

**Université de Montréal**

**Le rôle du récepteur scavenger B type I, SR-BI, dans  
l'absorption et le métabolisme du cholestérol au niveau intestinal.**

par

**Elena CIUBOTARIU**

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue d'obtention du grade de

Maître en sciences (M.Sc)  
en Nutrition

mars, 2003

© Elena CIUBOTARIU, 2003



QU

145

U58

2004

V.011

**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.

**Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle du récepteur scavenger B type I, SR-BI, dans l'absorption  
et le métabolisme du cholestérol au niveau intestinal.**

Présenté par :

Elena CIUBOTARIU

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Victor Gavino	Président du jury
Dr Emile Levy	Directeur de recherche
Dr Michèle Nadeau	Membre du jury

## Sommaire

Le récepteur scavenger type I, le SR-BI intervient activement dans le transport et le métabolisme du cholestérol. Il appartient à la superfamille des récepteurs scavengers qui sont une classe de protéines logées dans les membranes cellulaires. Ce sont des récepteurs multiligands qui possèdent des fonctions multiples : défense immunitaire, antibactérienne et virale, clairance des cellules apoptotiques, transport des lipides, etc. En même temps, ayant la capacité d'interagir avec certains groupes de lipoprotéines, ils sont impliqués dans le métabolisme des lipides et par ce fait même ils jouent un rôle important dans le processus d'athérosclérose. Parmi les récepteurs scavengers, le SR-BI se démarque par sa haute affinité et par sa capacité de lier et de transporter le HDL-cholestérol. Ainsi, ce récepteur joue un rôle important dans le transport cellulaire bidirectionnel du cholestérol (influx et efflux). De plus, il a été démontré que le SR-BI est aussi impliqué dans le transport inverse du cholestérol, de la périphérie vers le foie et vers les tissus de synthèse des hormones stéroïdiennes. On remarque une expression abondante du SR-BI au niveau du foie et certains sites de synthèse d'hormones stéroïdiennes. Toutefois, récemment le SR-BI a été la cible de recherche dans l'intestin où il pourrait influencer l'absorption du cholestérol alimentaire.

Les objectifs de ce projet sont, premièrement, d'établir un modèle intestinal *in vitro* pour le transport et le métabolisme des lipides. Dans un deuxième temps ce modèle a été utilisé dans l'étude de la fonctionnalité du SR-BI par rapport aux autres récepteurs du cholestérol. Pour la première partie du projet, la synthèse des lipides et des fractions de cholestérol a été évaluée utilisant le [ $^{14}\text{C}$ ]-acide oléique et acétate, la synthèse des lipoprotéines avec le même [ $^{14}\text{C}$ ] acide oléique suivie d'ultracentrifugation et la synthèse des apolipoprotéines par l'incorporation du [ $^{35}\text{S}$ ] méthionine suivie d'électrophorèse. De plus, l'état de maturation cellulaire a été évalué en utilisant le dosage de la sucrase. Finalement, les enzymes clefs de synthèse (l'HMG-CoA réductase) et d'estérification (la ACAT) de cholestérol ont été évalués par l'incorporation du [ $^{14}\text{C}$ ]-acétate ou par dosage direct. Les résultats ont montré que les Caco-2/15 sont plus matures et plus fonctionnelles dans le métabolisme lipidique par rapport aux cellules

ATCC antérieurement utilisées. L'ensemble de ces résultats justifie l'utilisation des Caco-2/15 comme modèle intestinal optimal pour le transport des lipides. Par la suite, dans ce type de cellules bien caractérisées nous avons étudié le rôle de SR-BI et SR-AI dans l'absorption et le métabolisme du cholestérol en employant des anticorps et des inhibiteurs. Dans ces expériences, le SR-BI a été spécifiquement bloqué avec un anticorps dirigé contre sa partie fonctionnelle et le SR-AI avec un agent chimique, l'acide polyinosinique. Du côté apical, le blocage des deux récepteurs résulte en une diminution significative de l'absorption du cholestérol. Au pôle basolatéral, seul le blocage du SR-AI diminue l'influx du cholestérol. Non seulement le SR-BI favorise le transport du cholestérol du côté apical, mais il influence également le processus d'estérification du cholestérol. En outre, le double blocage des deux récepteurs semble indiquer qu'au niveau apical il y a une synergie d'action, mais au niveau basolatéral, les deux récepteurs agissent différemment.

En conclusion, ces données apportent un éclairage nouveau sur le rôle du SR-AI et SR-BI dans le métabolisme du cholestérol au niveau intestinal. Ces nouvelles connaissances pourraient mener dans le future à la synthèse de molécules qui modulent l'absorption et le métabolisme du cholestérol tout en prévenant l'apparition et le développement de l'athérosclérose.

Mots clés : athérosclérose, absorption intestinale, cholestérol, Caco-2/15, HDL, lipides, SR-BI, transport inverse.

## Summary

Scavenger receptor class B, type I play a key role in cholesterol transport and metabolism. It is a member of a super family of membrane proteins, namely the family of scavenger receptors. All of its members are multiligands proteins sharing multiple functions: immune antibacterial and antiviral defense, clearance of apoptotic cells, transport of lipids, etc. Being capable to bind and to internalize in a specific manner the lipoproteins, these complex proteins actively participate in lipid's metabolism and by these functions in the development of atherosclerosis. The SR-BI outstands these class of proteins by its high capacity and affinity to bind and transport selectively the HDL cholesterol. To a cellular level it is implicated in a bi-directional (influx/efflux) transport of cholesterol and to a systemic level, SR-BI is a major element of the reverse cholesterol transport from the periphery to the liver and some steroidogenic glands where, consecutively the SR-BI is highly express. More recently it was described the presence of SR-BI in the intestine where it may play an important role in the absorption of dietary cholesterol.

The objectives of this study are: first of all to establish an *in vitro* intestinal model for the cholesterol transport and metabolism. Secondly, using this model, to evaluate the impact of SR-BI blockade with a specific antibody over the cholesterol transport and metabolism in comparison with others intestinal cholesterol receptors. In the first part of study, we used the [ $^{14}\text{C}$ ] radio labeled oleic acid and [ $^{14}\text{C}$ ] acetate to quantify the lipid and lipoprotein metabolism and the [ $^{35}\text{S}$ ] radio labeled methionine for the apolipoprotein synthesis. The stage of maturity and the effect of different effectors on the viability of cells was establish by the transepithelial resistance and the by the level of the sucrase enzyme. Finally, the [ $^{14}\text{C}$ ] acetate was used to determine the essential enzyme in cholesterol synthesis, the HMG-CoA reductase and cholesterol esterification, the ACAT. Our results describe the CaCo-2/15 cells as a highly differentiated and functional model in comparison with the previously used model, the ATCC cells, justifying their use for the lipid transport experiences. Secondly, in this well characterized cell system we perform the study of SR-BI and SR-AI role in cholesterol transport and metabolism using

antibody and inhibitors. In this part of the project we selectively block the SR-BI using an antibody and the SR-AI using a chemical agent, the polyinosinic acid. In the apical compartment the double inhibition of the two receptors lead to a significant decrease of cholesterol absorption. In contrast, only the inhibition of SR-AI diminished significantly the influx of cholesterol in the basolateral compartment. On the other hand, the SR-BI blockade had an inhibitory effect not only on the cholesterol transport but equally on the cholesterol esterification. Finally, it seems that at the apical level the two receptors acts in synergy, differently to the basolateral level where the SR-BI and SR-AI apparently plays different functions.

Based on these results it is reasonable to suggest that at the intestinal level , SR-BI may play an important role in controlling the absorption of dietary cholesterol. If it does, SR-BI's activity may influence the risk for and development of atherosclerosis, and SR-BI may be an attractive candidate for prevention of or therapeutic intervention in this disease.

Key words: atherosclerose, intestinal absorption, cholesterol, Caco-2/15, HDL, lipids, SR-BI, reverse transport.



## Table des matières

<b>Page de titre</b> .....	p.i
<b>Page d'identification du jury</b> .....	p.ii
<b>Sommaire</b> .....	p.iii
<b>Table de matière</b> .....	p.v
<b>Liste des figures</b> .....	p.viii
<b>Liste des abréviations</b> .....	p.ix
<b>Remerciements</b> .....	p.xi
<b>I. Introduction</b> .....	p.1
<b>1. L'intestin – structure et fonctions dans le métabolisme lipidique....</b>	<b>p.1</b>
1.1 Structure macroscopique et microscopique.....	p.2
1.2 Digestion et absorption des lipides.....	p.3
1.2.1 Source des lipides.....	p.3
1.2.2 Digestion des lipides.....	p.4
1.2.3 Les micelles.....	p.4
1.2.4 Absorption des lipides.....	p.5
1.2.5 Métabolisme intracellulaire des lipides.....	p.6
<b>2. Les lipoprotéines.....</b>	<b>p.7</b>
2.1 Les chylomicrons.....	p.9
2.2 Les VLDL et les LDL.....	p.9
2.3 Les HDL.....	p.10
<b>3. Le cholestérol : lipide d'importance physiologique</b> <b>et patho-physiologique.....</b>	<b>p.12</b>
3.1 Cholestérol intestinal.....	p.13
3.2 Cholestérol hépatique.....	p.13

3.3	Synthèse endogène de cholestérol.....	p.14
3.4	Le transport du cholestérol via le récepteur LDL (transport endocytaire).....	p.14
3.5	Le transport inverse du cholestérol et les HDL.....	p.15
3.6	Le transport facilité du HDL-cholestérol.....	p.17
<b>4.</b>	<b>Identification et caractérisation du SR-BI.....</b>	<b>p.18</b>
4.1	La superfamille des récepteurs scavengers.....	p.18
4.2	Nomenclature.....	p.19
4.3	Le SR-BI : ligands et fonctions dérivées.....	p.20
4.4	SR-BI : structure et localisation sous cellulaire.....	p.21
4.5	SR-BI : médiateur de la liaison des HDL.....	p.23
4.6	SR-BI et le transport facilité des lipides.....	p.23
4.7	SR-BI et l'efflux de cholestérol.....	p.25
<b>5.</b>	<b>L'importance physiologique du SR-BI comme récepteur de HDL.....</b>	<b>p.26</b>
5.1	La distribution tissulaire.....	p.26
5.1.1	Expression chez l'adulte.....	p.26
5.1.2	Expression au cours de l'embryogenèse.....	p.28
5.2	Régulation de l'expression du SR-BI.....	p.28
5.2.1	Principaux sites de synthèse des hormones stéroïdiennes.....	p.29
5.2.2	Le foie.....	p.31
5.2.3	Mécanismes de régulation du SR-BI.....	p.33
5.3	Altération de l'expression du SR-BI par des manipulations immunochimiques et génétiques.....	p.33
5.3.1	Les anticorps bloquants.....	p.34
5.3.2	Surexpression hépatique.....	p.34
5.3.3	Inactivation génique : les souris knock-out.....	p.35
<b>6.</b>	<b>La variabilité génétique du SR-BI.....</b>	<b>p.36</b>
<b>7.</b>	<b>Le SR-BI et l'intestin.....</b>	<b>p.37</b>
<b>II.</b>	<b>Matériels et méthode.....</b>	<b>p.40</b>
<b>III. 1.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>p.46</b>

<b>2. Figures et légendes.....</b>	<b>p.50</b>
<b>IV. Discussion et conclusions générales .....</b>	<b>p.58</b>
<b>V. Références .....</b>	<b>p.67</b>
<b>VI. Remerciements .....</b>	<b>p.xi</b>

## Liste de figures

- Figure 1** : Structure de l'intestin.....p.2
- Figure 2** : Villosité intestinale et absorption des lipides.....p.6
- Figure 3** : Structure des lipoprotéines.....p.8
- Figure 4** : Types et composition des lipoprotéines.....p.11
- Figure 5** : Circulation des lipoprotéines.....p.12
- Figure 6** : Transport endocytaire par le récepteur de LDL.....p.15
- Figure 7** : Transport inverse de cholestérol.....p.17
- Figure 8** : Classes de récepteurs scavenger.....p.19
- Figure 9** : Localisation et ligands du SR-BI.....p.22
- Figure 10**: Puits de culture cellulaire polarisée.....p.22

## Liste des abréviations

ABCI :	Récepteur de cholestérol – ATP binding cassette
ACAT :	Acyl-CoA :cholestérol-acyltransférase
ACTH :	Adeno Corticotropine Hormone
apo :	Apolipoprotéine
AMP :	Adenosine Monophosphate
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATCC :	American Type Culture Cells
BSA:	Bovine Serum Albumine
CETP:	Colesteryl Ester Transfer Protein
Caco-2:	Carcinoid Colonocytes
CD36:	Cluster Determinant 36 ( Scavenger Receptor)
CE:	Cholesterol Esters
FABP :	Fatty Acids Binding Protein
FC:	Free Cholesterol
HDL:	High Density Lipoprotein
HMG-CoA:	3Hydroxyl 3Methylglutaryl Coenzyme A
hCG:	Human-Corionic Gonadotrophin
IDL :	Intermediate Density Lipoprotein
LPL:	Lipoprotein Lipase
LCAT:	Lecithin Cholesterol Acyl Transferase
LDL:	Low Density Lipoprotein
LH:	Luteinizing Hormone
LPS:	LipoPolySaccharide
MTP:	Microsomal Transfer Protein
PL:	Phospho Lipids
P450 Scc:	Enzyme de clivage latéral du cholestérol

PC :	Phosphatidylcholine
REL :	Réticulum Endoplasmique Lisse
SR-BI :	Scavenger Receptor BI
SCP :	Sterol Carrier Protein
SREBP:	Sterol Regulatory Element Binding Protein
StAR:	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
SVF:	Serum de Veau Fœtal
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
TG :	Triglycérides
TLC :	Thin Layer Chromatography
VLDL :	Very Low Density Lipoprotein

## **Remerciements**

Tout d'abord permettez-moi d'exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, Dr Emile Levy pour son soutien et son aide précieuse et inconditionnelle. Son expertise a représenté un élément essentiel à la réussite de ce projet, en me permettant d'acquérir une discipline et des aptitudes indispensables au travail de recherche. Par ailleurs, je tiens à mentionner la précieuse collaboration de chacun des membres de l'équipe du Dr Levy, dont l'aide et les conseils ont été grandement appréciés.

## Introduction

### 1. L'intestin – structure et fonction dans le métabolisme des lipides

#### 1.1. Structure macro et microscopique.

L'intestin, qui a une longueur d'environ 600 cm et qui s'étend du sphincter pylorique de l'estomac jusqu'au cæcum, est composé de trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléum. Bien qu'il n'existe pas de limite anatomique ou histologique entre le jéjunum et l'iléum, on considère habituellement que le jéjunum constitue les deux tiers proximaux du grêle et que l'iléum consiste au tiers distal.

La surface de l'intestin est augmentée par trois éléments morphologiques qui y sont spécifiques : les plis circulaires, les villosités intestinales et les micro-villosités. En fonction de leur rôle physiologique, l'aspect macroscopique et microscopique des trois segments de l'intestin change du jéjunum à l'iléum. Par exemple, au niveau du duodénum et du jéjunum, les plis circulaires de la muqueuse sont proéminents, mais ils sont pratiquement absents dans l'iléum.

Les villosités intestinales, des projections en doigts de la muqueuse dans la lumière, mesurent 0,5 à 1,5 mm de longueur et couvrent toute la surface de la muqueuse. Elles sont formées de replis des cellules épithéliales qui tapissent la lamina propria. Leur aspect microscopique varie : les villosités duodénales sont larges et aplaties (comme des feuilles), les villosités jéjunales sont hautes et minces, tandis que les villosités iléales sont plus petites. À la base des villosités, l'épithélium dépasse la lamina propria jusqu'à la muscularis mucosa (la couche musculaire de l'intestin) et forme les cryptes de Lieberkühn qui augmentent la surface fonctionnelle (Figure 1,2).

Les microvillosités sont des projections tubulaires sous la limite de détection de la microscopie optique. Elles consistent en des extensions de la membrane apicale de l'entérocyte et forment collectivement la bordure en brosse. Ce réseau membranaire complexe contient des enzymes, des récepteurs et des protéines de transport nécessaires à la digestion finale et à l'absorption.



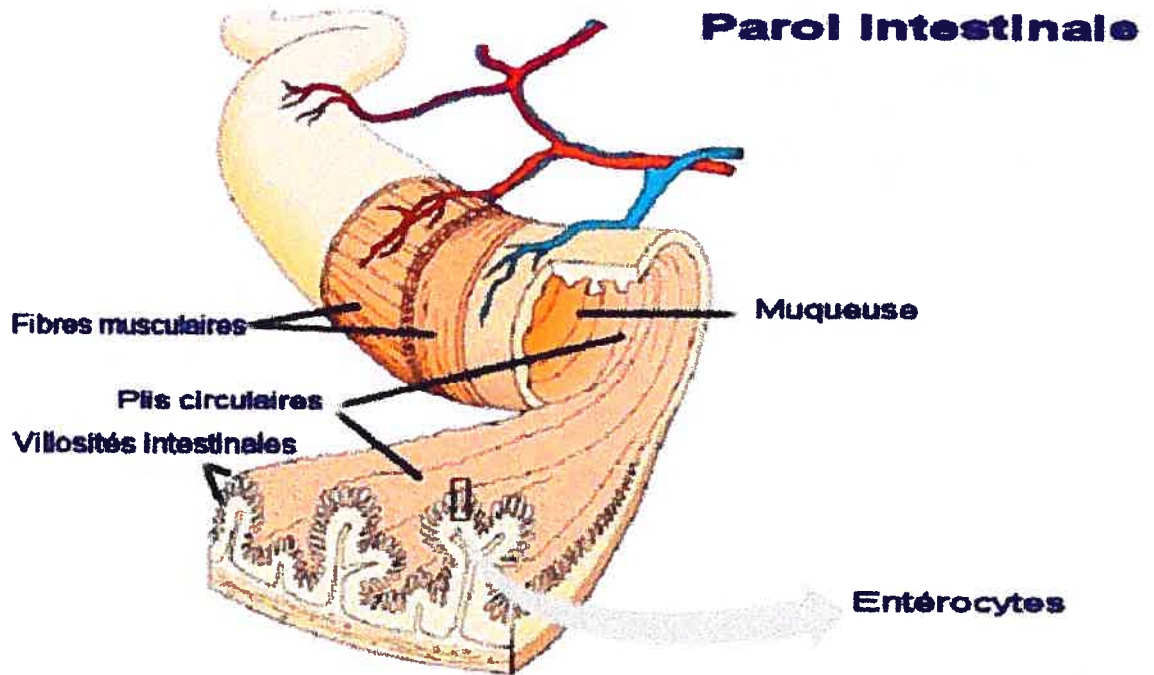


Fig. 1

L'épithélium intestinal est caractérisé par un taux rapide de prolifération et par une différenciation continue. Du point de vue histologique, il est constitué d'un épithélium en monocouche qui, grâce aux jonctions serrées intercellulaires, forme une barrière étanche entre la lumière et le reste de l'organisme. Les cellules épithéliales transportent les produits de la digestion vers la lamina propria, la couche conjonctivo-vasculaire sous-jacente. Les produits de la digestion sont ainsi déversés dans les capillaires veineux ou dans les vaisseaux lymphatiques. Les cryptes et les villosités constituent les unités de base structurales et fonctionnelles de l'intestin. Les entérocytes sont des cellules polarisées dont les deux pôles exercent des fonctions différentes : le côté apical est spécialisé dans l'absorption des produits de la digestion et le pôle basolatéral dans les échanges entre la cellule et le système circulatoire.

À la base des cryptes, on retrouve des cellules souches qui, par divisions successives et par maturation (turnover rapide de 3-4 jours), maintiennent l'intégrité et la fonctionnalité de l'intestin. Ces cellules assurent l'apparition des quatre principaux types de cellules de l'épithélium : les entérocytes ou cellules absorbantes, les cellules sécrétant le mucus, les cellules entéro-endocriniennes et les cellules Paneth du système immunitaire. Les cellules ayant migré à la base des villosités débutent leur différenciation cellulaire. Les entérocytes, les cellules les plus abondantes et les plus importantes d'un point de vue fonctionnel, expriment une variété de gènes qui les rendent capables de digérer et d'absorber une multitude des

nutriments. Par l'expression de ces gènes, une cellule mature peut synthétiser plusieurs enzymes, principalement au niveau de la bordure en brosse, comme les disaccharidases, les peptidases, les phosphatases alcalines, etc. Elles expriment aussi une large gamme de protéines de transport. Même au niveau de l'expression de ces gènes, on remarque une distinction spatiale complexe à partir du duodénum jusqu'au jéjunum. Ainsi, beaucoup de gènes entérocytaires s'expriment largement au niveau proximal, mais leur expression diminue au niveau distal de l'intestin, où d'autres gènes sont exprimés pour jouer d'autres rôles (1,2).

## 1.2. Digestion et absorption des lipides

### 1.2.1 Source des lipides.

L'intestin fait partie intégrale du tractus digestif et assure des fonctions diverses, l'une des plus importantes étant l'absorption des nutriments.

Au cours des dernières décennies, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes complexes qui contrôlent les étapes intestinales du métabolisme lipidique. Ce progrès proviennent entre autres de la recherche dans le domaine des maladies cardiovasculaires et nutritionnelles, recherche qui a permis d'établir un lien entre l'intestin et le métabolisme lipidique.

Les lipides provenant de la diète constituent une source calorique importante, surtout dans les pays occidentaux. En plus des 120-150 g de lipides consommés chaque jour, l'intestin doit aussi assimiler les lipides provenant de la bile et, en petites quantités, les lipides provenant de la desquamation cellulaire et ceux produits par les bactéries de la surface épithéliale. Les lipides alimentaires sont majoritairement constitués de triglycérides à longues chaînes (>14 atomes de carbone) et, en moindres quantités (< 10 g/j), de phospholipides dont le principal est représenté par la lécithine. La source prédominante de la lécithine intraluminaire provient de la bile (10-20 g/j) et des membranes cellulaires. L'apport alimentaire en cholestérol (200 à 500 mg/jour), s'additionne au cholestérol biliaire (1 à 2 g/jour). De plus, les stérols d'origine végétale ( $\beta$ -sitostérol) ou les stérols contenus dans les huiles animales peuvent aussi constituer des sources importantes de lipides alimentaires. Outre ces classes de lipides, on ingère également d'autres molécules complexes comme des cires, des lipovitamines (A, D, E, K) et des produits synthétiques résultant des processus de préparation et de conservation des

aliments (des pesticides potentiellement toxiques, des préservatifs, etc.). L'absorption de toutes ces molécules au niveau intestinal est extrêmement différente en terme d'efficacité absolue, de processus de transformation intracellulaire et de sécrétion (3,4).

### 1.2.2 Digestion des lipides.

La digestion des lipides est un processus complexe faisant intervenir plusieurs étapes. Plus particulièrement, deux processus physico-chimiques, à la fois concomitants et interdépendants, assurent la digestion : l'hydrolyse des différentes classes de lipides et la dispersion des produits de la lipolyse sous forme des micelles.

Tout d'abord, les lipides sont dispersés sur toute la surface de la lumière intestinale afin de permettre une action efficace des enzymes digestives. Cette dispersion ou émulsification est réalisée à l'aide des mouvements produits par le péristaltisme intestinal, qui assurent le contact intime des petites gouttelettes des lipides avec le milieu aqueux luminal contenant les enzymes lipolytiques et les sels biliaires. L'émulsification qui débute dans l'estomac, se poursuit dans le duodénum sous l'action de la bile, un liquide sécrété par le foie riche en sels biliaires, cholestérol et lécithine. Par la suite, sous certaines conditions physico-chimiques (température, pH, etc.), les enzymes entrent en contact avec l'émulsion de lipides stabilisée par la lécithine. La digestion des triglycérides à longues chaînes, des phospholipides et des stérols débute alors, par un processus appelé lipolyse. Ainsi, la lipase pancréatique et son cofacteur, la colipase, la phospholipase et la cholestérol estérase hydrolysent les triglycérides, les phospholipides, les esters de cholestérol, en monoglycérides, lysophosphatidylcholines, cholestérol libre et acides gras.

### 1.2.3 Les micelles.

Par la suite, les produits de lipolyse sont incorporés dans des agrégats de sels et de lécithine biliaire, formant des complexes nommés micelles. Cette étape de formation micellaire est nécessaire pour permettre l'absorption convenable des lipides.

