'efflux de lipides. Ces lipides pourraient d'abord être acceptés par les protéines BSP elles-mêmes. Il a déjà été démontré que les protéines BSP sont en mesure de stimuler l'efflux de cholestérol et de phospholipides en l'absence d'autres accepteurs tels les lipoprotéines et les apolipoprotéines, et ce autant à partir de la membrane spermatique [131, 186] que de la membrane fibroblastique [156]. Dans les deux cas, il y a formation de particules d'efflux ayant une densité comparable à celles des HDL et contenant du cholestérol, des phospholipides portant un groupement choline ainsi que des protéines BSP [131, 157]. Les lipides acceptés par les protéines BSP pourraient ensuite être transférés aux particules de HDL afin d'assurer leur transport dans la circulation jusqu'au foie en passant par les différentes étapes connues du RCT. Une autre possibilité

serait que les protéines BSP serviraient de transporteurs elle-mêmes afin d'acheminer les lipides au foie via la circulation. Les deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives, même qu'il serait possible qu'elles co-existent. Puisqu'on retrouve les protéines BSP dans le sérum, elles pourraient servir de transporteurs lipidiques. Par contre, comme leur concentration sérique semble être faible, il serait probable que les HDL ou d'autres lipoprotéines acceptent et transportent la majeure partie des lipides. Cette faible quantité de protéines BSP dans le sérum suggère qu'un mécanisme de recyclage des protéines BSP œuvre dans l'ECM. Le modèle proposé est représenté à la figure 7.

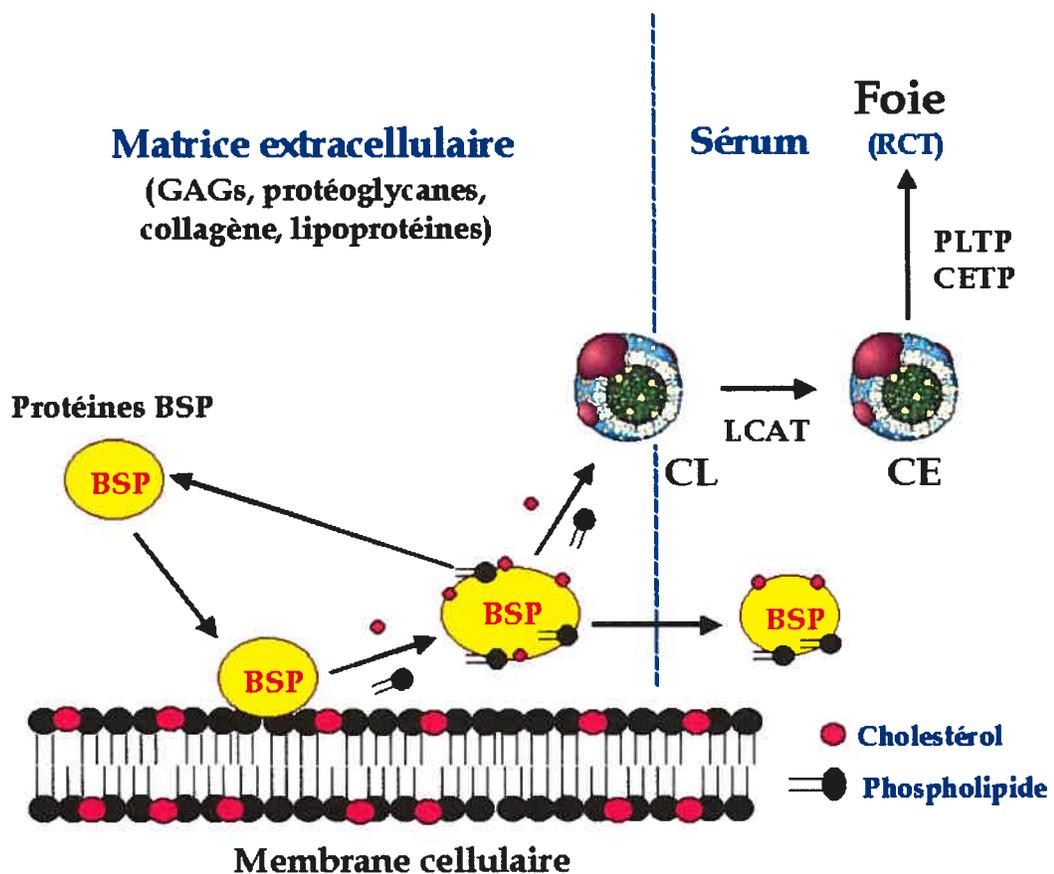


Figure 7. Modèle postulé du rôle des protéines BSP dans le RCT. CL, cholestérol libre; CE, cholestérol estérifié.

4. Conclusions

Nos travaux ont démontré, pour la première fois, que les protéines BSP sont présentes dans les tissus périphériques. Elles ont été localisées dans les poumons, l'intestin, le cœur, les reins et le foie par immunohistochimie ainsi qu'isolées à partir de ces tissus. Ces protéines possèdent des propriétés de liaison semblables aux protéines BSP du plasma séminal, soient une affinité pour la gélatine et les GAGs, et elles interagissent de manière spécifique avec les anticorps anti-BSP. Il s'agit aussi d'une première pour ce qui est de l'isolement des protéines BSP à partir du sérum. Les protéines isolées du sérum partagent aussi les propriétés de liaison des protéines BSP du plasma séminal et réagissent spécifiquement avec les anticorps. L'ensemble de ces résultats démontre que les protéines BSP sont distribuées de façon ubiquitaire dans l'organisme, ce qui soutient notre hypothèse voulant qu'elles soient impliquées dans une voie alternative du RCT.

Il reste encore beaucoup de travail à faire afin d'élucider le rôle des protéines BSP dans les tissus et le sérum. Il est probable que ces protéines soient impliquées dans plusieurs voies nécessitant l'efflux de cholestérol, tel le RCT. Les résultats de nombreuses études suggèrent l'existence probable de protéines stimulatrices de l'efflux lipidique fonctionnant indépendamment d'ABCA1. Des mutations ou des changements dans le niveau d'expression de ces protéines pourraient faire partie des causes de certaines maladies du métabolisme des lipides. La compréhension du mécanisme par lequel les protéines BSP régulent l'efflux de cholestérol est donc critique pour le développement subséquent

d'outils diagnostiques et thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires ainsi que pour la régulation de la fertilité.

5. Perspectives

Ce projet est à ses débuts alors les possibilités quant aux expériences à effectuer dans le futur sont illimitées. Il est évident que l'objectif principal dans les années à venir sera d'élucider le rôle des protéines BSP dans le RCT et dans la régulation de l'efflux de cholestérol cellulaire. Afin de valider notre modèle présenté dans la section 3.8., il sera nécessaire de déterminer si les protéines BSP sont effectivement des protéines de l'ECM. De plus, il serait intéressant de vérifier si les protéines BSP sont régulées par des composantes de l'ECM et si leur liaison à la surface cellulaire déclenche une cascade de signalisation intracellulaire. Les stimuli qui provoquent la liaison des protéines BSP aux cellules pourront aussi être identifiés.

Les travaux effectués avec les extraits tissulaires ont permis l'indentification de deux protéines apparentées aux protéines BSP mais ayant des poids moléculaires plus élevées. Par séquençage de ces protéines, il sera possible de déterminer s'il s'agit de précurseurs aux protéines BSP ou simplement de formes fortement glycosylées. Si ces protéines correspondent à des précurseurs, les sites de coupure ainsi que la protéase qui effectue le clivage pourront être identifiés.