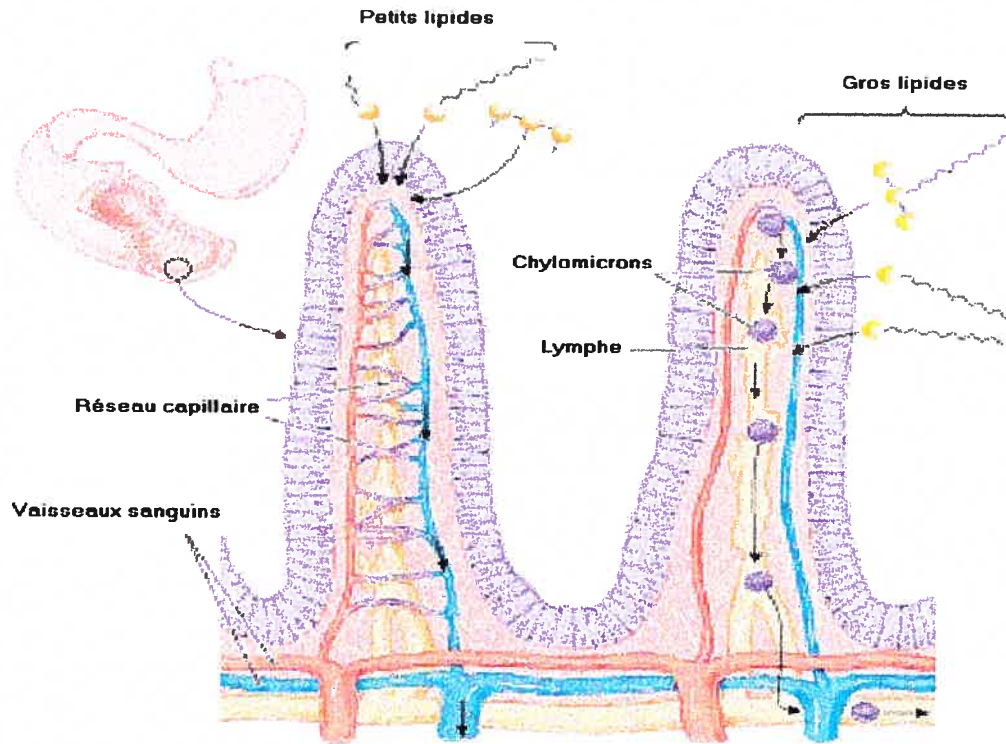
Les sels et la lécithine biliaires possèdent un groupement polaire (hydrosoluble), tandis que la plus grande partie de la molécule reste hautement liposoluble. Cette double

composition permet de diminuer la tension superficielle des lipides. Par conséquent, les lipides sont plus facilement fragmentés par agitation (péristaltisme) dans le milieu aqueux avec les enzymes hydrosolubles. Lors de la formation des micelles, il se produit tout d'abord une étape de formation des savons de calcium qui entourent le noyau de lipides non hydrolysés. Par la suite, sous le contrôle des sels biliaires, il y a la formation des vésicules : les micelles. Après leur formation, elles se présentent comme des produits rugueux multilamellaires et génèrent, suite à l'augmentation continue des sels biliaires dans la lumière intestinale, une multitude de vésicules contenant des petites quantités de produits de lipolyse et des proportions variables de sels biliaires. Ainsi modifiées, ces vésicules sont prêtes à interagir avec la membrane microvillositaire. L'interaction avec les sels biliaires rend ces produits plus hydrophiles et, par conséquent, aptes à interagir avec le milieu aqueux de l'intestin. Le cholestérol, les vitamines liposolubles et les stérols de plantes sont des exemples de lipides qui dépendent critiqueusement de ce mécanisme (3,5).

#### 1.2.4 Absorption des lipides.

Au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte, chaque classe de lipides est transportée d'une manière spécifique dans le cytoplasme. Des protéines spécifiques acheminent les produits de la lipolyse vers le milieu intracellulaire. Ces lipides sont utilisés pour les besoins et les réserves cellulaires et pour la synthèse des lipoprotéines qui sont sécrétés dans la circulation lymphatique ou sanguine (Figure 2).

La plupart des produits lipolytiques absorbés sont transportés du site d'absorption vers le réticulum endoplasmique où se fait la biosynthèse des lipides complexes. La fonction de transport des acides gras à longues chaînes a été attribuée à une protéine de transport intracytoplasmique – le «fatty-acid-binding-protein» (FABP). De plus, au moins deux protéines de transport ont été suggérées d'assurer le transport du cholestérol, soit le SCP-1 et le SCP-2 (sterol carrier protein). Le SCP-2 semble aussi être impliqué plus spécifiquement dans le transport de cholestérol du cytoplasme vers la mitochondrie, mais il pourrait aussi acheminer le cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie où le cholestérol sera métabolisé(5). D'autres fonctions sont aussi attribuées au SCP-2 comme le transport intracellulaire de la lysophosphatidylcholine et des acides gras.



© 1993 Wadsworth Publishing Company/ITP

Figure 2

### 1.2.5 Métabolisme intracellulaire des lipides

Les lipides absorbés peuvent être mis en réserve, utilisés pour le catabolisme ou la synthèse des constituants cellulaires ou, de façon majoritaire, réestérifiées au niveau du réticulum endoplasmique lisse (REL). Ces réactions de réestérification s'effectuent sous l'action d'enzymes spécifiques qui catalysent la formation des triglycérides à partir des 2-monoacylglycérols et des acides gras libres, la réacylation du lyso-PC en phospholipides ainsi que l'estérification du cholestérol libre en esters de cholestérol. Ainsi modifiés, les lipides migrent vers le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Dans la membrane du RER, une protéine spécifique, le «microsomal transfer protein» (MTP), ajoute aux lipides des protéines essentielles à leur transport, les apolipoprotéines. Les pré-lipoprotéines résultantes subissent ensuite un processus de maturation par glycosilation dans l'appareil de Golgi pour être finalement déversées dans la circulation (7,8).

## 2. Les lipoprotéines

Le système circulatoire assure la survie et le bon fonctionnement des cellules en leur fournissant les nutriments, en éliminant les produits résultant du catabolisme cellulaire et en transportant des hormones permettant la coordination métabolique entre les tissus. Le transport intercellulaire des substances est essentiel pour leur fonctionnement et son dérèglement peut conduire à des maladies. Ainsi, l'athérosclérose, qui est la cause majeure des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux et la première cause de mortalité aux États-Unis et au Canada, est en partie causée par les altérations du transport des lipides. Il est généralement reconnu que le cholestérol joue un rôle important dans l'athérogénèse. Dans le milieu aqueux que constitue le système circulatoire, le transport intercellulaire du cholestérol et des autres lipides dépend de la formation de molécules amphipatiques appelées lipoprotéines. La plupart des lipoprotéines contiennent une couche externe de protéines et de phospholipides et un noyau de lipides hydrophobes. On connaît cinq types majeurs de lipoprotéines habituellement classées selon leur densité : les chylomicrons (le principal transporteur des lipides alimentaires), les «very low density lipoprotein» (VLDL) qui sont le principal transporteur des triglycérides hépatiques), les «low density lipoprotein» (LDL), le transporteur du cholestérol du foie vers la périphérie, les «intermediar density lipoprotein» (IDL), les lipoprotéines résultant du métabolisme intermédiaire des VLDL et les «high density lipoprotein» (HDL), le transporteur du cholestérol de la périphérie vers le foie). Ces lipoprotéines se distinguent aussi par leur composition en protéines et en lipides, ainsi que par leur taille et leur rôle physiopathologique (8) (Figure 3 et 4).

La biosynthèse des lipoprotéines est un processus complexe qui fait encore l'objet de nombreuses recherches. Leur métabolisme n'implique pas seulement l'assemblage des apolipoprotéines et des lipides dans les cellules spécialisées, mais aussi des modifications extracellulaires comme le transfert des apoprotéines et des lipides. Par exemple, après leur sécrétion hépatique, les VLDL sont converties en IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire) et éventuellement, en LDL. Ces transformations impliquent un nombre important d'enzymes clés comme la LPL (lipoprotéine lipase) et la lipase hépatique. D'autres enzymes comme le lécithin : «cholestérol acyl transférase» (LCAT) et le «cholesteryl-ester transfer protein»

interviennent dans les échanges entre ces lipoprotéines et les HDL. La plus importante différence fonctionnelle entre les lipoprotéines relative au transport et à la physiologie du cholestérol est leur implication dans le risque relatif de maladie coronarienne. En effet, il y a une corrélation directe du risque avec le taux du LDL-cholestérol et inverse avec le HDL-cholestérol.

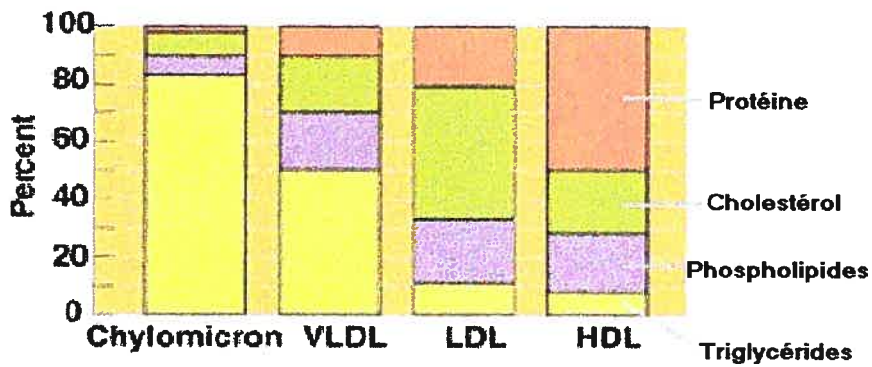
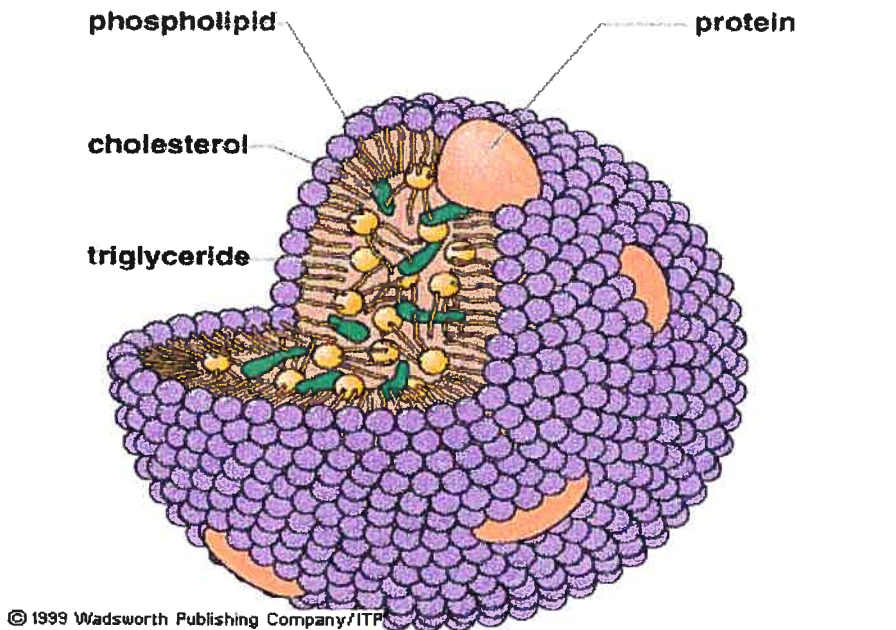


Figure 3

## 2.1 Les chylomicrons

Les chylomicrons sont les lipoprotéines produites par l'intestin après un repas gras. Par conséquent, ils transportent les triglycérides et le cholestérol d'origine alimentaire. En période de jeûne, l'intestin synthétise, à partir des acides gras et des triglycérides circulatoires, des lipoprotéines similaires mais plus petites, les VLDL intestinales (Figure 4).

Les chylomicrons naissants contiennent les apolipoprotéines : l'apo B-48, les apos A-I et A-IV. Dans la circulation, leur composition est enrichie en apos CII et apo E après échange avec les HDL. Ces modifications les rendent sensibles à l'action lipolytique de la lipoprotéine lipase (LPL) présente sur les cellules vasculaires du tissu adipeux, du cœur, et du muscle. L'hydrolyse des TG par la LPL fournit à ces tissus les acides gras nécessaires à leur métabolisme énergétique et, par le fait même, modifie la structure des chylomicrons. Ces lipoprotéines perdent aussi des phospholipides et des apolipoprotéines A-I et C-II qui sont transférées aux HDL. Les particules des chylomicrons résiduelles sont appelées «remnants» qui sont plus petits et insensibles à la LPL. Les remnants sont transportés au foie, où ils sont captés par l'intermédiaire d'un récepteur reconnaissant l'apo E. En résumé, la fonction principale des chylomicrons est d'approvisionner les tissus en triglycérides. Le reste des lipides alimentaires supplémentaires sont surtout acheminés au foie (4)

## 2.2 Les VLDL et les LDL

La majorité des VLDL présents dans la circulation sont assemblés et sécrétés par le foie. Ainsi, ils représentent le principal transporteur des lipides endogènes du foie vers les tissus périphériques. Pour la synthèse des TG et des PL des VLDL, le foie utilise les acides gras produits de novo et provenant de la circulation, soit de la dégradation des lipoprotéines captées. L'assemblage des VLDL au foie est effectué selon les mêmes étapes qu'au niveau intestinal. L'apolipoprotéine principale des VLDL est l'apo B-100. Les VLDL naissants contiennent, outre l'apo B-100 et l'apo E et ils s'enrichissent dans la circulation en Apo C-II provenant des HDL. L'ajout de cette dernière apolipoprotéine rend les VLDL sensibles, tout comme les chylomicrons, à l'action de la LPL. Concomitamment à l'hydrolyse des particules



et au transfert de leurs TG vers les tissus périphériques, la taille des VLDL diminue résultant les IDL qui garde une composition et une densité intermédiaire (1,0069). Les VLDL résiduelles, appauvries en TG, PL et en apo C-II prennent deux chemins différents. D'une part, comme les remnants des chylomicrons, ils sont captés par le foie via le récepteur reconnaissant l'apo E. D'une autre part, près de la moitié est remodelée dans la circulation pour donner naissance aux LDL. Cette transformation se fait par une perte supplémentaire des TG et des PL sous l'action de la lipase hépatique, par un enrichissement en cholestérol et par une perte de l'apo E transférée aux HDL. Le LDL possède un noyau lipidique d'environ 1700 molécules de cholestéryl esters, une mono couche externe de phospholipides et de cholestérol libre ainsi qu'une seule large protéine, l'apo B-100. Malgré cette composition assez homogène, la taille et la densité des LDL peuvent varier largement. Les LDL ainsi formés sont récupérés de façon moins importante par le foie et constituent le principal transporteur du cholestérol endogène vers la périphérie. Les LDL livrent le cholestérol aux cellules périphériques via un récepteur de l'apo B-100 (la seule apoprotéine des LDL) (11).

### 2.3 Les HDL.

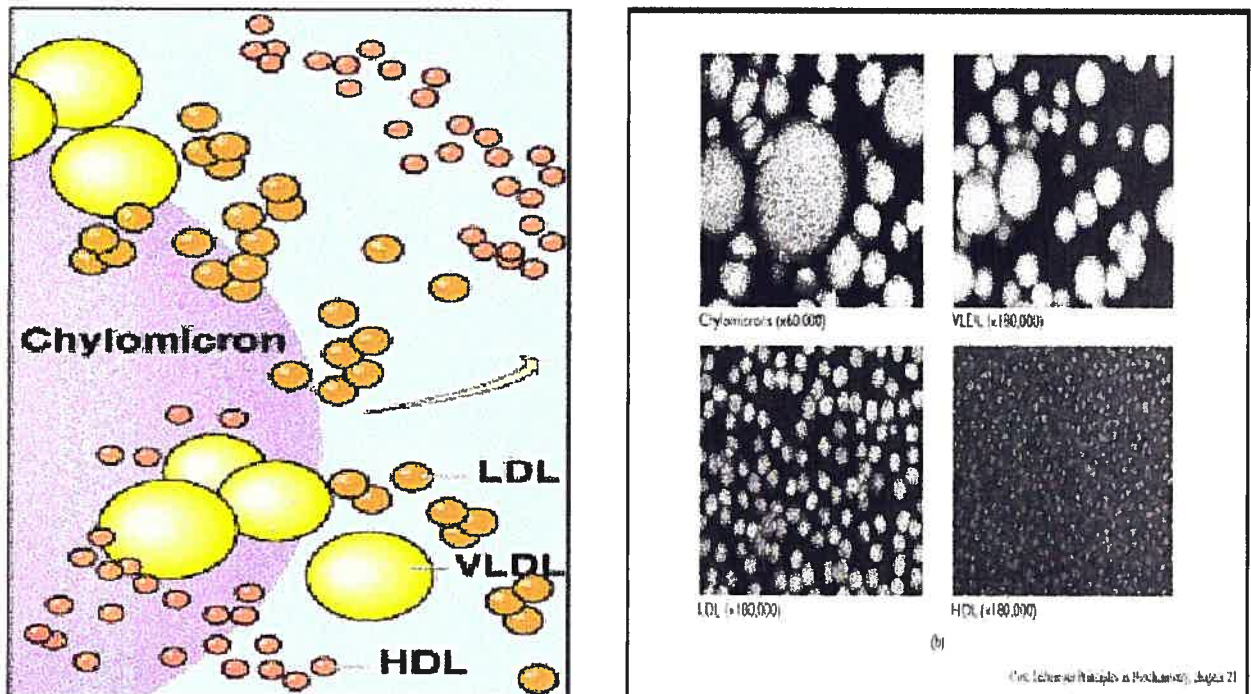
Les HDL sont les particules les plus denses, les plus petites et les plus hétérogènes. Ils sont synthétisés et sécrétés par le foie et l'intestin ou résultent de l'hydrolyse des VLDL et des chylomicrons dans la circulation. Les HDL intestinaux ne contiennent pas d'apo C-II, mais seulement de l'apo A-I. Les apoprotéines produites par le foie comme l'apo A-II et l'apo E, lui seront ajoutées au niveau de la circulation.

Les apolipoprotéines les plus importantes des HDL sont l'apo A-I et l'apo A-II (avec un apport minoritaire de l'apo A-IV, apo C-II, apo E etc.). Les HDL sont divisés en deux larges et interchangeable groupes : les  $\alpha$ -HDL qui sont des particules larges avec un noyau de lipides neutres et les pré- $\beta$ -HDL qui possèdent une faible concentration en lipides neutres. Les HDL constituent des donneurs d'apo C-II et d'apo E qui sont nécessaires au métabolisme des chylomicrons et des VLDL en circulation.

Les HDL synthétisés de novo ont une forme de disque et sont constitués des phospholipides, de l'apolipoprotéine A-I à la surface et du cholestérol libre capté à partir des différentes cellules. Dans la circulation, ces particules sont remodelées sous l'action de la

«lécithine cholestérol acyl transférase» (LCAT) qui catalyse la conversion des PL-lysolécithine et du cholestérol libre en esters de cholestérol. Cette modification de la composition entraîne des changements au niveau de la conformation de la particule puisque les esters de cholestérol s'agglomèrent au centre et que la lysolécithine est captée par l'albumine plasmatique. Cette réaction continue jusqu'à la formation d'une particule sphérique, enrichie en esters de cholestérol. Ces esters de cholestérol s'accumulent au centre de la particule et repoussent les lipides polaires et les apolipoprotéines vers la surface. Les particules les plus petites sont appelées HDL<sub>3</sub> et les plus volumineuses HDL<sub>2</sub>. Ainsi formés, les HDL peuvent livrer les esters de cholestérol, soit aux autres lipoprotéines circulantes par l'intermédiaire du «cholesterol esters transfer protein» (CETP) ou directement à certains tissus. Le transfert dans la circulation se fait donc vers les chylomicrons, les VLDL et les LDL. Les tissus cibles pour la livraison des esters de cholestérol sont principalement le foie et les glandes de synthèse des hormones stéroïdiennes (9,10). Ainsi, le système HDL-LCAT est engagé dans le transport du cholestérol non estérifié en excès dans les lipoprotéines et dans les tissus (Figure 5).

**Figure 4**



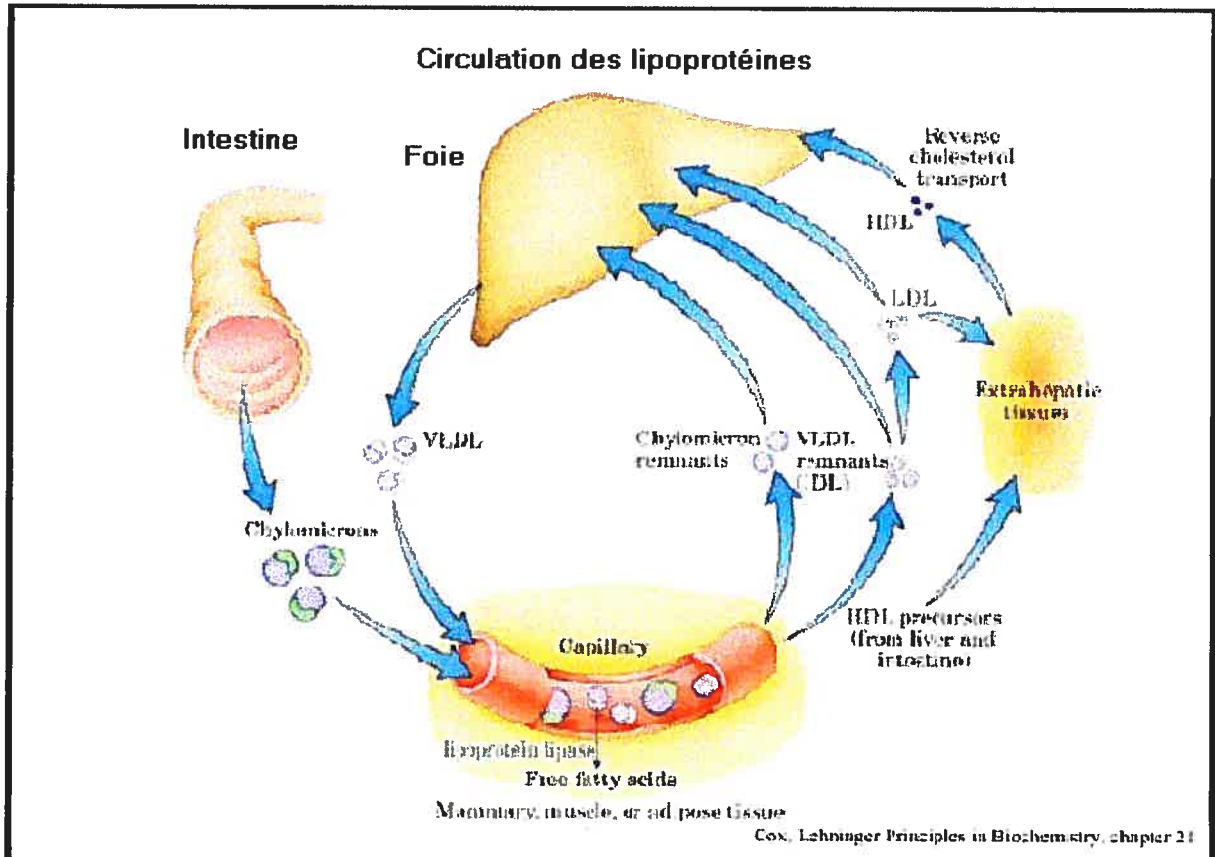


Figure 5

### 3. Le cholestérol : lipide d'importance physiologique et patho-physiologique

Bien que le cholestérol constitue un élément structural pour les membranes cellulaires, la grande majorité est en transit dans le sang. Le cholestérol est transporté dans des lipoprotéines, notamment par les LDL du foie vers la périphérie et par les HDL de la périphérie vers le foie. Il est utilisé pour la synthèse de différents composés comme les acides biliaires dans le foie, les hormones stéroïdiennes dans certains tissus endocriniens et la vitamine D dans la peau.

### 3.1 Cholestérol intestinal.

Le pool de cholestérol intestinal provient essentiellement de trois sources, soit le cholestérol exogène dérivé de la diète, le cholestérol contenu dans les cellules épithéliales descuamées et le cholestérol endogène originaire de la bile. Par ailleurs, les lipoprotéines plasmatiques ravitaillent les entérocytes en cholestérol, cellules qui sont d'ailleurs capables de synthèse endogène. Il existe un équilibre entre l'absorption de cholestérol médiée par des récepteurs protéiques membranaires et son expulsion vers la lumière intestinale via un transporteur appartenant à la famille des transporteurs «ATP-binding-cassette» (ABC). Cette voie de transport vers la lumière intestinale a pour rôle de protéger l'organisme des effets néfastes d'une surcharge en cholestérol.

Le cholestérol entrant dans la cellule via le pôle apical ne se mélange pratiquement pas avec le pool de cholestérol libre de la cellule. Le cholestérol absorbé est préférentiellement estérifié afin d'être incorporé dans les lipoprotéines intestinales riches en triglycérides, les chylomicrons et les VLDL. Ainsi, le cholestérol provenant de la lumière intestinale et dérivé de la diète ou de la bile est principalement véhiculé comme cholestérol estérifié dans le système lymphatique. Les deux enzymes impliquées dans le processus d'estérification du cholestérol sont la «cholesterol esterase» et l'«acyl-CoA cholesterol transferase» (ACAT). Après leur estérification, les esters de cholestérol, tout comme les autres lipides, sont incorporés dans les lipoprotéines intestinales au niveau du réticulum endoplasmique. Par la suite, ils entrent en circulation, ce qui leur permettra d'être captés par différents tissus, surtout par le foie (11,13,14).

### 3.2 Cholestérol hépatique.

Au niveau hépatique, le cholestérol est capté via le récepteur apo E lorsqu'il est transporté par les résidus de chylomicrons ou via le récepteur apo B-100 lorsqu'il est transporté par les LDL. Même au niveau du foie, il y a une différence de métabolisme entre les sources de cholestérol. Le cholestérol contenu dans les résidus de chylomicrons est majoritairement sécrété dans la bile via un transporteur ABC. Par contre, le cholestérol livré par les LDL et les

HDL est, soit estérifié et stocké dans les hépatocytes, soit incorporé dans les VLDL hépatiques afin d'être redistribué aux tissus périphériques ou utilisé pour la synthèse des acides biliaires.

### 3.3 Synthèse endogène de cholestérol

Chez l'adulte, le pool total de cholestérol (intracellulaire et sanguin) reste presque toujours constant. Toutefois, on note des différences intra-individuelles selon la période de la vie. Ainsi, à l'âge adulte, le taux de synthèse de cholestérol est diminué par rapport à celui retrouvé lors de la croissance, période durant laquelle les besoins en cholestérol sont accrus pour permettre la croissance cellulaire, la synthèse hormonale et la formation des membranes. Le réticulum endoplasmique de chaque cellule, à l'exception des érythrocytes, possède les enzymes nécessaires à la synthèse du cholestérol. Comme les acides gras, le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA et la HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante de ce processus. Le cholestérol synthétisé est utilisé par les cellules de la périphérie pour combler leurs propres besoins. Par contre, plus de 60% du cholestérol produit par le foie est exporté dans les LDL vers les tissus afin d'augmenter leur pool de cholestérol (5,11).

### 3.4 Le transport du cholestérol via le récepteur LDL et le transport endocytaire

Majoritairement retrouvé au niveau hépatique, le récepteur LDL est localisé dans des puits couverts de la membrane cellulaire. Ce récepteur reconnaît la particule de LDL avec une haute affinité et spécificité. Après la liaison, le complexe ainsi formé est internalisé via ces domaines membranaires qui se transforment en vésicules, puis en endosomes. Le pH acide à l'intérieur de ces endosomes permet la dissociation du LDL de son récepteur qui, ainsi libéré, retourne à la surface de la cellule puis dans la circulation pour reprendre le transport. Une fois dissociée de son récepteur, la particule de LDL est captée par les lysosomes et subit une hydrolyse enzymatique lui permettant de libérer son noyau de cholestérol. Ce processus d'internalisation de la particule entière est nommé «receptor mediated endocytosis», phénomène très différent du transport facilité qui caractérise le récepteur des particules HDL (11,79) (Figure 6).

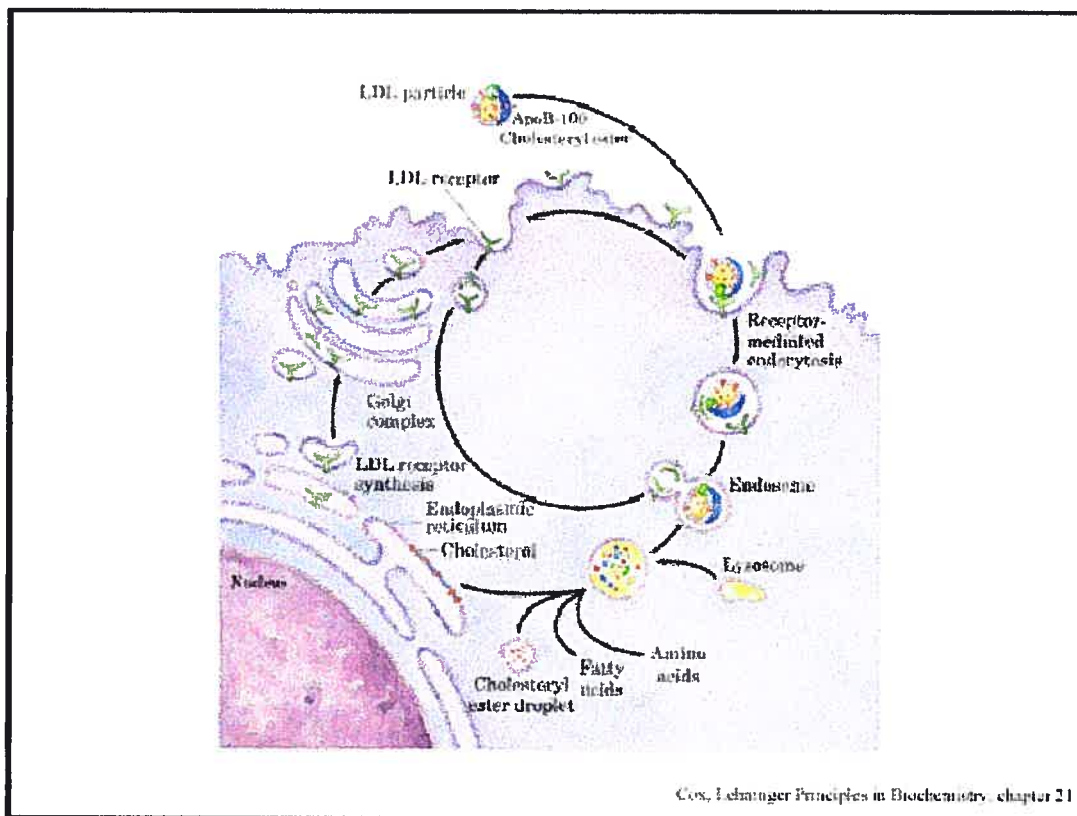


Figure 6

### 3.5 Le transport inverse du cholestérol et les HDL

Le cholestérol est capté des divers tissus via les isoformes du transporteur ABC et véhiculé vers le foie et certains tissus sous forme des particules HDL. Le HDL-cholestérol est transféré aux autres lipoprotéines de la circulation ou transféré au foie et aux certains tissus l'utilisant pour la synthèse des hormones stéroïdiennes.

Le cholestérol, un constituant membranaire essentiel, peut devenir nocif lorsqu'il s'accumule dans la cellule. Par conséquent, ses niveaux cellulaires sont très bien contrôlés par sa synthèse, par la captation du LDL-cholestérol et par son estérification. Les processus de synthèse et d'estérification impliquent deux enzymes régulatrices : la HMG-CoA réductase qui produit le cholestérol et la ACAT qui l'estérifie. Pour sa part, la captation du LDL-cholestérol est limitée par l'expression variable de son récepteur au niveau membranaire. Seulement un

nombre restreint de cellules n'ont pas la capacité de se prévaloir de ces mécanismes afin de se défendre contre une surcharge de cholestérol

Les plaques d'athéromes contiennent des macrophages pouvant incorporer de grandes quantités d'esters de cholestérol, formant ainsi les cellules spumeuses bourrées d'esters de cholestérol. Toutefois, par un transport inverse, ces macrophages peuvent transférer leur cholestérol à un accepteur comme le l'apo A-I et l'apo E formant des HDL. À son tour, l'apo E, sous l'influence de la LCAT, transforme les particules HDL naissantes en particules riches en cholestérol. Lors du transport inverse du cholestérol, les HDL représentent donc des facteurs importants dans le transfert du cholestérol des tissus vers le foie.

Des particules discoïdales, possédant un petit noyau faible en lipides neutres et secrétées par le foie et l'intestin, sont à l'origine d'une partie des particules HDL. Pour certaines maladies génétiques rares, les niveaux pathologiques de HDL plasmatiques résultent d'une altération de leur synthèse, mais dans la majorité des cas, le transport et le métabolisme du HDL est le principal mécanisme contrôlant les concentrations de HDL et d'Apo A-I. Les particules HDL fonctionnent comme une navette permettant le transfert du cholestérol entre les cellules et les différentes classes de lipoprotéines. Dans une première étape, les HDL captent le cholestérol libre des tissus périphériques. Dans le plasma, le cholestérol transporté dans les HDL est estérifié par la LCAT «lecithine cholesterol acyl transferase». Par la suite, les particules de HDL transfèrent les esters de cholestérol aux cellules cibles ou, sous l'action du CETP ( la protéine de transfert des esters de cholestérol), à d'autres classes de lipoprotéines. Les principaux tissus cibles des HDL sont le foie et les tissus de synthèse des hormones stéroïdiennes. Les esters de cholestérol acheminés au foie permettent la synthèse des acides biliaires ainsi que l'assemblage des VLDL (9,10,15).

Ce type de transport de la périphérie vers les organes responsables du métabolisme du cholestérol est appelé le transport inverse du cholestérol. Par ce transport, on attribue aux HDL un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol et dans la protection contre l'athérosclérose (Figure 7).

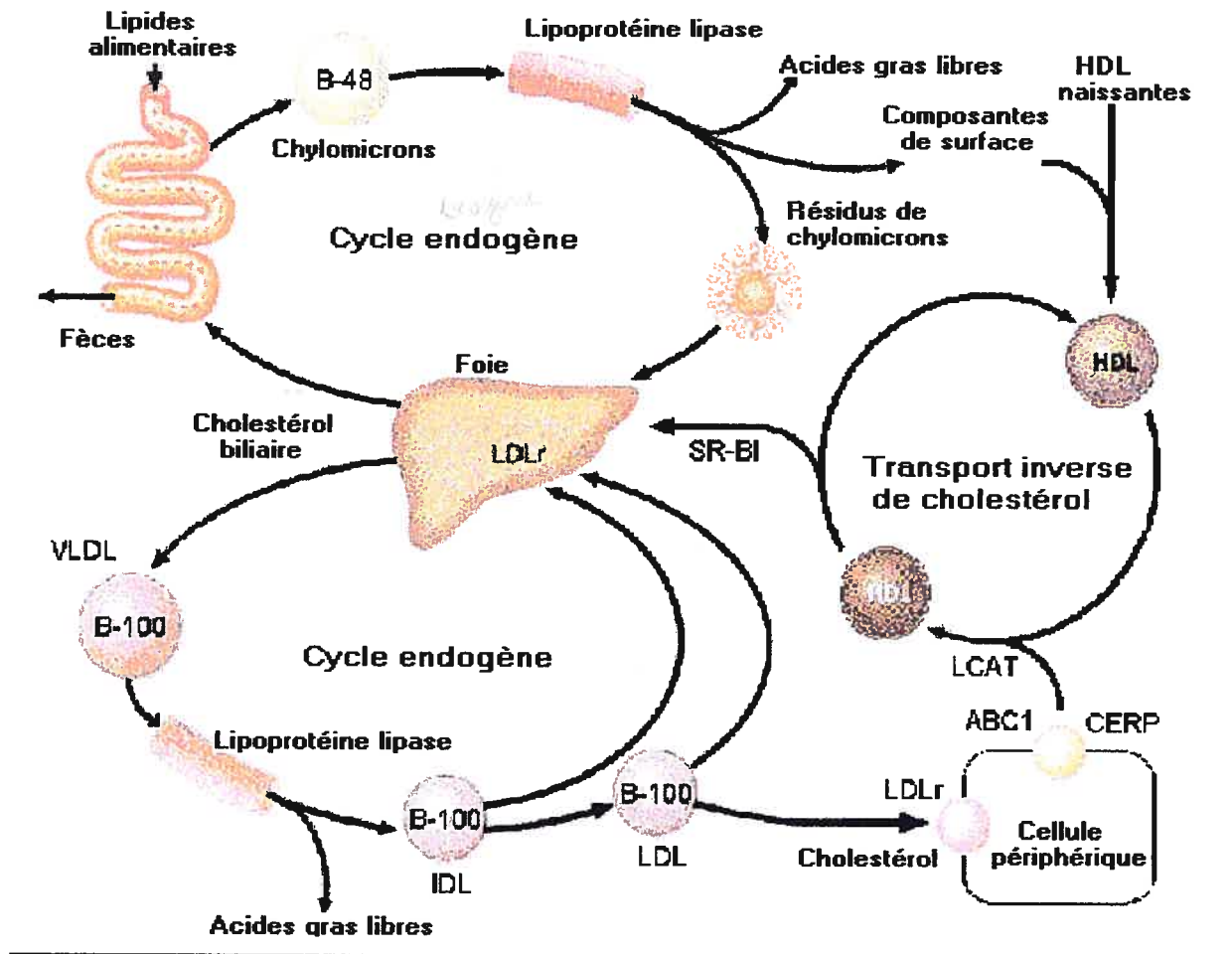


Figure 7

### 3.6 Le transport facilité du HDL-cholestérol.

Des études in vitro et in vivo effectuées chez les rongeurs et chez l'homme ont établi que le mécanisme principal des récepteurs HDL est fondamentalement différent de celui des récepteurs LDL. Le récepteur des LDL reconnaît et lie l'apo B-100. Le complexe formé par le récepteur LDL et le cholestérol est ensuite englobé dans une vésicule d'endocytose. De leur côté, les HDL se lient à leur récepteur à la surface de la cellule et transfèrent dans le cytoplasme uniquement les esters de cholestérol. La particule de HDL ainsi appauvrie en cholestérol se détache de son récepteur et retourne à la circulation. Ce mécanisme d'influx de cholestérol est appelé le «transport sélectif facilité» et peut être modulé par la lipase hépatique et la



lipoprotéine lipase qui modifient la composition de la particule de HDL et par conséquent l'efficacité de ce transport (46,54).

Par analogie avec le système du LDL - transport de cholestérol vers la périphérie, l'élément clé qui manquait pour démontrer le transport inverse vers le foie et ensuite vers la cellule dans le cas des HDL, était un récepteur qui serait impliqué dans le transfert bidirectionnel du cholestérol HDL. Des études récentes viennent d'identifier et de caractériser ce récepteur, le «scavenger receptor BI» (SR-BI) (30,33,35).

### 3.7 Modèles «in vitro» des entérocytes.

L'épithélium intestinal est un tissu hautement spécialisé qui se renouvelle rapidement et continuellement grâce à un processus qui implique la génération des nouvelles cellules souches ainsi que la migration et la différenciation de ces cellules vers la surface de la villosité. L'impossibilité de cultiver les cellules intestinales matures a poussé la recherche à trouver des modèles fiables pour les diverses études de transport et de métabolisme cellulaire. Ainsi, la plupart des études sur l'entérocyte ont été conduites soit sur des modèles animaux, soit sur des cellules provenant des carcinomes coliques humains dont l'utilité et les limitations sont bien documentés. D'une part, une très importante contrainte des modèles animaux est le fait que les résultats obtenus ne sont pas toujours transposables aux humains. De l'autre côté, même si les cellules tumorales humaines ont permis l'étude des diverses fonctions et régulations de l'entérocyte, ces cellules, notamment la clone CaCo-2 qui est la plus utilisée, démontrent une grande hétérogénéité de la différenciation d'un passage à l'autre et même dans le cadre d'une seule culture. En plus, leur origine colique les rend impropres aux certaines études du métabolisme ou du transport cellulaire. Dans ce sens, divers sous-clones de la lignée cellulaire CaCo-2 ont été développés pour cibler plus spécifiquement certaines fonctions cellulaires.

## **4. Identification et caractérisation du SR-BI comme récepteur des HDL.**

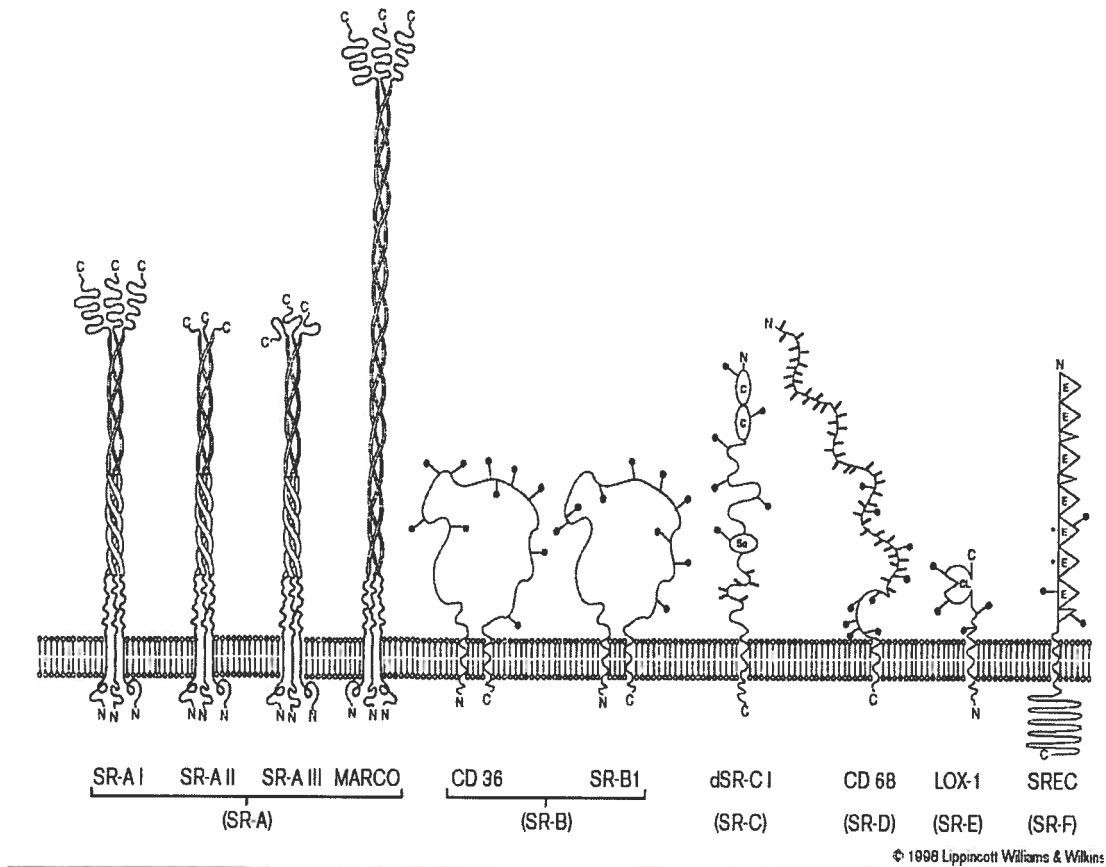
### **4.1 La superfamille des récepteurs scavenger.**

Des études visant à découvrir et caractériser les récepteurs scavenger ont permis d'identifier le SR-BI. La superfamille des récepteurs scavengers est constituée de protéines situées à la surface des membranes cellulaires qui facilitent la liaison des particules de LDL modifiés, comme les LDL acétylés ou oxydés. L'activité des récepteurs scavenger a été décrite pour la première fois dans les macrophages par l'équipe de Brown et Goldstein (79). Leurs études ont conduit à un modèle de récepteurs scavenger associés aux macrophages qui seraient impliqués dans le processus d'athérogénèse. En opposition aux récepteurs des LDL, l'activité des récepteurs scavenger n'est pas modulée par le pool de cholestérol intracellulaire. Par conséquent, les récepteurs scavenger des macrophages peuvent importer des quantités importantes de cholestérol et d'esters de cholestérol dans la cellule, ce qui conduit à la formation de la cellule spumeuse engorgée de lipides. D'autre part, l'incubation de ces macrophages modifiés avec des accepteurs de cholestérol comme les HDL ou le sérum, conduit à un efflux du cholestérol des cellules vers ces accepteurs, ce qui pourrait expliquer l'effet cardio-protecteur des HDL.

### **4.2 Nomenclature.**

Les récepteurs scavenger qui possèdent une structure similaire (définie par les comparaisons des séquences) sont groupés dans des classes identifiées par une lettre majuscule (classe A, B, etc.). Dans une même classe, chaque récepteur ou type de récepteur est identifié par un chiffre romain. Par exemple, les premiers récepteurs des macrophages décrits au niveau moléculaire ont été désignés comme le SR-AI et le SR-AII. Dans une même classe, les différents types de récepteurs sont soit des produits de clivage d'ARN provenant d'un seul gène (SR-AI et SR-AII, SR-BI et SR-BII), soit des produits codés par deux gènes différents (SR-CI et SR-CII). De plus, des activités de type récepteur scavenger ont récemment été décrites pour certaines protéines connues. Ces protéines ont alors été incluses dans cette superfamille, comme le CD36 qui a été intégré dans la classe B et le MARCO I dans la classe A. (Figure 8) (18,19,20).

Figure 8



#### 4.3 Le SR-BI : Ligands et fonctions dérivées.

Peu après la découverte de la fonction de récepteur scavenger du CD36, un nouveau type de récepteur de la même classe a été identifié chez le hamster, soit le récepteur scavenger B. Initialement, le SR-BI humain, localisé sur le chromosome 12, était nommé CLA-1 et sa fonction était inconnue. Il est maintenant connu que le SR-BI humain est exprimé d'une manière spécifique dans certains tissus et que ses fonctions sont conservées entre les autres espèces.

Même si la plupart des études portent principalement sur le rôle du SR-BI dans le métabolisme du cholestérol, il s'agit toutefois d'un récepteur à ligands multiples dont les spécificités de liaison sont différentes de celles des classes A ou C. Ainsi, il semble que le SR-BI est le seul récepteur scavenger qui se lie avec une haute affinité aux HDL et aux LDL naissants, mais comme le CD36 ou les récepteurs scavenger de la classe A, il reconnaît les LDL

modifiés (acétylés ou oxydés), l'albumine sérique maleiylée, l'amyloïde  $\beta$  fibrillaire et les phospholipides anioniques (19,52,55). Par contre, en opposition avec les récepteurs scavenger de la classe A, la liaison de tous ces ligands n'est pas inhibée par la fucoïdine et par la chondroïtine sulfatée.

De plus, une étude récente décrit le SR-BI comme un nouveau récepteur candidat à la liaison du virus de la hépatite C (Scalelli et al. 2002) (49).

Ce potentiel de liaison implique le SR-BI dans la reconnaissance des cellules sénescents ou apoptotiques, ce qui a été démontré par des études *in vitro* (19,34,49). On ignore toutefois la signification physiologique de la propriété de liaison aux LDL modifiés. De plus, le SR-BI constitue aussi un récepteur des VLDL et des LDL. Effectivement, le rôle du SR-BI dans l'influx du cholestérol via le LDL est décrit dans la littérature, même si l'activité de liaison avec le LDL est largement inférieure à celle avec le HDL. De plus, le SR-BI lie et transporte moins efficacement les LDL que les récepteurs classiques des LDL (30,33,37).

#### 4.4 SR-BI : Structure et localisation sous-cellulaire

La séquence de 509 acides aminés de la protéine SR-BI humaine partage une identité d'environ 75 à 80% avec celle du hamster, du singe, du rat et des bovins. Il fait partie de la superfamille des protéines CD36 qui inclut également le LIMPII (une protéine lysosomale), deux protéines de *Drosophila melanogaster* (emp144 et 145) et le SnmP-1 (une protéine de la membrane des neurones olfactifs).

Le SR-BI (509 acides aminés) et le CD36 (472 acides aminés) sont aussi des récepteurs scavengers de type B, c'est à dire que les deux lient des lipoprotéines modifiées. Les membres de la superfamille CD36, dont 30% de leur séquence est analogue, partagent aussi des similarités au niveau de leur topologie membranaire (Figure 9) (18,35,45). Leur structure comporte une large boucle extracellulaire (~403 aminoacides) ancrée dans la membrane plasmique par deux domaines trans-membranaires ( de 28 et 25 résidus), sous-jacents à deux courts domaines N-terminal (~8 résidus) et C terminal (~45 résidus) intra-cytoplasmiques.

Les domaines extracellulaires du SR-BI et du CD36 possèdent des séquences similaires, y compris les 5 ou 6 molécules de cystéine et les multiples sites de N- glycosylation. Par contre, les domaines transmembranaires ainsi que les parties N-terminale et C-terminale

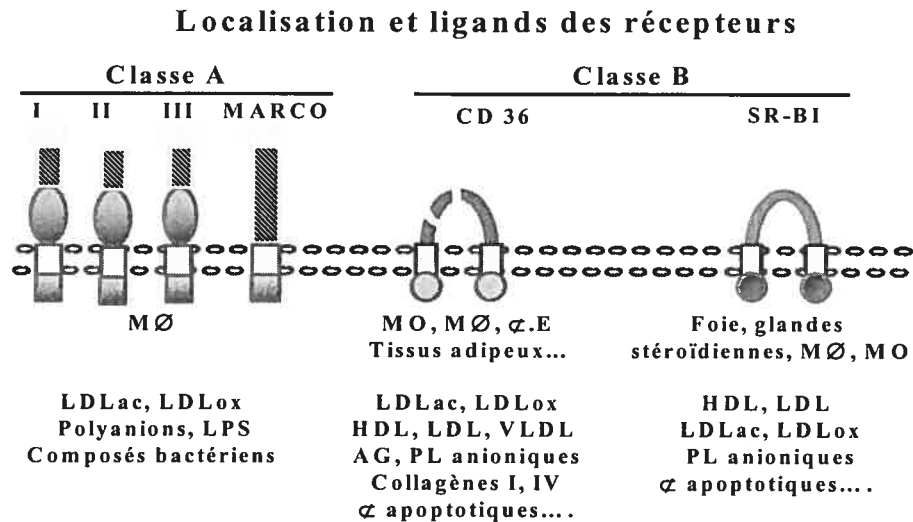
intracellulaires sont tout à fait différents. Pour les deux récepteurs, des protéines originaires du clivage de la même molécule d'ARNm, comme le SR-BI et BII, s'expriment de façon préférentielle dans certains tissus. Par exemple, le foie et la glande surrénale expriment exclusivement l'isoforme SR-BI, tandis que les cellules Leyding, responsables de la synthèse des androgènes testiculaires, n'expriment que l'isoforme SR-BII (20).

Le SR-BI de la souris (mSR-BI) est fortement N-glycosylé et cette glycosylation est responsable de la différence entre la masse protéique prévue par la séquence en acides aminés (57 kDa) et celle retrouvée lors des études d'immunocytochimie (82 kDa). La glycosylation du mSR-BI s'effectue au niveau traductionnel dans au moins 5 de ses 10 chaînes N-liées à des oligosaccharides de type mannose. Ces modifications se poursuivent en partie lors du passage de la protéine dans l'appareil de Golgi.