L'utilisation des outils de la biologie moléculaire pour ce projet pourrait apporter plusieurs informations cruciales à l'élucidation du mécanisme par lequel les protéines BSP agissent dans le RCT. La caractérisation des gènes encodant ces protéines permettrait de vérifier si leur expression est augmentée en réponse à des stimuli tels l'accumulation excessive de cholestérol. Il serait aussi intéressant

de vérifier si l'ARN messager des protéines BSP est exprimé aux mêmes endroits que les protéines. En utilisant un modèle murin, il serait possible de vérifier les niveaux d'expression de ces protéines lors de maladies cardiovasculaires ainsi que d'observer les effets de la mutation, délétion ou surexpression de ces protéines sur l'efficacité du RCT et le développement d'états pathologiques.

Maintenant que les bases du projet ont été établies chez le bovin, il devient nécessaire de concentrer nos efforts sur la détection des protéines BSP-homologues chez l'humain. La localisation tissulaire et le développement d'un RIA permettant de déterminer la concentration sérique et tissulaire de ces protéines pourraient servir d'indicateurs de maladies du métabolisme des lipides.

6. Bibliographie

1. Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985; 822: 267-287.
2. Redgrave TG. Formation and metabolism of chylomicrons. *Int Rev Physiol* 1983; 28: 103-130.
3. Havel RJ. George Lyman Duff memorial lecture. Role of the liver in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 569-580.
4. Havel RJ. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res* 1984; 25: 1570-1576.
5. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36: 211-228.
6. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 46: 1493-1498.
7. Zannis VI, Karathanasis SK, Keutmann HT, Goldberger G, Breslow JL. Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 2574-2578.
8. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 1992; 33: 141-166.
9. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 1988; 27: 25-29.

10. Kane JP. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu Rev Physiol* 1983; 45: 637-650.
11. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977; 46: 897-930.
12. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-630.
13. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1977-1981.
14. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 1993; 34: 1637-1659.
15. Fielding PE, Fielding CJ. Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In: D.E. Vance (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 1991; Elsevier, Amsterdam: 427-459.
16. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9: 155-167.
17. Jolley CD, Woollett LA, Turley SD, Dietschy JM. Centripetal cholesterol flux to the liver is dictated by events in the peripheral organs and not by the plasma high density lipoprotein or apolipoprotein A-I concentration. *J Lipid Res* 1998; 39: 2143-2149.

18. Yokoyama S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 231-244.
19. Haberland ME, Reynolds JA. Self-association of cholesterol in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70: 2313-2316.
20. Nichols JW, Pagano RE. Use of resonance energy transfer to study the kinetics of amphiphile transfer between vesicles. *Biochemistry* 1982; 21: 1720-1726.
21. Murphy JR. Erythrocyte metabolism. IV. Equilibration of cholesterol-4-C-14 between erythrocytes and variously treated sera. *J Lab Clin Med* 1962; 60: 571-578.
22. Zhao Y, Marcel YL. Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry* 1996; 35: 7174-7180.
23. Bellini F, Phillips MC, Pickell C, Rothblat GH. Role of the plasma membrane in the mechanism of cholesterol efflux from cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; 777: 209-215.
24. Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 1995; 270: 17250-17256.
25. Kutchai HC. Cellular membrane and transmembrane transport of solutes and water,. In: Berne, R.M., Levy, M.N. (eds.), *Physiology*, Mosby Publ., St-Louis, MO, 1993: 1-26.

26. Hara H, Yokoyama S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol Chem* 1991; 266: 3080-3086.
27. Li Q, Komaba A, Yokoyama S. Cholesterol is poorly available for free apolipoprotein-mediated cellular lipid efflux from smooth muscle cells. *Biochemistry* 1993; 32: 4597-4603.
28. Czarnicka H, Yokoyama S. Lecithin:cholesterol acyltransferase reaction on cellular lipid released by free apolipoprotein-mediated efflux. *Biochemistry* 1995; 34: 4385-4392.
29. Li Q, Czarnicka H, Yokoyama S. Involvement of a cellular surface factor(s) in lipid-free apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259: 227-234.
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. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22: 347-351.
32. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale

- D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Hayden MR, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-345.
33. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999; 22: 352-355.
34. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer 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.
35. Fitzgerald ML, Mendez AJ, Moore KJ, Andersson LP, Panjeton HA, Freeman MW. ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH₂-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J Biol Chem* 2001; 276: 15137-15145.
36. Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 1994; 21: 150-159.
37. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001; 42: 1007-1017.
38. Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001; 42: 1173-1179.

39. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275: 34508-34511.
40. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* 2000; 275: 33053-33058.
41. Chambenoit O, Hamon Y, Marguet D, Rigneault H, Rosseneu M, Chimini G. Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 2001; 276: 9955-9960.
42. Sakai N, Vaisman BL, Koch CA, Hoyt RF, Jr., Meyn SM, Talley GD, Paiz JA, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. Targeted disruption of the mouse lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) gene. Generation of a new animal model for human LCAT deficiency. *J Biol Chem* 1997; 272: 7506-7510.
43. Tall A. Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 235-257.
44. Jiang X, Francone OL, Bruce C, Milne R, Mar J, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest* 1996; 98: 2373-2380.
45. Francone OL, Royer L, Haghpassand M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J Lipid Res* 1996; 37: 1268-1277.

46. Demeester N, Castro G, Desrumaux C, De Geitere C, Fruchart JC, Santens P, Mulleners E, Engelborghs S, De Deyn PP, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Labeur C. Characterization and functional studies of lipoproteins, lipid transfer proteins, and lecithin:cholesterol acyltransferase in CSF of normal individuals and patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2000; 41: 963-974.
47. Ravnik SE, Zarutskie PW, Muller CH. Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol Reprod* 1992; 47: 1126-1133.
48. Zambon A, Bertocco S, Vitturi N, Polentarutti V, Vianello D, Crepaldi G. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1070-1074.
49. Sanan DA, Fan J, Bensadoun A, Taylor JM. Hepatic lipase is abundant on both hepatocyte and endothelial cell surfaces in the liver. *J Lipid Res* 1997; 38: 1002-1013.
50. Clay MA, Newnham HH, Forte TM, Barter PI. Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apoA-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1124: 52-58.
51. Bamberger M, Lund-Katz S, Phillips MC, Rothblat GH. Mechanism of the hepatic lipase induced accumulation of high-density lipoprotein cholesterol by cells in culture. *Biochemistry* 1985; 24: 3693-3701.

52. Murase T, Itakura H. Accumulation of intermediate density lipoprotein in plasma after intravenous administration of hepatic triglyceride lipase antibody in rats. *Atherosclerosis* 1981; 39: 293-300.
53. Goldberg IJ, Le NA, Paterniti JR, Jr., Ginsberg HN, Lindgren FT, Brown WV. Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. *J Clin Invest* 1982; 70: 1184-1192.
54. Amar MJ, Dugi KA, Haudenschild CC, Shamburek RD, Foger B, Chase M, Bensadoun A, Hoyt RF, Jr., Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. Hepatic lipase facilitates the selective uptake of cholesteryl esters from remnant lipoproteins in apoE-deficient mice. *J Lipid Res* 1998; 39: 2436-2442.
55. Glass C, Pittman RC, Weinstein DB, Steinberg D. Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 5435-5439.
56. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271: 518-520.
57. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997; 387: 414-417.
58. Temel RE, Trigatti B, DeMattos RB, Azhar S, Krieger M, Williams DL. Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in

- cultured mouse adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13600-13605.
59. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997; 272: 20982-20985.
60. de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillips MC, Williams DL. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res* 1999; 40: 575-580.
61. Kellner-Weibel G, de La Llera-Moya M, Connelly MA, Stoudt G, Christian AE, Haynes MP, Williams DL, Rothblat GH. Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry* 2000; 39: 221-229.
62. Gu X, Kozarsky K, Krieger M. 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* 2000; 275: 29993-30001.
63. Gordon DJ. Role of circulating high-density lipoprotein and triglycerides in coronary artery disease: risk and prevention. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990; 19: 299-309.
64. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.

65. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: Scriver, C.T., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, New York: McGraw-Hill 1995: 1981-2030.
66. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996; 272: 685-688.
67. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138: S419-420.
68. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 840-856.
69. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 99: 1726-1732.
70. 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.
71. 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.
72. Trigatti B, Rayburn H, Vinals M, Braun A, Miettinen H, Penman M, Hertz M, Schrenzel M, Amigo L, Rigotti A, Krieger M. Influence of the high density

- lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9322-9327.
73. Fredrickson DS, Altrocchi PH, Aviolo LV, Goodman DS, Goodman HC. Tangier disease: combined clinical staff conference at the National Institutes of Health. *Ann Intern Med* 1961; 55: 1016.
74. Assmann G. Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver, C.R, Beaudet, A.L., Sly, W.S. (eds.). McGraw-Hill, New York, NY. 1995: 2053-2072.
75. Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP, Jr., Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS, et al. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994; 107: 85-98.
76. Remaley AT, Schumacher UK, Stonik JA, Farsi BD, Nazih H, Brewer HB, Jr. 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.
77. Rogler G, Trumbach B, Klima B, Lackner KJ, Schmitz G. HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 683-690.
78. Mendez AJ, Uint L. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol and phospholipid efflux depend on a functional Golgi apparatus. *J Lipid Res* 1996; 37: 2510-2524.
79. 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 Commun* 1994; 205: 850-856.
80. 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.
81. Mott S, Yu L, Marcil M, Boucher B, Rondeau C, Genest J, Jr. Decreased cellular cholesterol efflux is a common cause of familial hypoalphalipoproteinemia: role of the ABCA1 gene mutations. *Atherosclerosis* 2000; 152: 457-468.
82. Hovingh GK, Van Wijland MJ, Brownlie A, Bisioendial RJ, Hayden MR, Kastelein JJ, Groen AK. The role of the ABCA1 transporter and cholesterol efflux in familial hypoalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2003; 44: 1251-1255.
83. Miller DJ, Ax R.L. Proceedings of the 12th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. 1988: 97-107.
84. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Diversity of Novel Proteins in Gonadal Fluids. in: *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic systems* 1988; (McKerns, K.W., and Chretien. M., Eds.), Plenum, New York: 259-273.
85. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 861-867.
86. Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 et BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* 1987; 241: 685-692.

87. Manjunath P, Sairam MR, Uma, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosciences Reports* 1987; 7: 231-238.
88. Desnoyers L, Therien I, Manjunath P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 425-435.
89. Manjunath P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam MR, Atkinson LE (eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance*. 1984: 49-61.
90. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chretien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J* 1987; 243: 195-203.
91. Baker ME. The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and a kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130: 1010-1014.
92. Constantine KL, Ramesh V, Banyai L, Trexler M, Patthy L, Llinas M. Sequence-specific ¹H NMR assignments and structural characterization of bovine seminal fluid protein PDC-109 domain b. *Biochemistry* 1991; 30: 1663-1672.
93. Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M, Topfer-Petersen E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 1996; 399: 147-152.

94. Skorstengaard K, Jensen MS, Sahl P, Petersen TE, Magnusson S. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem* 1986; 161: 441-453.
95. Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J Biol Chem* 1990; 265: 12156-12162.
96. Ishizaki J, Hanasaki K, Higashino K, Kishino J, Kikuchi N, Ohara O, Arita H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 5897-5904.
97. Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 1987; 329: 301-307.
98. Lobel P, Dahms NM, Kornfeld S. Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1988; 263: 2563-2570.
99. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988; 263: 6579-6587.
100. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase

- which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989; 264: 17213-17221.
101. McMullen BA, Fujikawa K. Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor). *J Biol Chem* 1985; 260: 5328-5341.
 102. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem* 1993; 268: 10024-10028.
 103. Constantine KL, Madrid M, Banyai L, Trexler M, Patthy L, Llinas M. Refined solution structure and ligand-binding properties of PDC-109 domain b. A collagen-binding type II domain. *J Mol Biol* 1992; 223: 281-298.
 104. Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 2553-2562.
 105. Ludwig T, Tenscher K, Remmler J, Hoflack B, Lobel P. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the full-length mouse mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Gene* 1994; 142: 311-312.
 106. Briknarova K, Grishaev A, Banyai L, Tordai H, Patthy L, Llinas M. The second type II module from human matrix metalloproteinase 2: structure, function and dynamics. *Structure Fold Des* 1999; 7: 1235-1245.

107. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 313-318.
108. Therien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P. Isolation and Characterization of Glycosaminoglycans from Bovine Follicular Fluid and their Effect on Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 2004; under revision.
109. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
110. Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 75-81.
111. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem* 1994; 269: 5776-5780.
112. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264: 16853-16857.
113. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 2002; 67: 1250-1258.
114. Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 2004; 70: 708-717.

115. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-698.
116. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 1951; 4: 581-596.
117. Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In : Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York : Raven Press 1994: 105-132.
118. Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12: 183-224.
119. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59: 1-6.
120. Go KJ, Wolf DP. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res* 1983; 20: 317-330.
121. Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 1985; 174: 269-283.
122. Suarez SS. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 1996; 17: 331-335.
123. Davis BK. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7560-7564.
124. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-1180.

125. Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycan 3H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J Androl* 1984; 5: 51-63.
126. Parrish JJ, First NL. Bovine in vitro fertilization. In : BS. Dunbar and MG. O'Rand (eds.) A comparative overview of mammalian fertilization. New York: PLenum Press. 1991: 351-361.
127. Davis BK, Byrne R, Bedigian K. Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 1546-1550.
128. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32: 145-153.
129. Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 1988; 20: 185-201.
130. Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 195-204.
131. Therien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59: 768-776.
132. Brantmeier SA, Grummer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci* 1987; 70: 2145-2149.

133. Parks JE, Ehrenwald E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In : Bavister, B.D., Cummins, J., Roldan E.R.S. (eds.), *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA 1990: 155-167.
134. Davis BK. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch Androl* 1980; 5: 249-254.
135. Fayrer-Hosken RA, Brackett BG, Brown J. Reversible inhibition of rabbit sperm-fertilizing ability by cholesterol sulfate. *Biol Reprod* 1987; 36: 878-883.
136. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59: 7-11.
137. Therien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 1997; 57: 1080-1088.
138. Therien I, Bousquet D, Manjunath P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 2001; 65: 41-51.
139. Jaspard B, Collet X, Barbaras R, Manent J, Vieu C, Parinaud J, Chap H, Perret B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry* 1996; 35: 1352-1357.
140. Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1326-1332.

141. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 1092-1098.
142. Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1983; 28: 683-690.
143. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res* 1985; 12: 345-355.
144. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42: 899-915.
145. Therien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-Binding Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Capacitation of Spermatozoa by Heparin. *Biology of Reproduction* 1995; 52: 1372-1379.
146. Williams-Ashman HG. Perspectives in the male sexual physiology of eutherian mammals. In: Knobil, E., Neill, J. (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press 1988: 727-751.
147. Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfeld DL, Hershlag A. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod* 1993; 8: 2141-2154.

148. Manjunath P, Therien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 109-119.
149. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 39.
150. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol Reprod* 2004; 70: 656-661.
151. Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 2): 615-622.
152. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407: 201-206.
153. Menard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D, Manjunath P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 349-357.

154. Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Characterization of Ram Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Homologous to the Bovine Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins. *Biol Reprod* 2004; submitted.
155. Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius HJ, Topfer-Petersen E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 37-43.
156. Moreau R, Frank PG, Perreault C, Marcel YL, Manjunath P. Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux. *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1438: 38-46.
157. Moreau R, Manjunath P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1438: 175-184.
158. Calabresi L, Meng QH, Castro GR, Marcel YL. Apolipoprotein A-I conformation in discoidal particles: evidence for alternate structures. *Biochemistry* 1993; 32: 6477-6484.
159. Smith LC, Massey JB, Sparrow JT, Gotto Jr AM, Pownall HJ. In: Herak, J.N. (eds.), *Supramolecular Structure and Function*, Plenum, New York 1983: p.213.
160. Bielicki JK, Johnson WJ, Weinberg RB, Glick JM, Rothblat GH. Efflux of lipid from fibroblasts to apolipoproteins: dependence on elevated levels of cellular unesterified cholesterol. *J Lipid Res* 1992; 33: 1699-1709.

161. Moreau R, Manjunath P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1487: 24-32.
162. Mendez AJ. Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. *J Lipid Res* 1997; 38: 1807-1821.
163. Zha X, Gauthier A, Genest J, McPherson R. Secretory vesicular transport from the Golgi is altered during ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2003; 278: 10002-10005.
164. Fielding PE, Fielding CJ. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 1995; 34: 14288-14292.
165. Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R, Yang YZ, Zhang LH, James E, Wilson JE, Francone O, McManus BM, Hayden MR. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest* 2002; 82: 273-283.
166. Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett* 2001; 508: 221-225.
167. Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med* 2004; 350: 1296-1303.
168. Johansson J, Curstedt T. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem* 1997; 244: 675-693.

169. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4245-4250.
170. Knight BL, Patel DD, Humphreys SM, Wiggins D, Gibbons GF. Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res* 2003; 44: 2049-2058.
171. Ohama T, Hirano K, Zhang Z, Aoki R, Tsujii K, Nakagawa-Toyama Y, Tsukamoto K, Ikegami C, Matsuyama A, Ishigami M, Sakai N, Hiraoka H, Ueda K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 625-630.
172. Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ. LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2002; 43: 1054-1064.
173. Neufeld EB, Demosky SJ, Jr., Stonik JA, Combs C, Remaley AT, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 974-979.

174. Johnson AC, Yabu JM, Hanson S, Shah VO, Zager RA. Experimental glomerulopathy alters renal cortical cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA reductase expression. *Am J Pathol* 2003; 162: 283-291.
175. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, Shah VO. Acute tubular injury causes dysregulation of cellular cholesterol transport proteins. *Am J Pathol* 2003; 163: 313-320.
176. Glass CK, Pittman RC, Keller GA, Steinberg D. Tissue sites of degradation of apoprotein A-I in the rat. *J Biol Chem* 1983; 258: 7161-7167.
177. Braschi S, Neville TA, Maugeais C, Ramsamy TA, Seymour R, Sparks DL. Role of the kidney in regulating the metabolism of HDL in rabbits: evidence that iodination alters the catabolism of apolipoprotein A-I by the kidney. *Biochemistry* 2000; 39: 5441-5449.
178. Williams PT, Haskell WL, Vranizan KM, Krauss RM. The associations of high-density lipoprotein subclasses with insulin and glucose levels, physical activity, resting heart rate, and regional adiposity in men with coronary artery disease: the Stanford Coronary Risk Intervention Project baseline survey. *Metabolism* 1995; 44: 106-114.
179. Nauc V, Manjunath P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod* 2000; 63: 1058-1066.
180. Liberda J, Ryslava H, Jelinkova P, Jonakova V, Ticha M. Affinity chromatography of bull seminal proteins on mannan-Sepharose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 780: 231-239.

181. Setchell BP, Brooks DE. Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of the Male Reproductive Tract. In : Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 1st edition. New York : Raven Press 1988: 753-836.
182. Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer LJ, McNeish J, Francone OL. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* 2000; 275: 28634-28640.
183. Marcil M, Bissonnette R, Vincent J, Krimbou L, Genest J. Cellular phospholipid and cholesterol efflux in high-density lipoprotein deficiency. *Circulation* 2003; 107: 1366-1371.
184. Kiss RS, McManus DC, Franklin V, Tan WL, McKenzie A, Chimini G, Marcel YL. The lipidation by hepatocytes of human apolipoprotein A-I occurs by both ABCA1-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 10119-10127.
185. Becq F, Hamon Y, Bajetto A, Gola M, Verrier B, Chimini G. 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* 1997; 272: 2695-2699.
186. Therien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1999; 61: 590-598.