Les marquages métaboliques avec le [<sup>3</sup>H]-myristate et le [<sup>3</sup>H]-palmitate ont montré que le SR-BI est acylé avec des acides gras, tout comme les sont le CD36 et les autres protéines qui se trouvent essentiellement dans des micro-domaines membranaires spécialisés dans le transport des lipides : les cavéoles (16,50). D'autres études ont établi les sites majeurs d'acylation au niveau de l'extrémité C-terminale des cystéines en position 462 et 470 de l'anse extracellulaire. De plus, ces cystéines sont plus sensibles au processus d'acylation par rapport aux sites potentiels d'acylation au niveau N et C terminal.

Afin de mieux caractériser et localiser le SR-BI, des analyses par gradient de fractionnement des membranes plasmiques ont été effectuées. La copurification des deux protéines a permis de démontrer qu'il existe une liaison entre le SR-BI et la cavéoline-1, une protéine des cavéoles. Par la suite, les études d'immunofluorescence ont mis en évidence la colocalisation du SR-BI et de la cavéoline-1 dans des microdomaines situés à la surface des cellules. Ces microdomaines qui, comme les caveoles, ont une structure et une composition lipidique différente du reste de la membrane cellulaire, sont reconnus pour leur rôle dans le transport des lipides. Ces données démontrent le rôle critique de l'association entre le SR-BI et les domaines riches en cholestérol et en sphingomyéline de la membrane cellulaire dans le transport des lipides (74,75,76). Le SR-BII, un isoforme du SR-BI dans lequel 42 des 45 résidus du domaine C-terminal sont substitués par 40 résidus codés par un exon distinct, se trouve aussi au niveau des cavéoles (76). Finalement, des études in vivo ont mis en évidence la localisation du SR-BI au niveau de la surface cellulaire, soit dans des structures de type microvillaires ressemblant

aux canalicules intercellulaires des cellules parenchymateuses du cortex surrénalien et du corpus lutéal ovarien.



**Figure 9**

#### 4.5 Le SR-BI : médiateur de la liaison des HDL

Les analyses de l'activité de liaison, effectuées dans des lignées cellulaires transfectées surexprimant le SR-BI, ont montré qu'il peut lier les HDL avec une haute affinité et d'une manière saturable ( $k_d \sim 20-30 \mu\text{g}$  de protéine/ml). Des études effectuées avec les apo A-I, A-II et C-II dans des préparations avec et sans phospholipides et/ou cholestérol, ont révélé que chacune de ces apolipoprotéines peut se lier avec le SR-BI (27,31,44). En plus, contrairement au récepteur des LDL, ce processus est indépendant de l'EDTA et de l'Apo E (48,54,55). Des études parallèles ont ajouté à la fonction principale du SR-BI d'autres rôles secondaires. Ainsi, le SR-BI permet de faciliter l'influx cellulaire des LDL via un transport sélectif dans les cellules, ce qui influence le métabolisme des lipoprotéines contenant l'Apo B (53,55). En considérant que le SR-BI reconnaît aussi les lipoprotéines contenant l'Apo B, il est fort probable qu'il soit responsable, du moins en partie, de l'activité de transport intracellulaire de ces lipoprotéines pour une large variété de cellules et tissus (33,37,42). Il est aussi à noter que les HDL compétitionnent efficacement avec les LDL naissants pour les sites de liaison du SR-BI, un phénomène compétitif non réciproque (30,36,37).

On croit aussi que le SR-BI exerce une fonction régulatrice de l'absorption intestinale du cholestérol (71) et du métabolisme intracellulaire du cholestérol (39,40). On suggère aussi qu'il est également impliqué dans le développement des ovocytes et de la fertilité féminine (47). Son rôle dans la «clairance» des cellules apoptotiques est aussi étudié (17,34). Finalement, des évidences s'accumulent en faveur de l'implication du SR-BI dans le processus de remodelisation des membranes cellulaires et dans la régulation des pools de cholestérol membranaire (13,40,46).

#### 4.6 Le SR-BI et le transport facilité des lipides

Même si plusieurs aspects du mécanisme moléculaire du transport facilité utilisé par le SR-BI ne sont pas encore complètement élucidés, quelques théories ont été proposées. Avant la découverte du SR-BI, on savait que le transport facilité du HDL-cholestérol vers les cellules se faisait à travers une étape intermédiaire de transfert dans la membrane plasmique. Il semble que le SR-BI agisse justement de cette façon. Un premier modèle propose que le transport facilité ne nécessite qu'un rapprochement de la lipoprotéine à proximité de la membrane afin que le transfert puisse avoir lieu, et ce sans aucune intervention de type mécanique de la part du récepteur. Ce rapprochement faciliterait l'interaction entre les lipides des particules lipoprotéiques et la couche lipidique de la membrane et, par la suite, le transfert des lipides vers le cytosol. L'efficacité de ce processus serait donc dépendant de la composition lipidique des lipoprotéines et de la membrane.

Un autre modèle propose un mécanisme par lequel les HDL, et plus précisément leurs noyaux hydrophobes constitués de cholestérol ester et de triglycérides, forment un canal dans la couche lipidique membranaire, ce qui permet le transfert des lipides (25,26). En 2001, l'équipe de Silver et Tall a élaboré une nouvelle théorie postulant que toute la lipoprotéine est internalisée dans un compartiment endosomal péri-membranaire dans lequel les lipides sont libérés. La particule restante (l'apolipoprotéine) retournerait à la surface via le même récepteur (31). Cette étude émet l'hypothèse que le SR-BI serait, du moins dans le foie, un récepteur de type endocytaire. Selon cette nouvelle théorie, le SR-BI, tout comme le récepteur des LDL, incorporerait entièrement la particule de HDL dans une vésicule d'endocytose. Le cholestérol serait à son tour sécrété dans le canalicule biliaire (du côté apical) via l'ABC1 ou le SR-BI. Le

SR-BI serait par la suite transporté à travers la cellule dans un processus de rétro-endocytose. Selon cette théorie, les apolipoprotéines dissociées, ne seraient pas métabolisées, mais resécrétées dans la circulation (du côté basolatéral des hépatocytes) afin de reprendre le circuit du transport inverse. Un autre modèle propose que le récepteur SR-BI soit directement et spécifiquement impliqué dans le transfert des lipides. Cette fonction de transport serait donc indépendante de la fonction de liaison spécifique aux molécules de HDL (25).

Cette controverse quant au rôle du SR-BI dans le transport facilité des lipides a pu être en partie tranchée par des études comparatives entre le SR-BI et le CD36. Le CD36 humain démontre des similarités avec le SR-BI, non seulement par leur séquence d'acides aminés et par leur localisation sub-cellulaire, mais surtout par leur capacité de liaison à haute affinité des HDL, dans des régions spécifiques de la surface cellulaire. Toutefois, le CD36 ne peut pas faciliter le transfert des lipides avec la même efficacité que le SR-BI. Par conséquent, la haute affinité de liaison est une propriété importante, mais non suffisante, pour le fonctionnement optimal du transport facilité. L'analyse des mutations ponctuelles du SR-BI et du CD36 suggère que cette capacité distinctive du SR-BI de faciliter le transfert des lipides est une conséquence directe de la présence de la boucle extracellulaire, mais non des sites d'acylation ou des domaines trans- et intracellulaires. Cependant, une analyse du SR-BII, un isoforme du SR-BI possédant un domaine C-terminal cytoplasmique différent, a démontré que l'efficacité du transport sélectif du SR-BII ne représente que 25% de son homologue. Ainsi, ce domaine C-terminal peut jouer un rôle important dans la fonction du récepteur. Cette constatation a permis d'élaborer une dernière théorie qui propose l'existence d'une protéine cytoplasmique qui se lierait au domaine intracellulaire C-terminal du SR-BI. Cette partie C-terminale agirait comme cofacteur ou comme site de liaison d'une protéine de transport cytoplasmique des lipides et surtout du cholestérol et de ses esters apportés par les HDL (33,35).

Dans le cadre d'études futures, le rôle précis d'une telle protéine de transfert sélectif des lipides reste à déterminer. De plus, le rôle joué par les micro-domaines de la surface cellulaire où se concentre le SR-BI, comme les canaux microvillaires et les cavéoles, devra aussi être éclairci.



#### 4.7 Le SR-BI et l'efflux cellulaire du cholestérol

L'efflux du cholestérol de la cellule vers les HDL est une étape importante du phénomène de transport inverse du cholestérol, de la périphérie vers le foie. Cette étape implique les HDL comme des facteurs de protection cardiovasculaire importants (32,77). Des études de microscopie et des observations effectuées chez la souris surexprimant le SR-BI ont révélé l'implication de ce récepteur dans le processus d'efflux du cholestérol. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences effectuées in vivo démontrant que l'augmentation de l'expression du SR-BI accroît l'efflux du cholestérol (23,29). De plus, le niveau d'expression du SR-BI dans diverses lignées cellulaires non-transfectées est directement corrélé avec le taux d'efflux du cholestérol vers les HDL. Le SR-BI est abondant dans certains tissus, comme les tissus responsables de la synthèse des hormones stéroïdiennes ( la surrénale, l'ovaire, etc.), mais il n'est que faiblement exprimé dans plusieurs autres tissus et cellules, comme les fibroblastes et les macrophages, des cellules jouant un rôle important dans l'efflux du cholestérol. (34,41).

Actuellement, l'importance physiologique d'efflux de cholestérol facilité par le SR-BI n'est pas très bien connu. Toutefois, certaines évidences permettent de croire qu'il joue un rôle important dans le transport inverse du cholestérol et dans le processus d'athérogénèse (43).

### **5. L'importance physiologique du SR-BI comme récepteur de HDL**

Trois sortes d'évidences, principalement fondées sur des études in vivo, soutiennent la fonction du SR-BI comme principal récepteur de cholestérol. Elles sont :

5.1 La distribution tissulaire

5.2 La régulation de l'expression du SR-BI

5.3 L'altération de l'expression du SR-BI par des manipulations immunochimiques et génétiques.

## 5.1 La distribution tissulaire

### 5.1.1 Expression chez l'adulte.

Le SR-BI est hautement exprimé dans les tissus principalement impliqués dans le transport inverse du cholestérol-HDL in vivo : le foie, la glande surrénale et les ovaires (21,28). De plus, de faibles niveaux de SR-BI ont été détectés dans l'intestin et dans le testicule et, à un niveau significatif, dans les glandes mammaires des rates gestantes (20,47). La même distribution et densité a ensuite été décrite chez l'humain (40). Finalement, l'expression du SR-BI à un faible niveau a été rapportée, dans d'autres tissus et cellules comme les adipocytes (32), les macrophages (17), les cellules endothéliales (32), les cellules musculaires lisses (20), les kératinocytes (19) et certaines cellules épithéliales (33,52).

L'expression du SR-BI dans la glande surrénale soulève la possibilité que le SR-BI est impliqué dans la reconnaissance du lipopolysaccharide bactérien (LPS) durant la septicémie grave provoquée par des bactéries gramm-négatives. Le HDL est capable de se lier à cette endotoxine et de protéger l'organisme contre l'endoxinémie. Chez les rats, les singes et les lapins, la glande adrénale et le foie sont les principaux sites d'accumulation des HDL liés aux LPS et il semble qu'il y a une corrélation entre cette accumulation, la liaison du HDL et l'expression du SR-BI dans ces tissus. Toutes ces données indiquent que le SR-BI est probablement impliqué dans la distribution tissulaire du LPS et par conséquent dans l'insuffisance aiguë ou les hémorragies notées lors des septicémies graves à des bactéries gramm-négatives.

Bien que des quantités importantes d'ARNm du SR-BI aient été répertoriées dans les adipocytes et dans les cellules pré-adipocytaires 3T3-L1 après l'induction de leur différenciation, seulement une faible quantité de protéine a pu être détectée (32).

Des études d'immunofluorescence et d'immunocytochimie ont montré que le SR-BI est principalement exprimé à la surface des hépatocytes et de certaines cellules parenchymateuses comme celles du zona fasciculata et reticularis de la surrénale, les cellules thécales de l'ovaire non stimulées hormonalement, les cellules du corpus lutéal et les cellules Leydig du testicule (32). Au niveau de la glande surrénale, l'immunofluorescence a permis de démontrer la présence du SR-BI dans des structures ovalaires et circulaires qui semblent être

les sections des canaux intercellulaires riches en microvillosités. Il a été démontré que les HDL s'accumulent dans ces formations qui jouent apparemment un rôle important dans le transport sélectif des lipides.

Dans les tissus qui expriment abondamment le SR-BI, on note un niveau important de lipase hépatique, enzyme dont l'importance est reconnue dans le métabolisme des lipoprotéines. De plus, des altérations des niveaux d'ARNm du SR-BI ont pu être démontrées chez les souris déficientes en lipase hépatique. Par conséquent, il a été proposé que la lipase hépatique et le SR-BI agissent de façon concertée pour permettre le transport facilité des esters de cholestérol contenus dans les HDL. La lipase hépatique pourrait agir sur les phospholipides à la surface des particules HDL, facilitant ainsi le transfert des lipides du noyau vers la cellule, via le récepteur SR-BI. Toutefois, l'utilisation d'anticorps anti-lipase hépatique montre que, même si on assiste à une diminution de l'activité de la lipase, le transport facilité du cholestérol par le SR-BI n'est pas altéré (33).

#### 5.1.2 Expression au cours de l'embryogénèse

Durant la croissance embryonnaire, les lipoprotéines maternelles et la synthèse endogène constituent des sources importantes de cholestérol pour la synthèse des membranes plasmiques et des hormones stéroïdiennes dans les tissus extraembryonnaires.

Bien que l'on ne possède que peu d'informations sur le transport materno-fœtal des lipoprotéines, il est généralement accepté que le placenta et la membrane vitelline jouent un rôle majeur dans le transfert des lipoprotéines de la circulation maternelle à l'embryon. Chez la souris, à 7-8 jours d'embryogénèse, on observe une expression significative du SR-BI dans les cellules endothéliales de la décidue (le tissu vasculaire qui assure le support nutritif de l'embryon avant la formation de placenta), mais une très faible expression dans les tissus embryonnaires et extraembryonnaires. Au jour 8-9, on note parallèlement au développement des structures vasculaires, une augmentation dramatique de l'expression du SR-BI dans les cellules trophoblastiques qui entourent l'embryon. Au 10<sup>e</sup> jour, le placenta entre en fonction et, à partir de ce moment, on assiste à une expression croissante du SR-BI au niveau du placenta et du sac vitellin. Pendant tout ce temps, le SR-BI est exprimé au niveau des pôles apicaux des cellules en contact avec la circulation, ce qui permet le transfert des lipoprotéines maternelles.

L'immunomarquage du SR-BI dans les tissus embryonnaires a révélé sa présence dans la glande surrénale (jour 14) et l'intestin primitif (jour 17) (68). Les méthodes d'immunofluorescence n'ont permis de détecter le SR-BI dans le foie qu'à partir du jour 17-18. Un grand nombre d'études sont nécessaires pour arriver à élucider complètement le mécanisme de transport des lipoprotéines chez l'embryon. Toutefois, les études réalisées jusqu'à maintenant suggèrent l'implication probable du SR-BI dans le système de transport materno-fœtal des lipides chez les rongeurs (79).

## 5.2 Régulation de l'expression du SR-BI

Comme le SR-BI joue un rôle important dans le transport sélectif du HDL-cholestérol, il est fort possible que les niveaux de la protéine soient influencés par les stimuli physiologiques et pharmacologiques qui modulent le métabolisme des stérols. Des études in vivo et in vitro ont regardé l'expression et les facteurs de régulation du SR-BI dans la glande surrénale, l'ovaire et le testicule où cette expression est fortement influencée par le processus de synthèse des hormones stéroïdiennes, ainsi que dans le foie.

### 5.2.1 Principaux sites de synthèse des hormones stéroïdiennes

#### A. La glande surrénale.

Dans la glande surrénale, les cellules responsables de stéroïdosynthèse se situent dans le cortex qui entoure la médullaire et leur principal stimulus est l'ACTH (l'hormone hypophysaire qui module l'activité des surrénales). Rigotti et ses collaborateurs ont démontré que, chez les rongeurs, l'hypolipoprotéïnémie et l'ACTH induisent une augmentation dramatique du transport sélectif du cholestérol des HDL (21,24,33). Il est probable que l'ACTH agisse directement sur les cellules du cortex surrénalien, puisque l'ACTH stimule également la production d'ARNm du SR-BI (24). L'ACTH induit la synthèse de l'AMPc qui augmente la production de l'ARNm du SR-BI et d'autres protéines impliquées dans la stéroïdogénèse telles que la protéine aiguë de régulation de stéroïdogénèse (StAR) et l'enzyme de clivage latéral du cholestérol (P-450scc) (21). De plus, chez les patients atteints de la maladie de Cushing, parallèlement aux faibles niveaux d'ACTH plasmatique, on note une

réduction des niveaux d'ARNm du SR-BI (21). In vivo, l'administration de la dexaméthasone, qui supprime la production d'ACTH, produit les mêmes effets sur l'expression du SR-BI adrénal (21).

Des études ont aussi révélé des niveaux altérés d'ARNm et de la protéine SR-BI chez les rats homozygotes pour des mutations des gènes de l'Apo A-I et de la lipase hépatique. Ces études suggèrent que l'activité de ces gènes influence aussi, de façon directe ou indirecte, l'expression du SR-BI dans les cellules surrénales.

Des doses élevées d'estrogènes influencent de façon importante le fonctionnement des divers organes chez certains mammifères. Par exemple, les taux plasmatiques des lipoprotéines chez le rat, le lapin et l'humain sont très sensibles aux œstrogènes, mais ils n'affectent que très peu la souris (24,32). Ainsi, chez le rat, l'estrogène diminue rapidement les taux plasmatiques de LDL et de HDL, ce qui est attribuable à une augmentation de l'activité hépatique des récepteurs aux LDL. L'estrogène stimule aussi la captation des esters de cholestérol des HDL par les cellules surrénales. Le mécanisme sous-jacent à cet effet de l'œstrogène n'est pas connu, mais on suppose qu'il s'exerce indirectement en augmentant la sécrétion d'ACTH.

La fonction et la régulation du SR-BI dans la surrénale demeurent incertaines. Toutefois, il semble que, chez l'humain, contrairement aux rats et aux souris, les LDL, et non les HDL, représentent la source majeure de cholestérol pour les tissus synthétisant les hormones stéroïdiennes (24), quoique le transport normal du cholestérol via le récepteur de LDL n'est pas essentiel pour le fonctionnement de la glande surrénale (24,30). En effet, chez les patients hypercholestérolémiques homozygotes qui ont une mutation affectant le récepteur pour LDL, la réponse plasmatique à l'ACTH est normale (21). De la même manière, les individus abétalipoprotéïnémiques, qui présentent des niveaux très faibles d'Apo B-100, n'ont aucune insuffisance surrénale en absence d'une exposition prolongée à l'ACTH (21). Il est donc possible que, chez l'humain, dans des circonstances normales ou lorsque la voie impliquant le LDL est déficiente, le SR-BI est aussi important dans la livraison du cholestérol à la surrénale.

## B. L'ovaire

Au niveau de l'ovaire, les deux types cellulaires où s'effectue la transformation du cholestérol en hormones sont les cellules thécales stimulées par l'hormone lutéinisante (LH) et par la gonadotrophine coriale (hCG), ainsi que les cellules du corpus lutéal. L'ovaire utilise les HDL pour la synthèse de ses hormones (47) et la liaison des HDL aux cellules ovariennes entraîne l'augmentation de la synthèse d'estrogènes et de progestérone (47). Dans l'ovaire non stimulé, l'expression de l'ARNm de SR-BI et de la protéine est retrouvée dans les cellules thécales et dans les cellules granuleuses du corpus lutéal. Les fonctions présumées du SR-BI dans l'ovaire ont été étudiées en déterminant l'effet des estrogènes et des gonadotrophines sur l'expression de la protéine et sur la production d'ARNm et ce, tant in vivo qu'in vitro. Chez le rat, l'administration d'estrogènes augmente, entre autres, le transport sélectif du cholestérol-HDL via le SR-BI (47). Toutefois, de fortes doses d'estrogènes modifient grandement la distribution cellulaire du SR-BI, entraînant une diminution apparente de la protéine au niveau técal et son augmentation significative au niveau du corpus lutéal.

Le traitement des rates avec les gonadotrophines entraîne l'augmentation rapide des niveaux d'ARNm du SR-BI dans les cellules thécales, probablement provoquée par le récepteur LH/hCG. Cette réponse est associée à l'induction des enzymes impliquées dans la synthèse hormonale et l'induction de la StAR (la protéine aiguë de régulation de la stéroïdosynthèse) (40).

## C. Le testicule

Le cholestérol-HDL est le principal substrat pour la synthèse hormonale testiculaire chez le rat. La liaison et le transport sélectif du cholestérol-HDL au niveau des cellules Leydig testiculaires sont stimulés par le hCG même si cette hormone, contrairement aux estrogènes, n'influence pas les niveaux plasmatiques du cholestérol. L'administration de hCG chez le rat augmente d'une façon significative l'expression du SR-BI (> 20 fois), effet qui s'accompagne de l'augmentation du transport sélectif du cholestérol-HDL, in vivo (32).

#### D. La glande mammaire

L'expression de SR-BI dans la glande mammaire est beaucoup plus élevée chez les rates gestantes par rapport aux contrôles non gestantes, ce qui est en fait un tissu qui exprime d'une manière hormono-dépendante le SR-BI. Toutefois, on ne connaît pas encore sa fonction exacte ni sa régulation.

#### 5.2.2 Le foie

Même si l'expression hépatique du SR-BI n'égale pas les niveaux retrouvés dans les tissus de synthèse hormonale, la masse importante du foie en fait le principal site d'expression du SR-BI et du transport sélectif du cholestérol HDL (27,28). Des fortes doses d'estrogènes et un apport excédentaire de cholestérol alimentaire sont des facteurs de régulation de l'expression et de l'activité du SR-BI hépatique (38). Récemment, quelques études ont rapporté une stimulation de l'activité du SR-BI hépatique lors de la période de grossesse et de lactation (79).

#### A. Régulation par les estrogènes

L'administration d'estrogènes chez le rat entraîne une diminution du transport sélectif des esters de cholestérol-HDL, parallèlement à la réduction de l'expression du SR-BI dans les hépatocytes. Toutefois, fait surprenant, le même traitement hormonal dans les cellules moins abondantes du foie comme les cellules Kupffer (les macrophages des sinusoides hépatiques), a augmenté le transport du cholestérol, ce qui a été corrélé avec l'expression élevée du SR-BI (17,34). Les études portant sur l'expression du SR-BI et sur le transport sélectif du cholestérol-HDL ainsi que les études de liaison-compétition des HDL prouvent le rôle important du SR-BI dans le transport sélectif du cholestérol-HDL au niveau hépatique.

Chez l'humain, l'estrogène diminue le cholestérol-LDL et augmente le cholestérol-HDL plasmatique, ce qui l'implique comme facteur de protection cardiovasculaire chez les

femmes pré-ménopausées. Un des mécanismes possibles qui pourraient expliquer cet effet serait l'induction par l'estrogène de la synthèse d'apo A-I hépatique, apolipoprotéine à l'origine des HDL naissantes. La diminution du transport sélectif des HDL et de l'expression du SR-BI serait donc à l'origine des niveaux élevés de HDL plasmatiques.

### B. Régulation par le cholestérol alimentaire

Une diète riche en cholestérol administrée pendant deux semaines supprime l'expression du SR-BI et le transport sélectif du cholestérol-HDL dans les hépatocytes de rats et augmente ce même récepteur dans les cellules de Kupffer (28,38). Il semble qu'il existe une régulation rétroactive (type feed-back) de l'absorption du cholestérol intestinal dans laquelle sont impliqués deux récepteurs de l'entérocyte et du foie, l'ABC1 et le SR-BI. Ce mécanisme d'action demeure énigmatique, mais des études de plus en plus nombreuses soutiennent le rôle du cholestérol dans la régulation de l'activité du SR-BI.

Par contre, des études effectuées in vitro sur des cellules surrénales incubées avec le cholestérol, les esters de cholestérol ou l'inhibiteur de la HMG CoA réductase n'ont pas reproduit les effets observés dans le foie. Ces études proposent des régulations différentes de l'expression et de l'activité du SR-BI selon le type de tissu : hormono-cholestérol indépendante, cholestérol dépendante ou hormono-cholestérol dépendante.

### C. Régulation hépatique au cours de la grossesse et de la lactation

Une étude effectuée sur les rats a rapporté que les niveaux de SR-BI doublent durant le dernier trimestre de grossesse et ces niveaux retournent aux valeurs initiales trois jours après l'accouchement et s'effondrent durant la période de lactation (32). De façon surprenante, la régulation hépatique entre les récepteurs des LDL et des HDL est nettement différente, ce qui suggère que durant la grossesse et la lactation, ces deux récepteurs effectuent des fonctions tout à fait différentes.



### 5.2.3 Mécanismes de régulation du SR-BI

Tel que mentionné dans le présent chapitre, les facteurs de régulation du SR-BI connus à ce jour sont les hormones trophiques tels l'ACTH et le hCG, ainsi que les seconds messagers qu'ils induisent : l'AMPc, les estrogènes et le cholestérol. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation sont mieux connus depuis l'identification, dans le domaine du promoteur du gène du SR-BI, des sites de liaison de certains facteurs de transcription qui influencent l'expression du gène SR-BI. Ces facteurs incluent le C/EBP, qui répond à la stimulation de l'AMPc et des gonadotrophines dans les cellules endocriniennes, le SRBP-1, un facteur clé dans la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, le SF-1, un important activateur de l'expression des enzymes de la stéroïdosynthèse et le StAR.

### 5.3 Altération de l'expression du SR-BI par des manipulations immunochimiques et génétiques

Les premières études sur le SR-BI ont décrit le rôle de ce récepteur, sa distribution tissulaire et sa régulation dans des cellules transfectées. Récemment, une nouvelle série d'études vient ajouter des preuves directes concernant le rôle du SR-BI dans la régulation du métabolisme des lipides.

#### 5.3.1 Les anticorps bloquants

L'équipe de Temel a fourni, pour la première fois, des anticorps dirigés contre la boucle extracellulaire du SR-BI qui inhibent ainsi la liaison aux HDL. Dans les cellules surrénales stimulées par l'ACTH, ces anticorps inhibent le transport sélectif des esters de cholestérol-HDL ainsi que la conversion de ce cholestérol en hormones stéroïdiennes (21,24). Les premières études ont évalué le transport sélectif dans des cellules transfectées et ont permis de corrélérer le niveau d'expression du SR-BI et son taux de ce transport. Les premières études utilisant des anticorps bloquants ont apporté les premières évidences directes de l'implication du SR-BI dans le transport sélectif au niveau physiologique (33,40).

### 5.3.2. Surexpression hépatique du SR-BI

Chez les souris transgéniques surexprimant le SR-BI hépatique, des niveaux pratiquement nuls de HDL plasmatiques ont été observés, en plus d'une augmentation marquée de l'élimination biliaire du cholestérol (38). Par ailleurs, une diminution du niveau plasmatique de l'apo A-I par rapport au contrôle a été rapportée. Ceci est probablement dû à une association entre l'augmentation du transport sélectif par le SR-BI au niveau hépatique et l'élévation parallèle de la clairance d'apo A-I par les reins (27,56). Ces relations trouvées chez la souris sont similaires à celles rapportées chez l'humain (56). De la même manière, l'administration de fortes doses d'estrogènes à des rats diminue l'expression du SR-BI et supprime la sécrétion de cholestérol dans la bile (38). Ces observations font du SR-BI un des facteurs potentiellement impliqué dans l'apparition des calculs biliaires (69). De plus, ces études de transport biliaire des lipides apportent des preuves indirectes du rôle du SR-BI dans l'efflux de cholestérol au niveau du foie (65).

Afin de vérifier l'influence du SR-BI dans l'athérogenèse, une série d'études ont été menées chez les souris transgéniques knock-out pour le récepteur LDL, en surexprimant le SR-BI dans le foie. Les résultats ont montré que, par rapport aux contrôles, les souris surexprimant le SR-BI présentaient des faibles niveaux plasmatiques de HDL et des autres lipoprotéines qui sont reconnues par le SR-BI, soient les VLDL, les IDL et les LDL. Fait plus important encore, ces souris présentaient significativement moins de lésions d'athérosclérose que moins de 4 semaines après l'induction de la surexpression. De plus, leurs taux de HDL étaient bien corrélés avec la réduction de ces lésions. Il semble donc que, au moins dans quelques circonstances, le taux du transport inverse du cholestérol constitue un indicateur plus fidèle de la progression de l'athérosclérose que le taux des HDL.

### 5.3.3 Inactivation génique : les souris knock-out

La preuve définitive de l'implication physiologique du SR-BI dans le métabolisme des HDL a été apportée par l'analyse des propriétés des souris porteuses de mutations nulles du gène du SR-BI. Tout d'abord, l'effet négatif de cette mutation sur le développement de l'embryon et sur la survie des nouveau-nés est en accord avec le rôle primordial et la

distribution importante du SR-BI dans le placenta et dans les tissus embryonnaires. Par rapport aux contrôles, les souris hétérozygotes et homozygotes pour ces mutations présentaient une augmentation de leur cholestérol plasmatique de l'ordre de 30 à 40%. Par ailleurs, leurs HDL étaient plus larges et plus hétérogènes et avaient un contenu plus élevé en Apo E. Ces études ont été confirmées par celles ayant utilisé des souris porteuses de mutations partielles, causées par une insertion de 2 Kb dans la région promotrice du gène. Ces souris présentaient une réduction de l'expression hépatique de la protéine SR-BI et du transport sélectif du cholestérol-HDL. Dans le même ordre d'idées, une série d'études ont été mises au point afin de mieux décrire le rôle du SR-BI dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires et endocriniennes. Les souris femelles porteuses de la mutation étaient infertiles (32,47). De plus, les souris porteuses de cette mutation et de la mutation de l'Apo E avaient une augmentation importante du cholestérol plasmatique surtout dans les VLDL, les IDL et les LDL (43).

## **6. La variabilité génétique du SR-BI**

Même si, jusqu'au présent, très peu d'études sur la variabilité génétique du SR-BI et son impact sur l'expression phénotypique ont été effectuées, quelques données intéressantes ont établi des associations entre des variants génétiques et des paramètres du métabolisme lipidique, de l'indice de masse corporel (IMC) et de certaines conditions pathologiques. Ainsi, une telle étude a mis en évidence dans une population caucasienne saine des polymorphismes dans la région 12q24 du gène SR-BI (60). L'analyse de ces polymorphismes a révélé des associations significatives entre certains SNPs (Single-Nucleotide-Polymorfism), des mutations d'un seul nucléotide et les niveaux plasmatiques de certains lipides plasmatiques, soient les HDL, les LDL et les triglycérides et les mesures anthropométriques. De plus, toutes ces associations se sont avérées dépendantes du sexe. Une autre étude effectuée dans une population asiatique a aussi révélé une association significative entre un polymorphisme situé dans l'exon 8, le profil lipidique et l'indice de masse corporel dans un groupe de patients coronariens (59).

Les analyses comparatives des mutations décrites par ces études et leur fréquence dans diverses populations et ethnies ont révélé des variations pour les allèles étudiées. Ces observations

impliqueraient des différences pour le SR-BI dans le fond génétique commun. D'autre part, on doit noter le voisinage et possiblement des interrelations entre le gène du SR-BI et d'autres gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique. Certains de ces gènes sont impliqués dans le phénotype du diabète (MODY3, NIDDM2, ACACB etc.).

En conclusion, les nombreuses études effectuées dans plusieurs domaines fournissent des preuves suffisantes pour considérer le SR-BI parmi les gènes et les molécules qui jouent un rôle des plus importants dans le métabolisme lipidique et les maladies secondaires à son dérèglement.

### **7. Le SR-BI et l'intestin.**

L'absorption du cholestérol alimentaire et biliaire est un processus complexe qui nécessite le transfert du cholestérol libre contenu dans les micelles biliaires vers la bordure en brosse de la membrane entérocytaire. Classiquement, ce phénomène était considéré comme un processus de diffusion passive. Cependant, des analyses de cinétique ont montré que ce processus est une réaction saturable qui est annulée lorsqu'on expose la membrane à des protéases (61,63). On considère de plus en plus l'absorption du cholestérol comme un processus contrôlé par des protéines de transport. Cette hypothèse a été renforcée par des études qui ont mimé l'activité de transport du cholestérol dans des liposomes en utilisant des protéines extraites de la bordure en brosse intestinale (61,62). Les études de l'équipe de Hausser ont proposé le SR-BI comme un des récepteurs impliqués dans l'absorption intestinale du cholestérol. Leurs études ont montré une réduction du transport sélectif dans des vésicules de la bordure en brosse en présence de concentrations croissantes d'anticorps dirigés contre le domaine fonctionnel extracellulaire du récepteur. Cependant, la pureté de ces vésicules n'était pas contrôlée, ces préparations ne permettaient pas de faire la distinction entre le pôle apical et basolatéral. Il est aussi à noter qu'un effet inhibiteur similaire du transport sélectif a été reproduit par les mêmes auteurs, lorsqu'ils ont utilisé des apolipoprotéines au lieu des anticorps. Cet effet inhibiteur a démontré que le SR-BI reconnaît et lie seulement la protéine de la particule lipoprotéique (68). En accord avec ces résultats, l'expression du SR-BI est augmentée en présence d'une déficience de l'absorption du cholestérol induite par une diminution de sécrétion de la bile (65,69). Plus récemment, chez la souris déficiente en SR-BI,

une absorption intestinale normale de cholestérol a été notée, ce qui suggère l'implication possible d'autres molécules permettant de compenser pour le manque d'absorption du cholestérol au niveau intestinal (69,70).

Une série d'études utilisant la technique d'immunofluorescence a mis en évidence la présence du SR-BI tout au long du tractus digestif et ce, de façon complémentaire aux analyses de type Northern blot démontrant une modulation des niveaux d'ARNm dans l'entérocyte. Chez la souris, le SR-BI a été identifié dans l'intestin proximal, le site préférentiel d'absorption du cholestérol alimentaire et biliaire (66,67). Il est toutefois important de noter que, *in vitro*, le SR-BI facilite aussi l'absorption des esters de cholestérol et des triglycérides dans la bordure en brosse intestinale (68). Toutefois, *in vivo* ces lipides neutres ne sont pas absorbés dans l'intestin comme des molécules intactes, mais ils sont premièrement hydrolysés en cholestérol libre. Par conséquent, le rôle complexe que ce récepteur joue dans l'absorption des lipides reste encore à éclaircir. Le SR-BI pourrait aussi avoir d'autres rôles au niveau intestinal, mis à part l'absorption du cholestérol.

Les techniques d'immunocytochimie ont signalé la présence de SR-BI sur la bordure en brosse des entérocytes à partir du duodénum jusqu'au rectum, et ce tout au long de l'axe crypte-villosités. L'expression la plus abondante a été retrouvée dans le jéjunum et particulièrement dans les cellules villositaires de surface. De plus, un signal d'immunofluorescence a été détecté à un faible niveau sur la surface luminale des cellules qui secrètent le mucus.

Les études de Calvo, publiées en 2001, ont pour leur part révélé la présence du SR-BI sur la membrane basolatérale de l'entérocyte. Même si, jusqu'à présent, on ne connaît pas exactement la fonction du SR-BI à ce niveau, il est fort possible qu'il soit impliqué dans le transport des lipides neutres contenus dans les HDL plasmatiques. Des études précédentes ont montré que, dans la lignée cellulaire Caco-2 qui est un modèle entérocytaire, le SR-BI peut transporter, du côté basolatéral, les esters de cholestérol des HDL, en plus d'initier l'efflux du cholestérol cellulaire en présence des apo A-I et A-II (71).

Tout récemment, une étude publiée en 2002 par l'équipe d'Altmann vient renforcer l'hypothèse du rôle fonctionnel du SR-BI dans l'absorption intestinale de cholestérol (71). Selon cette étude, l'ezetimibe, un puissant inhibiteur de l'absorption du cholestérol, exercerait son rôle par blocage spécifique du SR-BI. Toutefois, les résultats *in vitro* du blocage du

transport sélectif par l'ezetimibe via le SR-BI, n'ont pas été reproduits chez la souris. Il est possible que, in vivo, l'absorption du cholestérol soit non seulement sous le contrôle des mécanismes locaux, mais aussi sous l'influence quantitative et qualitative de la bile et des enzymes de digestion. Il semble donc qu'au niveau intestinal, le SR-BI n'est pas le seul récepteur impliqué dans le transport du cholestérol et que d'autres voies de transport et d'autres molécules peuvent exercer ces fonctions.

Finalement, même s'il est faiblement exprimé dans les cryptes intestinales et dans le gros intestin où l'absorption intestinale des lipides est presque inexistante, il est suggéré que le SR-BI possède des fonctions additionnelles, comme par exemple la protection de la muqueuse des lipides non absorbés par l'intestin proximal. Ainsi, des variations interindividuelles de l'expression du SR-BI au niveau du colon pourraient expliquer, du moins en partie, les maladies coliques secondaires aux métabolites provenant des lipides non absorbés.

Toutes ces études et celles à venir pourraient conduire à la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques qui, en modulant l'activité de ce transporteur, vont permettre de régulariser l'absorption intestinale des lipides. Par le contrôle de l'absorption des lipides on sera en mesure de corriger, du moins partiellement, l'hypercholestérolémie et l'obésité, les deux facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose.

## Matériels et méthodes

### 1. La lignée cellulaire Caco-2/15

Pour réaliser les expériences d'influx, d'estérification et de sécrétion du cholestérol, la lignée cellulaire Caco-2/15, un clone de cellules Caco-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) a été utilisé.

Les cellules Caco-2 sont des cellules dérivées d'un carcinome de colon humain. Ces cellules polarisées peuvent, lorsque confluentes, se différencier tout en étant conservées en mono-couche (81, 82). Cet épithélium possède des propriétés similaires aux cellules de l'iléum fœtal. Ces deux types cellulaires expriment essentiellement les mêmes gènes de maturation et de fonctionnement, ont une morphologie semblable et produisent des micro-villosités et des jonctions intercellulaires serrées.

Fréquemment utilisées dans les études pharmacologiques d'absorption des divers médicaments, ce modèle intestinal a été aussi bien caractérisé et utilisé dans les études du métabolisme intestinal des lipides. Les cellules Caco-2 effectuent la synthèse des apolipoprotéines, l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines et elles expriment les enzymes de régulation du métabolisme lipidique (72). Étant donné la capacité des CaCo-2 à reproduire la plupart des étapes du transport intracellulaire des lipides, cette lignée cellulaire est de plus en plus utilisée comme modèle absorbant.

Des clones de ces cellules ont été produits par l'équipe de Dr Beaulieu de Sherbrooke (81,82). Ces clones peuvent présenter moins de variabilité, ce qui rend les expériences plus reproductibles.

Des études morphologiques et d'expression des gènes de maturation des entérocytes indiquent un niveau diminué de variabilité et des atypies nucléaires ainsi qu'un état de différenciation plus élevé. La résistance trans-épithéliale, qui reflète la formation des jonctions serrées entre les cellules en mono-couche, est augmentée, tout comme le sont les protéines totales et la sucrase, une enzyme de maturation de la bordure en brosse. Dans ce programme de recherche, nous avons décidé de caractériser le clone des CaCo-2, les cellules

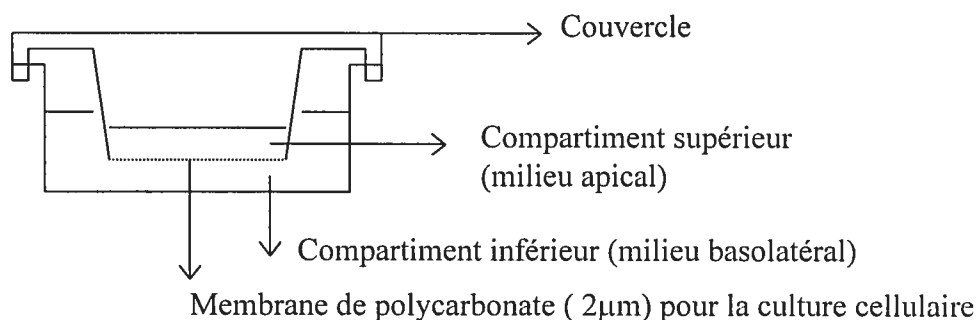
programme de recherche, nous avons décidé de caractériser le clone des CaCo-2, les cellules CaCo-2/15, dans la synthèse des apolipoprotéines, la production des lipides et l'assemblage des lipoprotéines.

D'autre part, ce modèle servira à décrire le rôle du SR-BI dans l'absorption des lipides au niveau intestinal.

## 2. Culture cellulaire

Les Caco-2/15 ont été cultivés à 37°C dans un milieu nutritif de prolifération, le DMEM (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) contenant 1% de pénicilline-streptomycine, 1% de sodium pyruvate et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté - DMEM supplémenté (SVF, Flow, McLean, VA). Les Caco-2/15 (passages 18-24) ont été maintenus à 5% CO<sub>2</sub>, dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, NY). Les cultures ont été dispersées (1 : 4) à 70-90% de confluence avec une solution 0.05% trypsine et 0.5mM EDTA (GIBCO-BRL).

Pour leur différenciation, les cellules ont été sous-cultivées à une densité de  $2.5 \times 10^5$  /puits dans 24.5-mm filtres Transwell de polycarbonate, de 12 mm, porosité de 0.4- $\mu$ m (Costar, Cambridge, MA) dans le milieu de différenciation, le DMEM supplémenté avec 5% SVF. Les filtres ont été placés dans des plaques de culture de 12 puits permettant l'accès séparés des compartiment supérieur et inférieur (compartiment apical et basolatéral). Après 20 jour de culture, les cellules sont hautement différenciées et prêtes pour les études de transport du cholestérol (72,73).



**Figure 10**



### 3. Étude de l'état de différenciation et de la viabilité cellulaire

Afin d'examiner l'état de maturité fonctionnelle et, par le fait même de tester si l'effecteur utilisé, l'anticorps bloquant de la partie fonctionnelle du SR-BI ou l'acide taurocholique (servant à la formation des micelles) n'affecte pas la viabilité des cellules nous avons déterminé la résistance transépithéliale et l'activité de la sucrase, une enzyme qui indique l'état de maturation cellulaire.

#### 3.1 La résistance transépithéliale.

La résistance transépithéliale vise à vérifier l'intégrité de la monocouche et, conséquemment la fonctionnalité des jonctions intercellulaires. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil de mesure (Millipore, Bedford, MA) muni d'une électrode placée directement dans le compartiment apical des puits. L'impact des effecteurs, soit l'anticorps bloquant SR-BI ou l'acide taurocholique, sur la viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées a été testé. Les mesures ont été prises à 20 jours de différenciation avant et après les incubations. Les résultats ont été exprimés en ohm/cm<sup>2</sup> ( $\Omega/\text{cm}^2$ ).

#### 3.2 Le dosage de la sucrase

La sucrase appartient à la classe des disaccharidases, des enzymes de la bordure en brosse intestinale qui catalysent la digestion des disaccharides. Au niveau intestinal, ces enzymes sont considérées comme des indicateurs de l'état de maturité fonctionnelle des entérocytes (xxx).

Le dosage a été effectué sur les homogénats cellulaires, après 20 jours de culture, selon la méthode de Messer et Dahlqvist (45) modifiée par Loyd et Whelan (47). Cette méthode est basée sur l'utilisation de l'enzyme glucose oxydase (Roche, MA) afin d'estimer la quantité de glucose libéré sous l'action de la sucrase. La réaction se déroule en deux étapes : premièrement, l'enzyme est incubé avec son substrat, la sucrose, deuxièmement, la préparation est incubée avec un mélange de peroxydase (Sigma, Mo), de glucose oxydase et d'un chromogène, l'o-dianisidine (Sigma, Mo). La réaction enzymatique entraîne une coloration qui

chromogène, l'o-dianisidine (Sigma, Mo). La réaction enzymatique entraîne une coloration qui est mesurée par spectrophotométrie directe. Les résultats ont été exprimés en unités internationales/mg protéines totales (UI/mg protéine).

1. Sucrose + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{sucrase}}$  Glucose + d'autres monosaccharides
2.  $\alpha$ -glucose  $\xrightleftharpoons{\text{phosphate}}$   $\beta$ -glucose
3.  $\alpha$ -glucose + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{glucose oxydase}}$  Gluconolactone + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + o-Dianisidine  $\xrightarrow{\text{peroxydase}}$  H<sub>2</sub>O + o-Dianisidine oxydée (brun)

#### 4. Étude du transport des lipides

Pour caractériser le transport des lipides dans les CaCo-2/15, nous avons utilisé les techniques usuelles dans notre laboratoire : les différentes classes de lipides ont été analysées par un précurseur radioactif, le [<sup>14</sup>C] acide oléique et le traitement chromatographique, la synthèse des apolipoprotéines a été examinée par l'addition aux cellules de la [<sup>35</sup>S] méthionine suivie d'électrophorèse et les lipoprotéines ont été évaluées par ultracentrifugation et comptage.

#### 5. Études sur le rôle du SR-BI dans le transport du cholestérol au niveau intestinal.

Afin de démontrer le rôle du SR-BI comme récepteur membranaire de cholestérol, impliqué dans l'absorption et dans l'influx du cholestérol du côté basolatéral de l'entérocyte, un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire, fonctionnelle du récepteur a été utilisé.

Les expériences de transport du cholestérol ont été effectuées dans les deux pôles, apical et basolatéral. Afin de permettre le transport de cholestérol, les incubations apicales ont été effectuées à l'aide de micelles contenant de le monoglycérol oléate et l'acide taurocholique. Ce mélange se rapproche des conditions physiologiques au niveau de la lumière intestinale, où

le cholestérol et les autres lipides doivent être englobés dans des micelles pour être absorbés par l'entérocyte. Du côté basal le transporteur de cholestérol utilisé a été l'albumine.

Les expériences se sont déroulées en trois étapes : la pré-incubation avec l'anticorps bloquant SR-BI , l'incubation avec le cholestérol radioactif et le dosage du cholestérol transporté et estérifié par la cellule.

### 5.1 La pré incubation avec l'anticorps bloquant SR-BI

Les cellules différenciées ont été lavées deux fois avec PBS (GIBCO) puis incubées 30 minutes à 37°C avec l'anticorps SR-BI (Novus Biologicals, NB 400-103G) dans le milieu de culture DMEM. La concentration finale de l'anticorps utilisé est de 1/200. Cette préparation a été ajoutée au compartiment apical supérieur (volume total de 1ml) ou au compartiment basolatéral- compartiment inférieur (volume total de 1.5 ml).

### 5.2 Incubation avec le [<sup>14</sup>C] cholestérol

Après une préincubation de 30 minutes en présence d'un excès d'anticorps dirigé contre le SR-BI, le milieu de culture a été remplacé par les micelles contenant le cholestérol du côté apical et par l'albumine-cholestérol du côté basolatéral.

Les micelles ont été préparées en évaporant sous azote le monoglycérol oléate (Sigma), le cholestérol libre froid (Sigma), le 4-[<sup>14</sup>C] cholestérol (NEN, 49mCi/mmol) et l'acide taurocholique (Calbiochem). Le mélange a été dissout dans le milieu de culture DMEM préchauffé à 37°C et ensuite sonifié 1 minute dans la glace afin de former des micelles claires. Les concentrations finales étaient : 0.3mM de mono oléine, 100µM cholestérol libre, 250 000DPMs 4-[<sup>14</sup>C] cholestérol ou 0.14µCi/ puits et 4.8mM taurocholate.

Le mélange albumine-cholestérol a été préparé en suivant les mêmes étapes de la préparation des micelles. Du cholestérol libre froid a été ajouté au cholestérol radioactif et le mélange a par la suite été solubilisé dans l'albumine sérique bovine (BSA) sans acides gras libres. La concentration finale du 4-[<sup>14</sup>C] cholestérol était de 250 000 DPM/puits. Les incubations ont été effectuées à 37°C pour une durée de 3 heures.

### 5.3 Le dosage du cholestérol.

Après 3 heures d'incubation, les milieux supérieur et inférieur ont été récupérés. Les cellules ont été lavées avec le PBS et grattées de leur filtre à l'aide d'un grattoir de caoutchouc dans un tampon de lyse (TBS, EDTA, SDS, Tritton et déoxycholate de sodium) contenant des antiprotéases (phénilméthylsulfonyl fluoride, pepstatine, EDTA, acide aminocaproïque, dithiothreitol, sodium azide et trasylol – toutes dans une concentration de 1mM). Par la suite, le cholestérol et les esters de cholestérol ont été extraits des trois milieux (apical, cellules et basal) en présence d'un entraîneur non radioactif, le cholestérol libre et les esters de cholestérol.

Les deux classes de cholestérol ont été séparées par chromatographie sur couche mince (TLC) en utilisant un mélange de solvants hexanes-éther-acide acétique [80 : 20 : 3 (vol/vol/vol)] (xxx). Les surfaces correspondantes de chaque lipide, visualisées dans une atmosphère iodée, ont été grattées des plaques de TLC. Finalement, la poudre de silice contenant le cholestérol radioactif a été placée dans des vials de scintillation avec un liquide de comptage Ready Safe (Beckman, Fullerton, CA). Le niveau de radioactivité a été évalué par la mesure de la scintillation (Beckman, LS 5000 TD, Ontario, Canada).

Les protéines cellulaires totales ont été quantifiées par la méthode de Bradford et les résultats ont été exprimés en dpm par milligrammes de protéines cellulaires.

### 6. Les analyses statistiques

Toutes les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SE. Les différences entre les contrôles et les échantillons traités avec l'anticorps bloquant SR-BI ont été évaluées par le test t-Student. Le taux de signification a été établi à 5% ( $p < 0.05$ )

### 5.3 Le dosage du cholestérol.

Après 3 heures d'incubation, les milieux supérieur et inférieur ont été récupérés. Les cellules ont été lavées avec le PBS et grattées de leur filtre à l'aide d'un grattoir de caoutchouc dans un tampon de lyse (TBS, EDTA, SDS, Tritton et déoxycholate de sodium) contenant des antiprotéases (phénylmethylsulfonyl fluoride, pepstatine, EDTA, acide aminocaproïque, dithiothreitol, sodium azide et trasylol – toutes dans une concentration de 1mM). Par la suite, le cholestérol et les esters de cholestérol ont été extraits des trois milieux (apical, cellules et basal) en présence d'un entraîneur non radioactif, le cholestérol libre et les esters de cholestérol.

Les deux classes de cholestérol ont été séparées par chromatographie sur couche mince (TLC) en utilisant un mélange de solvants hexanes-éther-acide acétique [80 : 20 : 3 (vol/vol/vol)] . Les surfaces correspondantes de chaque lipide, visualisées dans une atmosphère iodée, ont été grattées des plaques de TLC. Finalement, la poudre de silice contenant le cholestérol radioactif a été placée dans des vials de scintillation avec un liquide de comptage Ready Safe (Beckman, Fullerton, CA). Le niveau de radioactivité a été évalué par la mesure de la scintillation (Beckman, LS 5000 TD, Ontario, Canada).

Les protéines cellulaires totales ont été quantifiées par la méthode de Bradford et les résultats ont été exprimés en dpm par milligrammes de protéines cellulaires.

### 6. Les analyses statistiques

Toutes les valeurs ont été exprimées en moyennes  $\pm$  SE. Les différences entre les contrôles et les échantillons traités avec l'anticorps bloquant SR-BI ont été évaluées par le test t-Student. Le taux de signification a été établi à 5% ( $p < 0.05$ )

## RÉSULTATS

### 1. Culture cellulaire CaCo-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15, utilisée dans la présente étude, a montré des propriétés morphologiquement et fonctionnellement supérieures comparativement avec les Caco-2 provenant de l'ATCC. En effet les cellules Caco-2/15 en mono-couche développent une différenciation supérieure comme un niveau élevé de polarisation, une bordure en brosse et des jonctions serrées plus développées. Cette maturation a été mise en évidence par l'activité de la sucrase ( 200-230 U/mg de protéines ) et par la résistance trans- épithéliale ( 2000-2500  $\Omega \times \text{cm}^2$ ). Les résultats ont montré que les cellules Caco-2/15 atteignent un niveau significativement supérieur de maturation (tableau 1). De plus, il y a moins de variabilité entre les différents passages par rapport aux cellules d'origine.

### 2. Caractérisation lipidique de la lignée cellulaire CaCo-2/15

#### 2.1. Incorporation et sécrétion de l'acide oléique dans les lipides cellulaires.

Les incubations des cellules Caco-2/15 avec 1mM d'acide oléique ont montré une augmentation significative du taux d'estérification des lipides cellulaires, notamment dans les fractions de mono glycérides, di glycérides et esters de cholestérol par rapport à la lignée Caco-2 ATCC (Figure 1-2). De plus, cette différence augmente avec le temps d'incubation (2 heures-24 heures). Des valeurs significatives ont été également observées au niveau des triglycérides particulièrement à 24 heures (Figure 1).

La sécrétions du côté basolatéral des lipides estérifiés suit la même tendance avec de plus grandes différences à 24 heures d'incubation (Figure 3-4).

## 2.2 Synthèse de novo du cholestérol

L'acétate, un précurseur de la synthèse de cholestérol, a été ajouté au pôle apical de la mono-couche cellulaire dans le but de quantifier l'activité de l'enzyme HMG- CoA réductase et finalement pour apprécier la capacité de synthèse des Caco-2/15 par rapport aux Caco-2 ATCC. Dans les conditions d'incubation décrites, on note des valeurs de cholestérol libre et des esters de cholestérol significativement augmentées dans les Caco-2/15 (Figure 6). Non seulement la synthèse du cholestérol a été élevée, mais la sécrétion de ces lipides a également connue une augmentation substantielle dans les Caco-2/15 (Figure 7).

## 2.3 L'activité d'estérification des lipides

Les lipides incorporés ou synthétisés dans la cellule sont soit stockés dans le cytosol, sous forme estérifiée, soit secrétés majoritairement sous forme des lipoprotéines. Le processus d'estérification dépendant majoritairement de l'activité de l'enzyme ACAT a été évalué par l'incorporation du [<sup>14</sup>C]-oléoyl CoA. La figure 5 montre des valeurs significativement augmentées de l'ACAT pour les Caco-2/15 par rapport aux Caco-2 ATCC.

## 2.4 Production des lipoprotéines – synthèse des apolipoprotéines, assemblage et sécrétion des lipoprotéines

La nouvelle série d'expériences a été réalisée afin d'apprécier la capacité des cellules Caco-2/15 à assembler les lipides et les apolipoprotéines et à sécréter les lipoprotéines. La synthèse des apoprotéines apo B-100, B-48, A-IV, A-I et E a été évaluée par l'incorporation de la [<sup>35</sup>S]-méthionine, suivie par l'immunoprécipitation et l'électrophorèse. La figure 8 montre des valeurs significativement augmentées de l'apo B-100 (50.8%) et de l'apo A-IV (13.4%).

Pour la sécrétion des lipoprotéines du côté basolatéral, les expériences ont été menées dans les cellules incubées durant 24 heures en présence du [<sup>14</sup>C]-acide oléique et les lipoprotéines ont été isolées par ultracentrifugation. Nos résultats ont démontré une augmentation significative des chylomicrons et des VLDL dans les Caco-2/15 par rapport aux Caco-2 ATCC ( Figure 9).

### **3. Effet du blocage du SR-BI sur le transport et le métabolisme du cholestérol.**

#### **3.1 Effet des micelles et de l'anticorps anti-SR-BI sur la viabilité cellulaire**

Avant d'étudier le rôle de SR-BI dans le transport intestinal du cholestérol, nous avons vérifié que les micelles et l'anticorps anti-SR-BI n'influencent pas la différenciation et la viabilité cellulaire. À ce but, nous avons effectué le dosage de la sucrase et la résistance transépithéliale pour les cellules traitées versus des cellules contrôles. Les tableaux 2 et 3 démontrent qu'il n'y a pas des différences significatives entre les cellules qui ont subi le traitement avec les effecteurs par rapport aux cellules contrôles.

#### **3.2 Effet de l'anticorps SR-BI sur l'absorption du cholestérol**

Les incubations avec l'anticorps bloquant du SR-BI, ont mis en évidence une diminution significative (16%) de l'absorption du cholestérol présenté sous forme de micelles par rapport au contrôle. Des expériences similaires utilisant l'acide polyinosinique (API) comme inhibiteur de SR-AI, un autre récepteur membranaire impliqué dans le transport de cholestérol, ont réussi à inhiber également l'absorption du cholestérol (20%). Par la suite, la combinaison des deux inhibiteurs, l'anticorps SR-BI et l'acide polyinosinique, a démontré un effet inhibiteur aditif (36.1%), témoignant de la captation du cholestérol par deux récepteurs différents (Figure 11).

#### **3.2 Effet de l'anticorps SR-BI sur l'estérification du cholestérol intracellulaire**

Les processus d'estérification intracellulaire sont influencés par la quantité de cholestérol qui a pu avoir accès aux cellules. L'inhibition du SR-BI par l'anticorps bloquant a entraîné une diminution significative du taux d'estérification du cholestérol (21%). Par contre, le blocage du SR-AI par l'acide polyinosinique n'a pas significativement altéré les quantités d'esters de cholestérol (Figure 12).



### 3.3 Effet de l'anticorps SR-BI sur l'influx de cholestérol

Les expériences visant à démontrer le rôle du SR-BI dans l'influx du cholestérol du côté basolatéral ont été conduites avec du cholestérol lié à l'albumine. En présence de l'anticorps SR-BI peu d'effet a été noté sur la captation du cholestérol ( 5% de diminution). Par contre, l'acide polyinosinique a provoqué une diminution significative du transport du cholestérol dans la cellule (47%). Les expériences utilisant la combinaison de l'anticorps et de l'acide polyinosinique ont démontré une diminution de l'influx de cholestérol de 22% (Fig. 12)

**Tableau 1: État de différenciation et de viabilité cellulaire**

<b>Paramètre</b>	<b>Caco-2</b>	<b>Caco-2/15</b>
Résistance transépithéliale $\Omega/\text{cm}^2$	$1802 \pm 229$	$2102 \pm 82^*$
Sucrase U/l	$150 \pm 18$	$280 \pm 21^*$

Moyennes  $\pm$  SE des  $n = 3$  expériences. Les cellules ont été testées à 21 jours de post confluence.

\* $p < 0.001$

Figure 1: Milieu cellulaire

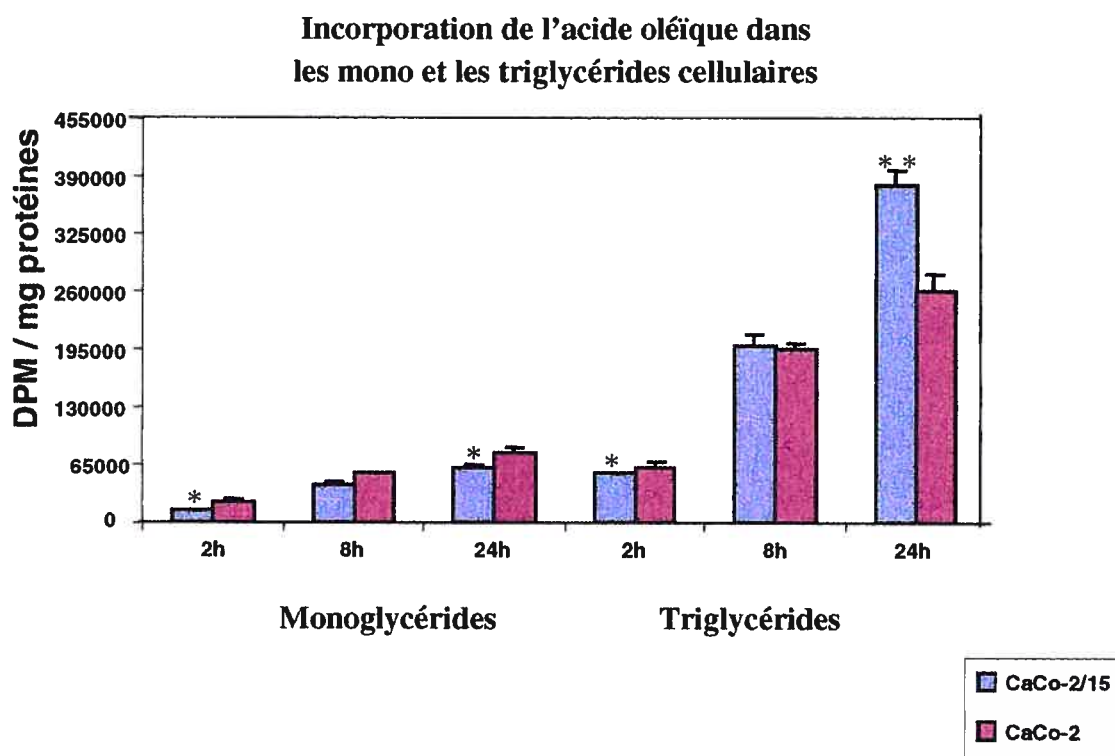
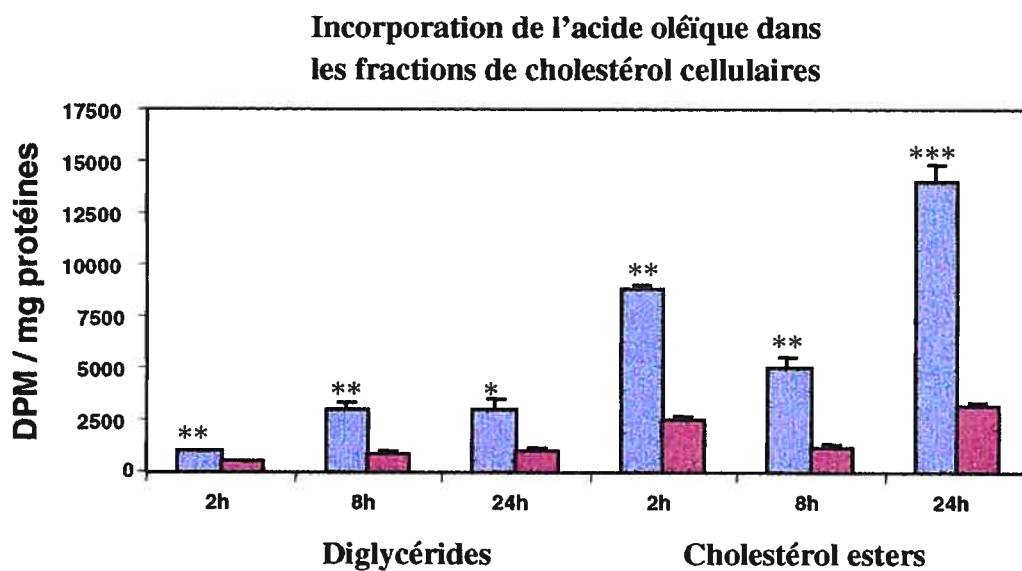


Figure 2: Milieu cellulaire



Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des n = 3 expériences

\*\*\* $p < 0.00002$ , \*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.002$

Figure 3: Milieu basolatéral

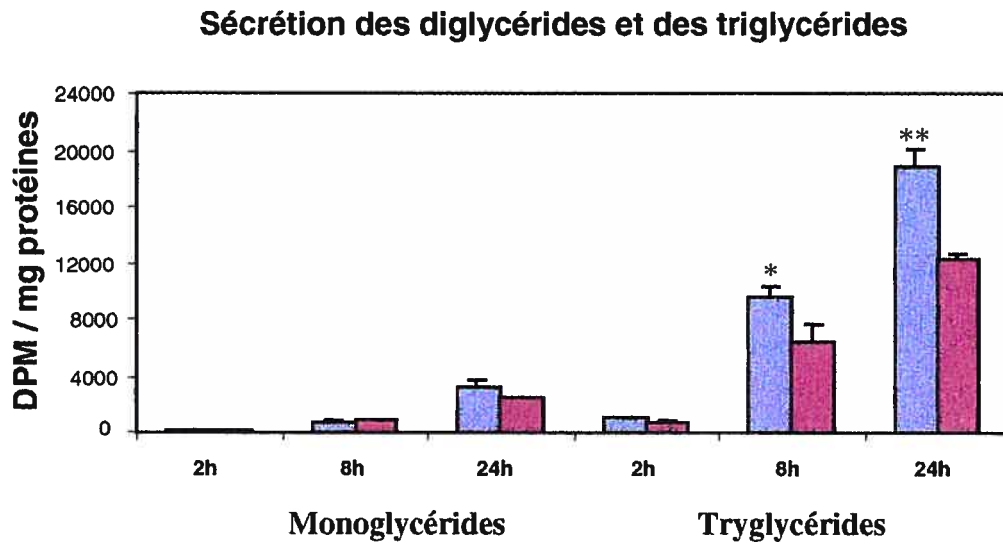
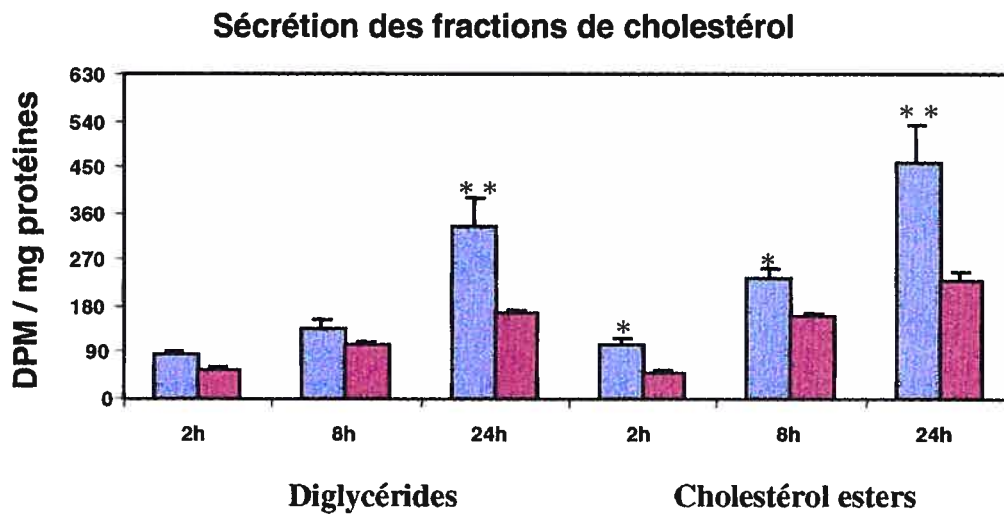
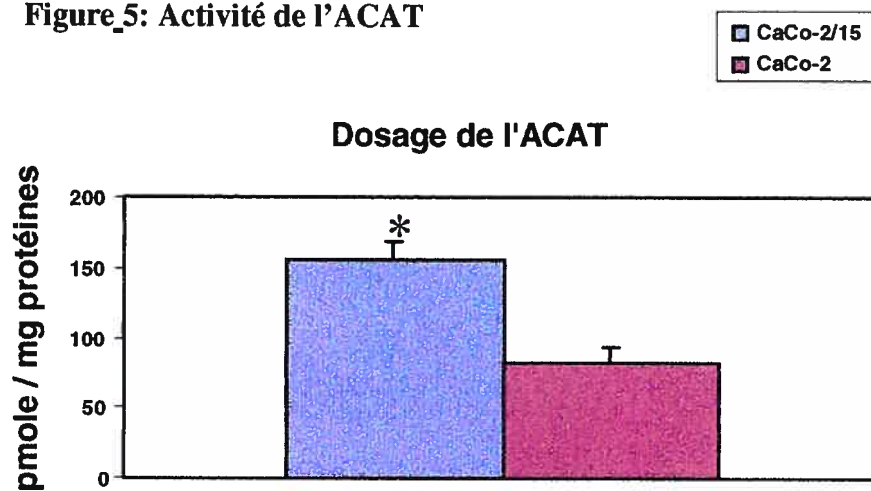


Figure 4: Milieu basolatéral



Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des  $n = 3$  expériences

\*  $p < 0.002$ , \*\*  $p < 0.01$

**Figure\_5: Activité de l'ACAT**

Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des n = 3 expériences

\*p<0.01

Figure 6: Milieu cellulaire

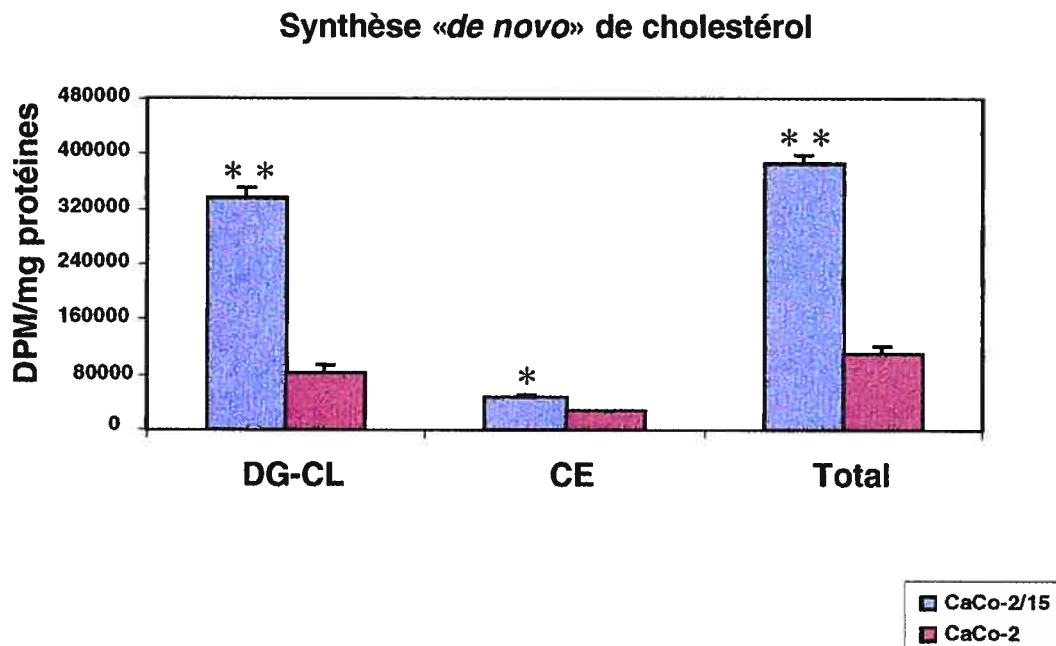
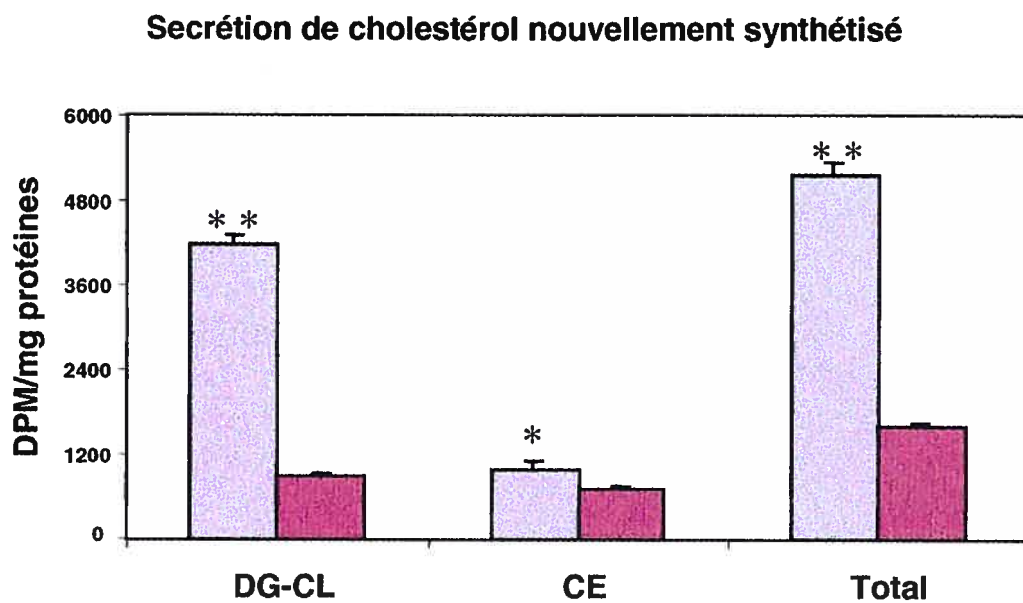


Figure 7: Milieu basolatéral



Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des  $n = 3$  expériences

\*\* $p < 0.00001$ , \* $p < 0.0001$

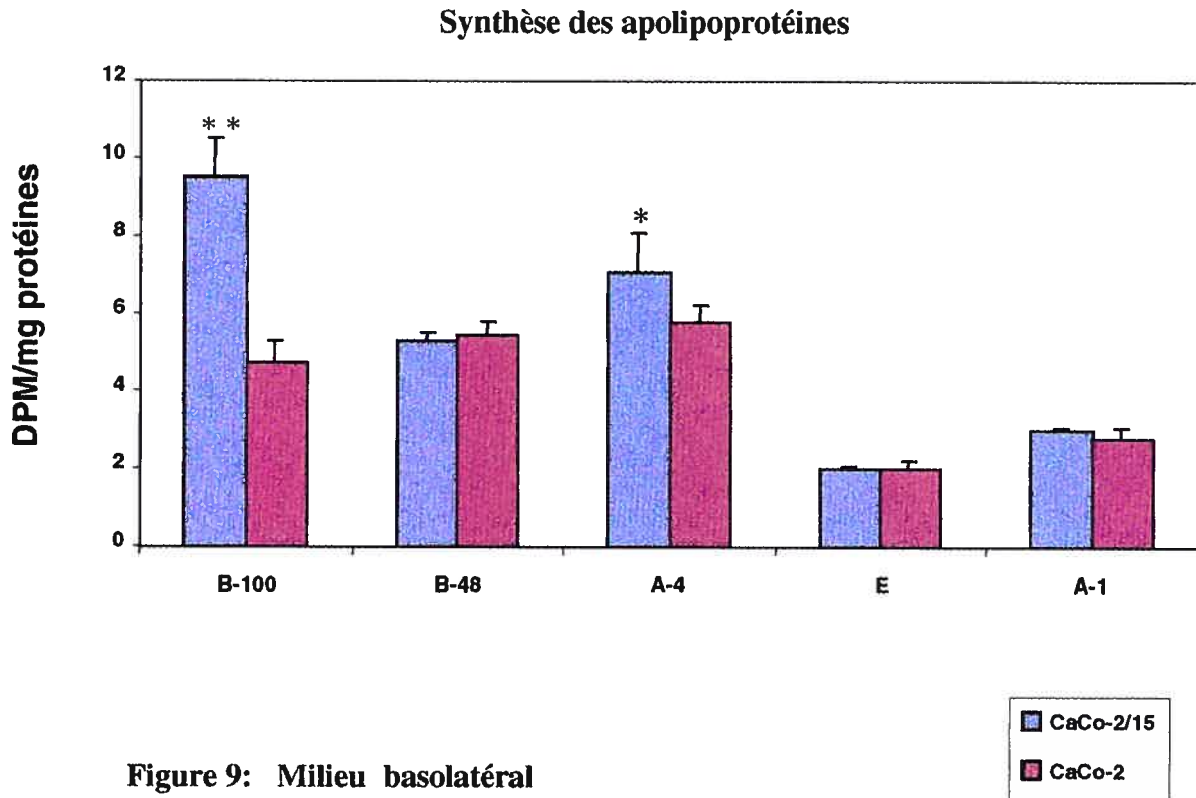
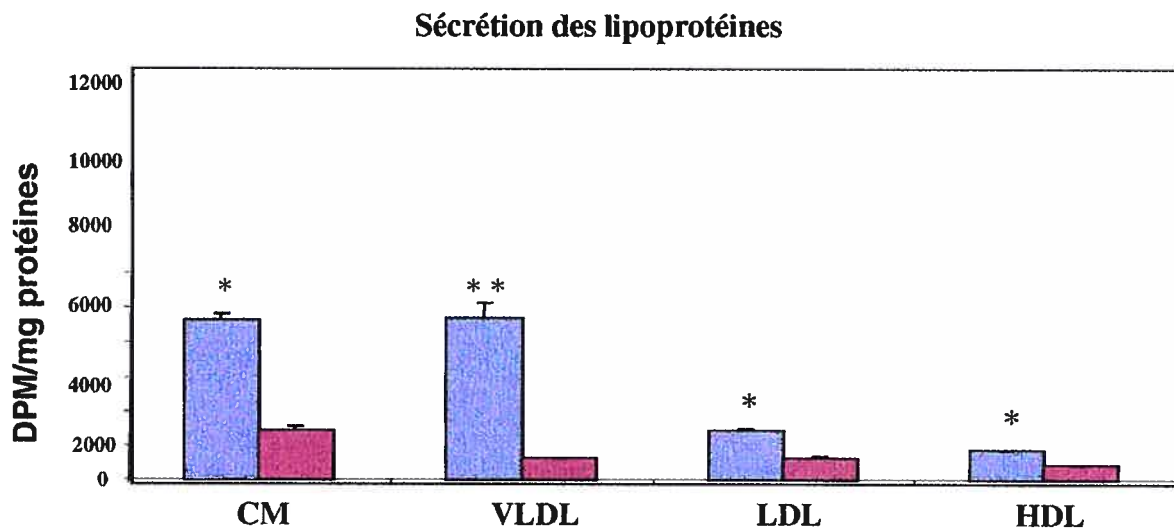


Figure 9: Milieu basolatéral



Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des n =3 expériences

\*\*p<0.00001, \*p<0.0002

**Effet des micelles de cholestérol libre et de l'anticorps bloquant SR-BI  
sur la viabilité cellulaire**

**Tableau 2:** incubations cellulaires

<b>Paramètre</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Micelles+Ab</b>
Résistance transépithéliale $\Omega/\text{cm}^2$	2046 $\pm$ 68	1865 $\pm$ 59
Sucrase U/l	220 $\pm$ 18	195 $\pm$ 15

Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des n =3 expériences  
Les test ont été effectué après 3 heures d'incubation sans ou avec les micelles  
+Ac SR-BI

**Tableau 3:** incubations basolatérales

<b>Paramètre</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Albumine+Ab</b>
Résistance transépithéliale $\Omega/\text{cm}^2$	2124 $\pm$ 78	2145 $\pm$ 53
Sucrase U/l	230 $\pm$ 12	210 $\pm$ 17

Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des n =3 expériences  
Les test ont été effectué après 3 heures d'incubation sans ou avec l' Ac SR-BI



Figure 10: Effet des inhibiteurs sur l'absorption de cholestérol

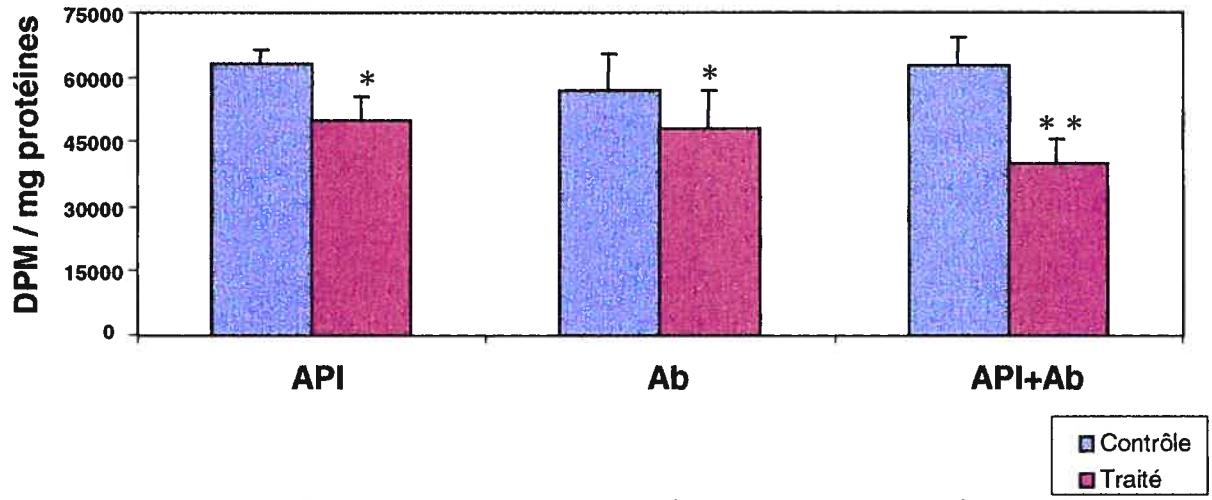


Figure 11: Effet des inhibiteurs sur l'estérification du cholestérol

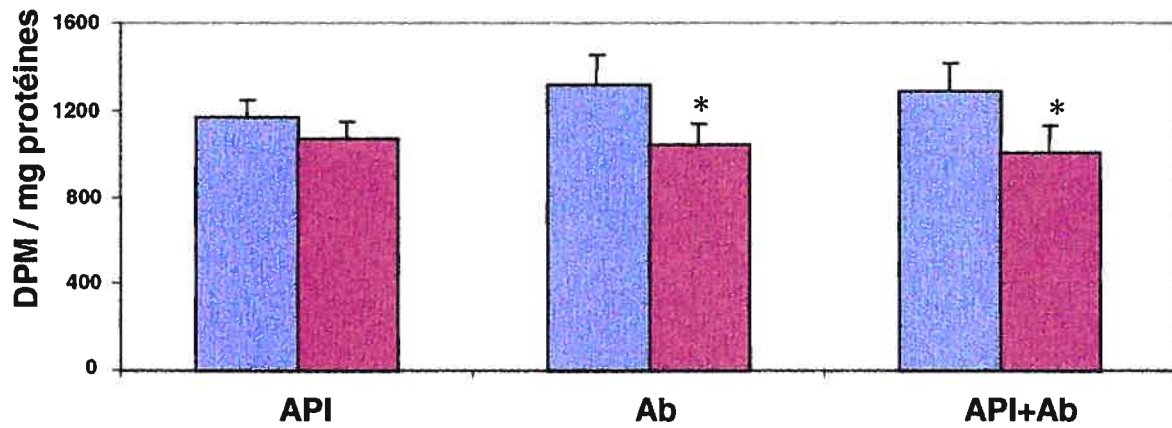
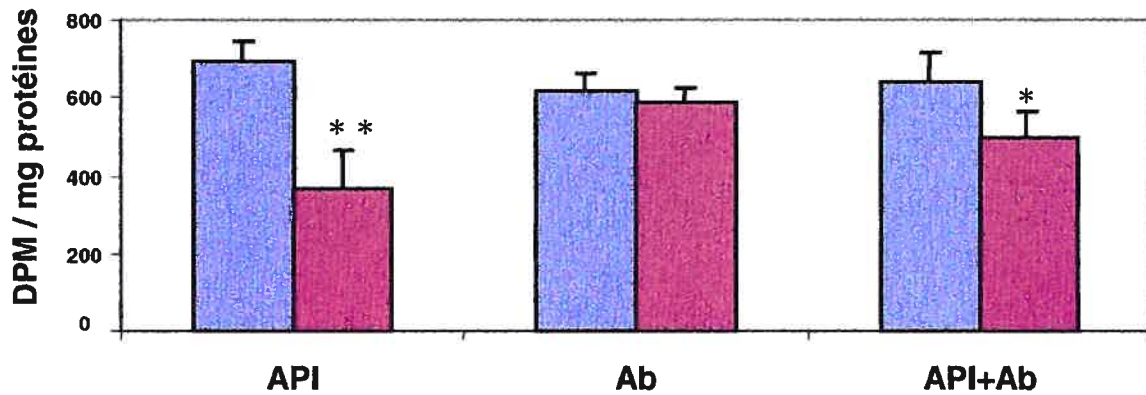


Figure 12: Effet des inhibiteurs sur l'influx de cholestérol du côté basolatéral



Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SE des n =3 expériences

\*\*p<0.00001, \*p<0.0001

## Discussion

Le présent travail étudie le rôle du récepteur scavenger classe B type I (SR-BI) dans l'absorption intestinale du cholestérol chez l'humain. Dans une première étape nous avons justifié l'utilisation préférable de la lignée cellulaire Caco-2/15 par rapport au modèle cellulaire traditionnel *in vitro* du transport et du métabolisme du cholestérol, les Caco-2 ATCC. Dans une seconde étape, nous avons employé les cellules Caco-2/15 pour évaluer le transport et le métabolisme du cholestérol. Pour cela, les cellules Caco-2/15 ont été incubées avec un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire fonctionnelle du SR-BI, capable d'inhiber la fonctionnalité de la protéine, ce qui nous a permis d'examiner son rôle dans l'absorption intestinale et dans les processus d'estérification intracellulaire du cholestérol. Les incubations ont été effectuées au niveau des deux pôles de la cellule, soit au pôle apical afin d'étudier l'absorption du cholestérol et au pôle basolatéral afin d'évaluer l'influx de cholestérol provenant de la circulation. De plus, le rôle du SR-BI dans le transport et le métabolisme de cholestérol dans les entérocytes a été comparé à celui d'un autre récepteur, le SR-AI impliqué surtout dans l'efflux du cholestérol. Par conséquent, en plus des incubations avec l'anticorps bloquant l'activité du SR-BI, l'acide polyinosinique, un puissant inhibiteur de l'activité du SR-AI, a été utilisé.

Comme mentionné auparavant, les cellules Caco-2/15 ont été comparées avec la lignée classique, les Caco-2 provenant de ATCC (American Type Culture Cells), de laquelle elles sont issues par clonage. Les cellules Caco-2 proviennent d'un carcinome de colon humain et constituent une lignée immortelle, ce qui leur procure un large avantage par rapport aux cellules intestinales matures provenant des biopsies tissulaires. De plus, leur origine humaine les rendent appropriées pour répondre aux objectifs de notre étude. Des études ont permis d'établir que ces cellules constituent un modèle fiable pour les études portant sur les processus de différenciation et de prolifération entérocytaire, les fonctions digestives et le transport de diverses molécules et médicaments (72,73). Toutefois, même si du point de vue fonctionnel et morphologique les Caco-2 ressemblent aux entérocytes fœtaux, elles démontrent une importante hétérogénéité des marqueurs de différenciation. Il a été effectivement démontré que

l'expression des principales enzymes de la bordure en brosse ainsi que la morphologie, l'organisation et le fonctionnement des jonctions serrées intercellulaires varient significativement entre les cellules en monocouche d'un même passage et entre les différents passages. De plus, les études du métabolisme des lipides effectuées dans notre laboratoire ont montré, à ce niveau, une hétérogénéité semblable. Toutes ces limites ont motivé la recherche de meilleurs modèles intestinaux.

L'équipe du Dr Beaulieu de l'Université de Sherbrooke a développé des clones des cellules Caco-2, les Caco-2/15. Ces clones cellulaires proviennent d'un nombre restreint des cellules démontrant un état de maturation supérieur et moins d'atypies cellulaires. Les analyses de ces clones ont également indiqué que la population cellulaire est plus homogène. Les caractéristiques morphologiques et les marqueurs de maturité (les enzymes et l'organisation de la bordure en brosse), ont dévoilé que ces cellules sont plus différenciées.

Étant donné l'importance du modèle cellulaire dans l'étude d'un récepteur impliqué dans le transport des lipides, récepteur s'exprimant et fonctionnant dans les entérocytes matures, une caractérisation du métabolisme lipidique des clones Caco-2/15, par rapport aux cellules d'origine, a d'abord été effectuée. Les marqueurs de l'état de maturité cellulaire analysés sont : la résistance transépithéliale qui reflète l'intégrité cellulaire, ainsi que la sucrase, enzyme de la bordure en brosse reflétant la maturation des entérocytes. La production des lipides, notamment la synthèse du cholestérol, la biogenèse des apolipoprotéines et l'assemblage des lipoprotéines ont aussi été évalués. De plus, la sécrétion de ces lipides et lipoprotéines au niveau basolatéral ainsi que l'activité de la ACAT et de la HMG-CoA réductase (les principales enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol) ont été investiguées.

Les expériences portant sur l'état de maturation cellulaire ont montré que les cellules Caco-2/15 expriment à 20 jours de différenciation un niveau significativement supérieur de sucrase, enzyme étroitement lié à la différenciation entérocytaire (72,73). De plus, des valeurs élevées de la résistance transépithéliale indiquent que les cellules de 20 jours en monocouche sont reliées entre elles par des jonctions serrées plus hermétiques et que, finalement, il y a une polarisation plus marquée de la cellule dans ses deux pôles, apical et basolatéral. À la lumière de ces résultats, on peut considérer que les cellules CaCo-2/15 sont plus matures et plus aptes à reproduire les fonctions complexes des entérocytes. Certaines de ces fonctions dépendent de

façon critique de l'état de différenciation cellulaire, comme par exemple la synthèse des apolipoprotéines, l'assemblage des lipoprotéines ou l'activité optimale de certaines enzymes ou transporteurs cellulaires (6,30).

Par la suite, le métabolisme lipidique des cellules CaCo-2/15 a été évalué, plus particulièrement le métabolisme du cholestérol vu l'importance du SR-BI dans son métabolisme.

Pour ce faire, l'incorporation d'acide oléique [ $^{14}\text{C}$ ] dans les différents types de lipides cellulaires a été évaluée. L'utilisation de l'acide oléique comme substrat a été sondée à court (2 heures), moyenne (8 heures) et long (24 heures) terme. De manière globale, le niveau des lipides dans le milieu cellulaire des cellules Caco-2/15 est significativement plus élevé par rapport aux cellules Caco-2 ATCC. Cependant, à plus long terme (24 heures), des plus grandes différences sont perceptibles entre les deux lignées cellulaires. Les différences les plus significatives ont été révélées dans les triglycérides et les deux fractions de cholestérol. Il est important de mentionner que la stimulation de la production des lipides par l'acide oléique entraîne et active non seulement les mécanismes de synthèse, mais aussi les processus d'estérification qui préparent les lipides nouvellement synthétisés pour les étapes subséquentes nécessaires au métabolisme et à la sécrétion de la membrane basolatérale. Ainsi, les fractions de lipides sont sécrétées par les cellules Caco-2/15 en plus grande quantité dans le milieu basolatéral. Ceci indique que, d'une part, les cellules sont plus actives d'un point de vue métabolique et que, d'une autre part, les systèmes de transport intracellulaires et transmembranaires sont plus efficaces. Dans le même ordre d'idées, l'activité des plus importantes enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique, la ACAT et la HMG-CoA réductase, est plus intense dans les cellules CaCo-2/15. L'activité de la HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante de la synthèse *de novo* du cholestérol, quantifiée par l'utilisation de l'acétate comme substrat de synthèse, est significativement plus élevée dans le cas des Caco-2/15. Le dosage direct de la ACAT, une des principales enzymes d'estérification des lipides, a aussi entraîné des résultats allant dans ce sens. En corrélation directe avec la synthèse et l'estérification des lipides cellulaires, la production des apolipoprotéines et la sécrétion des lipoprotéines est significativement augmentée. En effet, la synthèse accrue des triglycérides et du cholestérol est en rapport direct avec les valeurs importantes de VLDL et de chylomicrons, les principaux véhicules lipoprotéiques au niveau de l'intestin.

De plus, tous ces résultats sont constants d'une expérience à l'autre, d'un passage cellulaire à l'autre, ce qui indique que les clones Caco-2/15 constituent une population cellulaire plus homogène et moins variable que les cellules ATCC. Nous avons aussi démontré que ces cellules ont un métabolisme du cholestérol plus actif, soit une meilleure synthèse *de novo*, estérification et transport inter- et intracellulaire. De plus, le cholestérol a une importance majeure dans la structure et le fonctionnement des membranes cellulaires et il est reconnu comme un des facteurs impliqués dans la régulation des diverses fonctions cellulaires (11). Cette propriété est particulièrement importante pour notre projet qui a comme objectif principal de décrire le rôle d'un récepteur de cholestérol au niveau intestinal.

Dans la deuxième partie de l'étude, en utilisant comme modèle de l'épithélium intestinal, les cellules CaCo-2/15, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le SR-BI joue un rôle important dans le métabolisme de cholestérol au niveau intestinal. Les fonctions de ce récepteur ont été bien définies au niveau des organes impliqués dans le transport inverse du cholestérol, soit le foie et les tissus de synthèse des hormones stéroïdiennes. Bien que, la présence du SR-BI ait été signalée au niveau intestinal dans quelques études récentes (63, 66, 67), peu de données sont disponibles jusqu'à présent concernant son rôle à ce niveau. Dans nos propres observations et dans les études précédentes, la présence du SR-BI a été montrée surtout au niveau apical, mais aussi au niveau basolatéral de l'entérocyte. En considérant ce fait, nos expériences ont été réalisées aux deux pôles de la cellule. Afin de respecter les conditions physiologiques de la lumière intestinale, le cholestérol radioactif a été exposé au niveau apical des Caco-2/15 dans une préparation micellaire composée d'acides biliaires, de cholestérol et d'acides gras. Au niveau basolatéral, le pôle en contact avec les capillaires sanguins, le cholestérol a été complexé à l'albumine, un des transporteurs lipidiques dans la circulation. Des deux côtes cellulaires, le rôle du SR-BI a été évalué en utilisant un anticorps dirigé contre sa partie extracellulaire bloquant ainsi son activité. Par la suite, nous avons étudié, l'impact de l'inhibition du SR-BI sur l'absorption du cholestérol, son niveau intracellulaire, son estérification et de son influx du côté basolatéral de la cellule. L'implication du SR-BI dans le métabolisme du cholestérol intestinal a été évaluée en comparaison avec un autre récepteur de cholestérol de la même famille, le SR-AI. Ce dernier récepteur a été bloqué à l'aide d'un agent chimique, l'acide polyinosinique, inhibiteur qui n'influence aucunement l'activité du SR-BI.

De plus, des tests préalables ont établi que la préparation de micelles utilisée du côté apical, potentiellement nocives pour les cellules, n'affecte pas la viabilité cellulaire et, conséquemment ne modifie pas les résultats de l'inhibition du transport et du métabolisme de cholestérol par blocage des récepteurs.

Le SR-BI est un récepteur à ligands multiples, mais il démontre une plus haute affinité pour les HDL, plus précisément pour sa composante apolipoprotéique AI. Toutefois, dans le lumière intestinale, la plupart du cholestérol est présent sous forme libre et, à ce niveau, les apolipoprotéines sont pratiquement absentes. À ce effet, il a été démontré que le SR-BI peut influencer l'influx de cholestérol libre et ce, indépendamment de la liaison des apolipoprotéines (Stagl en 1998 et Williams en 1999). Donc, l'utilisation des micelles comme transporteur de cholestérol libre peut reproduire, le plus fidèlement possible, les conditions physiologiques au niveau intestinal.

Au niveau apical, les incubations avec l'anticorps anti SR-BI ont démontré une diminution de l'absorption du cholestérol de 16% par rapport aux cellules ATCC. Le blocage du SR-AI a inhibé de 20% l'incorporation du cholestérol radioactif. Par ailleurs, les expériences combinant l'anticorps anti SR-BI et l'acide polyinosinique ont conduit à une réduction du transport de cholestérol de 36%. De ces résultats, on conclut d'abord que le SR-BI possède certainement une fonction importante dans l'absorption du cholestérol alimentaire, mais qu'il n'est ni le seul, ni le plus important récepteur exerçant ce rôle. D'une autre part, les conditions d'incubation jouent, elles aussi un rôle important dans l'absorption du cholestérol. Ainsi, tel qu'observé *in vitro*, les facteurs non spécifiques comme le pH, la composition des micelles, la durée de l'incubation et l'état de différenciation cellulaire, influencent le taux de transport de cholestérol. De plus, il est connu que l'expression de la protéine SR-BI ainsi que sa fonctionnalité sont sensibles aux concentrations de cholestérol cellulaire notamment le cholestérol des cavéoles, les domaines membranaires spécialisés dans le transport des lipides. Finalement, le SR-BI semble avoir deux propriétés distinctes, soit l'affinité de liaison à diverses molécules et la fonction de transport de ces molécules à travers la membrane. La première propriété est influencée par les aspects qualitatifs de la molécule porteuse des lipides (dimension, composition, structure tridimensionnelle, etc.), tandis que l'aspect de transport semble relié à la présence et à l'activité d'une protéine cytoplasmique qui n'est pas identifiée à ce jour. Tous ces facteurs et probablement beaucoup d'autres encore inconnus, influencent et

modulent l'absorption des lipides selon les besoins cellulaires et métaboliques. Dans nos conditions expérimentales, l'inhibition des récepteurs SR-BI et SR-AI n'a permis de diminuer le transport de cholestérol que de 36%. En considérant que 10% du cholestérol est transporté d'une manière passive, il reste que 50% de son transport demeure inexpliqué ce qui suggère la participation d'autres joueurs dans l'absorption du cholestérol alimentaire. Il est aussi probable que l'anticorps anti-SR-BI de souris ne bloque que partiellement le récepteur exprimé dans des cellules humaines. Ce rendement d'inhibition correspond aux résultats rapportés par une autre équipe dans des modèles vésiculaires (Hauser et coll.,1998). En outre, certaines études sur des modèles cellulaires non intestinaux rapportent une diminution du transport des esters de cholestérol de 80 à 90 %. Il semble donc plus probable qu'il y ait d'autres récepteurs qui se partagent, avec le SR-BI et le SR-AI, la fonction d'absorber le cholestérol au niveau intestinal. Selon Hauser, le CD 36, un récepteur scavenger de la même famille que le SR-BI et qui n'est pas présent dans les cellules Caco-2, pourrait en faire partie. En effet, dans des préparations utilisant des vésicules de la bordure en brosse humaine, les anticorps de SR-BI ont bloqué l'absorption de cholestérol 20 % et les anticorps de CD 36 l'ont inhibé de 40%. D'un autre côté, comme certains récepteurs facilitent l'entrée du cholestérol, d'autres protéines pourraient probablement engendrer l'effet contraire. Un candidat possible pourrait être l'ABC 1 qui joue un rôle important dans l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages. Il semble donc que l'ABC 1 pourrait avoir une fonction inverse à celle du SR-BI dans les macrophages ( Tall, 2000). Il est donc fort possible que, même au niveau intestinal, une partie du cholestérol transporté par le SR-BI, le SR-AI ou le CD 36 soit largué à l'aide de l'ABC 1 dans la lumière intestinale afin de protéger l'entérocyte d'une surcharge lipidique.

Au niveau basolatéral, les incubations utilisant les mêmes inhibiteurs de SR-BI et SR-AI et l'albumine comme transporteur de cholestérol ont mis en évidence une diminution significative de 47% de l'influx de cholestérol par le SR-AI. Par contre, l'inhibition du SR-BI n'a influencé que légèrement (5%) le transport de cholestérol. Fait surprenant, l'ajout de l'anticorps SR-BI aux incubations utilisant l'acide polyinosinique a diminué l'effet de ce dernier de 47% à 22%. Toutefois, ces résultats concordent avec la distribution du SR-BI au niveau de l'entérocyte. En effet, les études d'identification du SR-BI dans l'intestin ( Cai, (2001), Lobo, (2001) et Altmann, (2002)) ont révélé une distribution différente du récepteur aux deux pôles de la cellule. Selon ces études le SR-BI est exprimé de façon plus importante

au niveau apical qu'au niveau basolatéral. Les résultats de l'inhibition du SR-BI sur les deux pôles cellulaires suivent donc cette distribution différente. En effet, une étude, de Lobo, (2001) a mis en évidence des faibles niveaux de SR-BI dans les cellules des cryptes intestinales où les fonctions d'absorption sont pratiquement inexistantes. Ces résultats indiquent des fonctions additionnelles possibles, encore inconnues du SR-BI au niveau de l'intestin. En plus, nous devons prendre en considération l'origine colique des cellules Caco-2/15, niveau où le SR-BI pourrait exercer des fonctions différentes de celles au niveau des entérocytes normaux. En considérant tous ces aspects, il semble qu'au niveau apical, le SR-BI représente une des principales molécules impliquées dans l'absorption intestinale de cholestérol. Pour les résultats au niveau basolatéral, au moins deux explications sont possibles. Il est possible, d'une part que le SR-BI ne joue qu'un rôle mineur dans l'influx de cholestérol provenant de la circulation. D'une autre part, le SR-BI pourrait faciliter le transport bidirectionnel du cholestérol selon les besoins et les réserves cellulaires en cholestérol, surtout en rapport avec le cholestérol membranaire. Cette observation suggère des rôles possiblement divergentes du SR-BI dans l'entérocyte, une fonction apicale facilitant l'influx et une autre fonction basolatérale influençant l'efflux et l'influx de cholestérol.

Deux études récentes démontrent que le SR-BI n'est pas un simple récepteur facilitant le transport des lipides à travers les membranes, mais il influencerait aussi la redistribution et la bio disponibilité du cholestérol au niveau des domaines membranaires spécialisés dans le transport des lipides (Stangl (1998) et Kellner (2000)). Ces résultats indiquent que le SR-BI n'est pas seulement un récepteur passif qui favorise le transport des lipides, mais il peut être en mesure de moduler de façon subtile son activité, selon les besoins physiologiques. Nos incubations au niveau apical ont aussi démontré que la diminution de l'absorption du cholestérol, par l'inhibition sélective du SR-BI, est aussi accompagnée d'une diminution significative (21%) du taux d'estérification cellulaire du cholestérol alimentaire. Il est bien connu que l'activité de la ACAT, l'enzyme cellulaire estérifiant le cholestérol libre, est hautement modulée par la quantité de cholestérol libre disponible au niveau cellulaire. Il est donc possible qu'en facilitant le transport cellulaire de cholestérol, le SR-BI influence indirectement le taux d'estérification. Toutefois, l'inhibition du SR-BI et du transport de cholestérol via ce récepteur n'influence pas son métabolisme intracellulaire. Il est donc fort probable que l'expression et le fonctionnement du SR-BI influencent d'une manière directe



l'activité de la ACAT. Plusieurs études appuient cette hypothèse en démontrant que le transport intracellulaire du cholestérol via le SR-BI module de façon importante l'expression des gènes et des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol, comme la HMG-CoA réductase, la ACAT et la protéine SREBP (Williams et coll. (1999), Stangl et coll. (1999) et Tall et coll. (2000)).

En conclusion il semble que le cholestérol et un de ses transporteurs, le SR-BI, jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme des lipides au niveau cellulaire. Cette observation est valable pour l'intestin comme pour les autres organes faisant partie du système impliqué dans l'homéostasie du cholestérol. Il a déjà été démontré que le cholestérol de la diète influence l'expression du SR-BI au niveau du foie, organe clé dans le métabolisme général de l'organisme (Tall et coll., 2001). Cette régulation s'effectue par une diminution de l'expression et de l'activité du SR-BI au niveau des hépatocytes et par une augmentation de l'activité de transport au niveau des cellules macrophagiques du foie, les cellules Kupffer. Autre fait intéressant, l'expression du SR-BI au niveau hépatique est corrélée à celle au niveau intestinal, puisqu'à ce niveau on remarque aussi une diminution similaire de l'expression du SR-BI. Ces modifications ont des effets systémiques sur le métabolisme et le transport des lipoprotéines, surtout pour le transport inverse de cholestérol. On attribue à ce transport des effets protecteurs contre l'accumulation des lipides dans les parois des vaisseaux et dans le développement des désordres associés à l'athérosclérose. Une partie du cholestérol mobilisé par le transport inverse du cholestérol est captée par les tissus de synthèse des hormones stéroïdiennes, via le même SR-BI. Le foie élimine aussi une partie importante de ce cholestérol dans l'intestin via la bile qui est un élément essentiel dans l'absorption intestinale des lipides. D'une façon opposée, des études récentes ont démontré que l'expression du SR-BI intestinal est abaissée dans la déficience biliaire (Breslow, 1998, Rigotti, 2001 et Voshol, 2001). Ainsi, le cholestérol d'origine intestinale influence le métabolisme des lipides au niveau du foie qui, à son tour module leur métabolisme intestinal par un mécanisme type «feed-back». En conclusion, toutes ces observations contribuent à renforcer un nouveau concept qui inclut l'intestin comme partie métabolique active et importante dans un système général de contrôle et de régulation du métabolisme des lipides,.

Le SR-BI est le premier récepteur impliqué d'une manière importante dans l'absorption des lipides. Connue aussi comme un élément important dans le métabolisme et l'homéostasie du cholestérol, par son intervention sur le HDL-cholestérol, il affecte le turnover total du cholestérol en influençant aussi son absorption intestinale. La présence d'un polymorphisme affectant le gène responsable de son expression, ainsi que l'existence des deux isoformes, SR-BI et SR-BII, montrant des différences importantes sur l'efficacité du transport, pourrait expliquer en partie les variations amples interindividuelles de l'absorption du cholestérol. L'identification et la caractérisation d'un tel récepteur jouant un rôle crucial dans le transport des lipides alimentaires laisse envisager la possibilité de modifier ce transport. Le contrôle de l'absorption des lipides, semble être un moyen encourageant de lutter contre l'obésité et l'hypercholestérolémie, deux facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose.

## Références

1. **T. Yamada, D. Alpers, C. Owyang, D. W. Powell, F. Silverstein** 1995 Textbook of Gastroenterology — J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
2. **M. Feldman, L. Friedman, M. Slisenger** 2002 Gastrointestinal and Liver Disease, Ed. Saunders.
3. **O. Shils, P. Olson, J. Shine, T. Ross** - Modern Nutrition in Health and Disease Williams and Wilkins, 1999.
4. **C. Ricour, J. Ghisolfi, G. Putet, O. Goulet** - Traité De Nutrition Pédiatrique, Ed. Maloine, Paris, 1996.
5. **K. Murray, D. Granner, P. Mayes, V. Rodwell** – Harper's Précis de Biochimie, Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 2000.
6. Human Gastrointestinal Development – Ed. Lebenthal. Raven Press, New York, 1989.
7. **E. Levy** 1992 - Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absorption, Can. J. Physiol. Pharmacol. 70 : 413-419.
8. **I. Goldberg, Y. Kako, E. Lutz** 2000 - Responses to eating: lipoproteins, lipolytic products and atherosclerosis, Current Opinion in Lipidology, 11 : 235-241.
9. **Y. Osono, L. Woollett, K. Marotti, G. Melchior, J. Dietschy**, 1995 - Centripetal cholesterol flux from extrahepatic organs to the liver is independent of the concentration of high density lipoprotein-cholesterol in plasma – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 : 4114-4119.
10. **K. Alam, R. Meidell, D. Spady** 2001 - Effect of Up-regulating Individual Steps in the Reverse Cholesterol Transport Pathway on Reverse Cholesterol Transport in Normolipidemic Mice, The Journal of Biological Chemistry, 267 : 15641-15649.
11. **K. Simons, R. Elhehalt** 2002 - Biology and biochemistry of cholesterol, J. Clin. Invest. 110 : 597-603.
12. **G. Rothblat, M. de la Llera-Moya, V. Atger, G. Kellner, D. Williams, M.**

- Phillips** 1999 - Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights, *Journal of Lipid Research*, 40 : 781-796.
13. **L. Liscum, K. Underwood** 1995 - Intracellular Cholesterol Transport and Compartmentation, *The Journal of Biological Chemistry*, 270 : 15443-15446.
  14. **I. Tabas** 2002 - Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications, *J. Clin. Invest.* 110 : 905-911.
  15. **A. Tall, P. Costet, N. Wang**, 2002 - Regulation and mechanism of macrophage cholesterol efflux, *J. Clin. Invest.* 110 : 899-904.
  16. **F. Field, E. Born, S. Murthy, S. Mathur**, 1998 - Caveolin is present in intestinal cells: role in cholesterol trafficking?, *Journal of Lipid Research* 39 : 1938-1950.
  17. **A. La Ville, R. Sola, J. Balanya, P. Turner, L. Masana**, 1993 - In vitro oxidized HDL is recognised by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role in vivo, *Atherosclerosis*, 105 : 179-189.
  18. **D. Calvo, M. Vega**, 1993 - Identification, Primary Structure, and distribution of CLA-1, a novel Member of the CD36/LIMPII Gene Family, *The Journal of Biological Chemistry*, 268 : 18929-18935.
  19. **K. Murao, V. Terpstra, S. Green, N. Kondratenko, D. Steinberg, O. Quehenberger**, 1996 - Characterization of CLA-1, a Human Homologue of Rodent Scavenger Receptor BI, as a Receptor for High Density Lipoprotein and Apoptotic Thymocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 17551-17557.
  20. **S. Acton, A. Rigotti, K. Landschultz, S. Xu, H. Hobbs, M. Krieger**, 1996 - Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor, *Science*, 271 : 518-520.
  21. **A. Rigotti, E. Edelman, P. Seifert, S. Iqball, R. DeMattos, R. Temel, M. Krieger, D. Williams**, 1996 - Regulation by Adrenocorticotrophic Hormone of the In Vivo Expression of Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI), a High Density Lipoprotein Receptor, in Steroidogenic Cells of Murine Adrenal Gland, *The Journal of Biological Chemistry*, 271 : 33545-33549.
  22. **G. Cao, C. Garcia, K. Wync, R. Schultz, K. Parker, H. Hobbs** 1997, Structure and Localisation of the Human Gene Encoding SR-BI/CLA-1, *The Journal of*

Biological Chemistry, 272 : 33068-33076.

23. **J. Ji, B. Jian, N. Wang, Y. Sun, M. de la Llera Moya, M. Phillips, A. Tall**, 1997 - Scavenger Receptor BI Promotes High Density Lipoprotein-mediated Cellular Cholesterol Efflux, *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 20982-20985.
24. **R. Temel, B. Trigatti, R. DeMattos, S. Azhar, M. Krieger, D. Williams**, 1997 - Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high adrenocortical cells, *Proc. Natl. Acad. Science*, 94 : 13600-13605.
25. **M. Lougheed, C. Lum, W. Ling, H. Suzuki, T. Kodama, U. Steinbrecher**, 1997 - High Affinity Saturable Uptake of Oxidized Low Density Lipoprotein by Macrophages from Mice Lacking the Scavenger Receptor Class A Type I/II, *The Journal of Biological Chemistry*, 272 : 12938-12944.
26. **M. de la Llera-Moya, G. Rothblat, M. Connelly, G. Kellner-Weibel, S. Sakr, M. Phillips, D. Williams**, 1999 - Scavenger Receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of the HDL tethering to the cell surface, *Journal of Lipid Research*, 40 : 575-580.
27. **N. Wang, T. Arai, Y. Ji, F. Rinninger, A. Tall**, 1998 - Liver-Specific Overexpression of Scavenger Receptor BI Decreases Levels of Very Low Density Lipoprotein ApoB, *Low Density Lipoprotein ApoB and High Density Lipoprotein in Transgenic Mice*, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 32920-32926.
28. **M. Varban, F. Rinninger, N. Wang, V. Fairchild-Huntress, J. Dunmore, Q. Fang, M. Gosselin, K. Dixon, J. Deeds, S. Acton, A. Tall, D. Huszar**, 1998 - Targeted mutations reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol, *Proc Natl. Acad. Sci.* 95 : 4619-4624.
29. **B Jian, M. de la Llera-Moya, Y. Ji, N. Wang, M. Phillips, J. Swaney, A. Tall, G. Rothblat**, 1998 - Scavenger Receptor Class B Type I as a Mediator of Cellular Cholesterol Efflux to Lipoproteins and Phospholipid Acceptors, *The Journal of Biological Chemistry*, 273 : 5599-5606.
30. **H. Stangl, G. Cao, K. Wyne, H. Hobbs**, 1998 - Scavenger Receptor Class B, TypeI-dependent stimulation of Cholesterol Esterification by High Density Lipoproteins, *Low Density Lipoproteins and Nonlipoprotein Cholesterol*, *The*

Journal of Biological Chemistry, 273 : 31002-31008.

31. **X. Gu, B. Trigatti, S. Xu, S. Acton, J. Babitt, M. Krieger**, 1998 - The Efficient Cellular Uptake of High Density Lipoproteins Lipids via Scavenger Receptor Class B Type I Requires Not Only Receptor-mediated Surface Binding but Also Receptor-specific Lipid Transfer Mediated by Its Extracellular Domain, The Journal of Biological Chemistry, 273 : 26338-26348.
32. **B. Trigatti, H. Rayburn, M. Vinals, A. Braun, H. Miettinen, M. Penman, M. Hertz, M. Schrenzel, L. Amigo, A. Amigo, A. Rigotti**, 1999 - Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology, Proc. Natl. Acad. Sci., 96 : 9322-9327.
33. **H. Stangl, M. Hyatt, H. Hobbs**, 1999 - Transport of Lipids from High and Low Density Lipoproteins via Scavenger Receptor, The Journal of Biological Chemistry, 274 : 32692-32698.
34. **K. Hirano, S. Yamashita, Y. Nakagawa, T. Ohya, F. Matsuura, K. Tsukamoto, Y. Okamoto, A. Matsuyama, K. Matsumoto, Y. Matsuzawa**, 1999 – Expression of Human Scavenger Receptor Class B Type I in Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages and Atherosclerotic Lesions, Circ. Res. 85 : 108-116.
35. **M. Connelly, S. Klein, S. Azhar, N. Abumrad**, 1999 - Comparison of Class B Scavenger Receptor, CD36 and Scavenger Receptor BI (SR-BI), Shows That Both Receptors Mediate High Density Lipoprotein-Cholesteryl Ester Selective Uptake but SR-BI Exhibits a Unique Enhancement of Cholesteryl Ester Uptake, The Journal of Biological Chemistry, 274 : 41-47.
36. **Y. Ueda, L. Royer, E. Gong, J. Zhang, P. Cooper, O. Francones, E. Rubin**, 1999 - Lower Plasma Levels and Accelerated Clearance of High Density Lipoprotein (HDL) and Non-HDL Cholesterol in Scavenger Receptor Class B Type I Transgenic Mice, The Journal of Biological Chemistry, 274 : 7165-7171.
37. **S. Swarnakar, R. Temel, M. Connelly, S. Azhar, D. Williams**, 1999 - Scavenger Receptor Class B, Type I, Mediates Selective Uptake of Low Density Lipoprotein Cholesteryl Ester, The Journal of Biological Chemistry, 274 : 29733-29739.
38. **Y. Ji, N. Wang, R. Ramakrishnan, E. Sehayek, D. Huszar, Y. Breslow, A. Tall**,

- 1999 - Hepatic Scavenger Receptor BI Promotes Rapid Clearance of High Density Lipoprotein Free Cholesterol and Its Transport into Bile, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 : 33398-33402.
39. **K. Fluiter, W. Sattler, M. De Beer, P. Connell, D. van der Wethuyzen, T. van Berkel**, 1999 - Scavenger Receptor BI Mediates the Selective Uptake of Oxidized Cholesterol Esters by Rat Liver, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 : 8893-8899.
40. **B. Trigatti, A. Rigotti, M. Krieger**, 2000 - The role of high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism, *Current Opinion in Lipidology*, 11 : 123-131.
41. **W. Chen, D. Silver, J. Smith, A. Tall**, 2000 - Scavenger Receptor BI (SR-BI) inhibits ATP binding cassette transporter 1 (ABC1)-mediated cholesterol efflux in macrophages, *The Journal of Biological Chemistry*.
42. **X. Gu, K. Kozarsky, M. Krieger**, 2000 - Scavenger Receptor Class B, Type I-mediated [<sup>3</sup>H] Cholesterol Efflux to High and Low Density Lipoprotein Binding to the Receptor, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 : 29993-30001.
43. **Y. Ueda, E. Gong, L. Royer, P. Cooper, O. Francones, E. Rubin**, 2000 - Relationship between Expression Levels and Atherogenesis in Scavenger Receptor Class B, Type I Transgenics, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 : 20368-20373.
44. **A. Pilon, O. Briand, S. Lestavel, C. Copin, Z. Majd, J. Fruchart, G. Castro, V. Clavey**, 2000 - Apolipoprotein AII Enrichment of HDL Enhances Their Affinity for Class B Type I Scavenger Receptor but Inhibits Specific Cholesteryl Ester Uptake, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 : 1074-1081.
45. **W. Villiers, L. Cai, N. Webb, M. de Beer, D. van der Westhuyzen, F. de Beer**, 2001 - CD36 does not play a direct role in HDL or LDL metabolism, *Journal of Lipid Research*, 42 : 1231-1238.
46. **D. Silvester, N. Wang, X. Xiao, A. Tall**, 2001 - High Density Lipoprotein (HDL) Particle Uptake Mediated by Scavenger Receptor Class B Type I Results in Selective Sorting of HDL Cholesterol from Protein and Polarized Cholesterol

- Secretion, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 : 25287-25293.
47. **H. Miettinen, H. Rayburn, M. Krieger**, 2001 - Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice, *The Journal of Clinical Investigation*, 108 : 1717-1722.
  48. **M. de Beer, D. Durbin, L. Cai, N. Mirocha, A. Jonas, N. Webb, F. de Beer, D. van der Westhuyzen**, 2001 - Apolipoprotein A-II Modulates the Binding and Selective Lipid Uptake of Reconstituted High Density Lipoprotein by Scavenger Receptor BI, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 : 15832-15839.
  49. **E. Scarselli, H. Ansuini, R. Cerino, R. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, A. Vitelli**, 2002 - The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus, *The EMBO Journal*, 21 : 5017-5025.
  50. **P. Frank, Y. Marcel, M. Connelly, D. Lublin, V. Franklin, D. Williams, M. Lisanti**, 2002 - Stabilisation of Caveolin-1 by Cellular Cholesterol and Scavenger Receptor Class B Type I, *Biochemistry*, 41 : 11931-11940.
  51. **N. Webb, L. Cai, K. Ziemba, J. Yu, M. Kindy, D. van der Westhuyzen, F. de Beer**, 2002 - The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake, *Journal of Lipid Research*, 43 : 1890-1898.
  52. **J. Husemann, J. Loike, R. Anankov, M. Febbraio, S. Silverstein**, 2002 - Scavenger Receptors in Neurobiology and Neuropathology: Their Role on Microglia and Other Cells of the Nervous System, *GLIA*, 40 : 195-205.
  53. **N. Webb, M. de Beer, J. Yu, M. Kindy, A. Daugherty, D. van der Westhuyzen, F. de Beer**, 2002 - Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice, *Journal of Lipid Research*, 43 : 1421-1428.
  54. **B. Liu, M. Krieger**, 2002 - Highly Purified Scavenger Receptor Class B, Type I Reconstituted into Phosphatidylcholine/Cholesterol Liposomes Mediates High Affinity High Density Lipoprotein Binding and Selective Lipid Uptake, *The Journal of Biological Chemistry*, 277 : 34125-34135.
  55. **S. Bultel, S. Lestavel, A. Pilon, I. Laffont, A. Tailleux, J. Fruchart, G. Siest, V.**



- Clavey**, 2002 - Lipid free apolipoprotein E binds to SR-BI and enhances cholesteryl ester uptake from lipoproteins, *Journal of Biological Chemistry*.
56. **R. Temel, R. Walzem, C. Banka, D. Williams**, 2002 - Apolipoprotein A-I Is Necessary for the *in Vivo* Formation of High Density Lipoprotein Competent for Scavenger Receptor BI-mediated Cholesteryl Ester-selective Uptake, *The Journal of Biological Chemistry*, 227 : 26565-26572.
  57. **T. Nieland, M. Penman, L. Dori, M. Krieger, T. Kierchhausen**, 2002 - Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI, *PNAS*, 99 : 15422-15427.
  58. **I. Suc, S. Brunet, G. Mitchell, G-E. Rivard, E Levy**, 2002 - Oxydative tyrosylation of high density lipoproteins impairs cholesterol efflux from mouse J774 macrophages: role of scavenger receptors, class A and B, *Journal of Cell Science*, 116 : 89-99.
  59. **S. Hong, Y. Kim, Y. Yoon, W. Min, S. Chun, J. Kim**, 2002 - Association between HaeIII polymorphism of scavenger receptor class B type I gene and plasma HDL-cholesterol concentration, *Ann Clin Biochem*, 39 : 478-481.
  60. **S. Acton, D. Osgood, M. Donoghue, D. Corella, M. Pocovi, A. Cenarro, P. Mozas, J. Keilty, S. Squazzo, E. Woolf, J. Ordovas**, 1999 - Association of Polymorphisms at the SR-BI Gene Locus With Plasma Lipid Levels and Body Mass Index in a White Population, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 19 : 1734-1743.
  61. **S. Compassi, M. Werder, F. Weber, D. Boffelli, H. Hauser, G. Schulthess**, 1997 - Comparison of Cholesterol And Sitosterol Uptake in Different Brush Border Membranes Models, *Biochemistry*, 36 : 6643-6652.
  62. **D. Boffelli, S. Compassi, M. Werder, F. Weber, M. Phillips, G. Schulthess, H. Hauser**, 1997 - The uptake of cholesterol at the small-intestinal brush border membrane is inhibited by apolipoproteins, *FEBS*, 411 : 711.
  63. **H. Hauser, J. Dyer, A. Nandy, M. Vega, M. Werder, E. Bieliauskaite, F. Weber, S. Compassi, A. Gemperli, D. Boffelli, E. Wehrli, G. Schulthess, M. Phillips**, 1998 - Identification of a Receptor Mediating Absorbtion of Dietary Cholesterol in the Intestine, *Biochemistry*, 37 : 17843-17850.

64. **G. Schulthess, S. Compassi, M. Werder, C-H. Han, M. Phillips, H. Hauser,** 2000 - Intestinal Sterol Absorption Mediated by Scavenger Receptors Is Competitively Inhibited by Amphiphatic Peptides and Proteins, *Biochemistry*, 39 : 12623-12631.
65. **P. Voshol, M. Schwarz, A. Rigotti, M. Krieger, A. Groen, F. Kuipers,** 2001 - Down- regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) Expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine, *Biochemical Journal*, 356 : 317-325.
66. **S. Cai, J. Kirby, P. Howles, D. Hui,** 2001 - Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine, *Journal of Lipid Research*, 42 : 902-909.
67. **M. Lobo, L. Huerta, N. Ruiz-Velasco, E. Teixeira, P. de la Cueva, A. Celdran, A. Martin-Hidalgo, M. Vega, R. Bragado,** 2001 - Localization of the Lipid Receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the Human Gastrointestinal Tract: Towards the Identification of Receptor Mediating the Intestinal Absorption of Dietary Lipids, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49 : 1253-1260.
68. **M. Werder, C-H. Han, E. Wehrli, D. Bimmler, G. Schulthess, H. Hauser,** 2001 - Role of Scavenger Receptor SR-BI and CD36 in Selective Sterol Uptake in the Small Intestine, *Biochemistry*, 40 : 11643-11650.
69. **E. Sehayek, J. Ono, S. Shefer, L. Nguyen, N. Wang, A. Batta, G. Salen, J. Smith, A. Tall, J. Breslow,** 1998 - Biliary cholesterol excretion: A novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 95 : 10194-10199.
70. **P. Mardones, V. Quinones, L. Amigo, M. Moreno, J. F. Miquel, M. Schwarz, H. Miettinen, B. Trigatti, M. Krieger, S. VanPatten, D. Cohen, A. Rigotti,** 2001 - Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice, *Journal of Lipid Research*, 42 : 170-180.
71. **S. Altmann, H. Davis, X. Yao, M. Lavery, D. Compton, L. Zhu, J. Crona, M. Caplen, L. Hoos, G. Tetzloff, T. Priestley, D. Burnett, C. Strader, M. Graziano,**

2002 - The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1580 : 77-93.

72. **L-P. Pageot, N. Perreault, N. Basora, C. Francoeur, P. Magny, J-F. Beaulieu**, 2000 - Human Cell Models To Study Small Intestinal Functions: Recapitulation of the Crypt-Villus Axis, *Microscopy Research And Technique*, 49 : 384-406.
73. **R. Gauthier, C. Harnois, J-F. Drolet, J. Reed, A. Vezina, P. Vachon**, 2001 - Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms, *Am J Physiol Cell Physiol.*, 280 : 1540-1554.
74. **G. Graf, P. Connell, D. van der Westhuyzen, E. Smart**, 1999 - The Class B, Type I Scavenger Receptor Promotes the Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesterol Esters into Caveolae, *The Journal of Biologic Chemistry*, 274 : 12043-12048.
75. **S. Matveev, A. Uittenbogaard, D. van der Westhuyzen, E. Smart**, 2001 - Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester, *Eur. J. Biochem.*, 268 : 5609-5616.
76. **A. Uittenbogaard, W. Everson, S. Matveev, E. Smart**, 2001 - Cholesteryl Ester Is Transported from Caveolae to Internal Membranes as Part of a Caveolin-Annexin II Lipid-Protein Complex, *The Journal of Biological Chemistry*, 277 : 4925-4931.
77. **Y. Ueda, E. Gong, L. Royers, P. Cooper, O. Francone, E. Rubin**, 2000 - Relationship between Expression Levels and Atherogenesis in Scavenger Receptor Scavenger Receptor Class B, Type I Transgenics, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 : 20368-20373.
78. **Y. Ji, N. Wang, R. Ramakrishnan, E. Sehayek, D. Huszhar, J. Breslow, A. Tall**, 1999 - Hepatic Scavenger Receptor BI Promotes Rapid Clearance of High Density Lipoprotein Free Cholesterol and Its Transport into Bile, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 : 33398-33402.
79. **M. Krieger**, 1999 - Charting the fate of the "good cholesterol" : Identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI, *Annu.*

Rev. Biochem., 8 : 523-558.

80. **S. Azhar, E. Reaven**, 2002 – Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 195 : 1-26.
81. **P. Vachon, J.F. Beaulieu**, 1992 – Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line, *Gastroenterology*, 1034: 414-423
82. **J.F. Beaulieu A. Quaroni**, 1991 -.Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells, *Biochemical Journal*, 280: 599-