

2111-55-55-6

Université de Montréal

**Modulation de la différenciation cellulaire, des  
apolipoprotéines et des lipoprotéines  
par l'acide rétinoïque**

par  
Émilie Grenier

11805332

Département de Nutrition  
Faculté de Médecine

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

Maître ès sciences (M.Sc.)  
avec mémoire

Avril 2007

© Émilie Grenier, 2007





## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Modulation de la différenciation cellulaire, des apolipoprotéines  
et des lipoprotéines par l'acide rétinoïque

présenté par :  
Émilie Grenier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Olivier Receveur	Président du jury
Dr Emile Levy	Directeur de recherche
Dr Victor Gavino	Membre du jury

## RÉSUMÉ

Les rétinoïdes sont essentiels à une variété de processus cruciaux à la vie. Ils sont notamment impliqués dans le mécanisme de la vision, le maintien de la santé osseuse et la spermatogenèse. Ils occupent aussi un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaire d'où leur implication dans les traitements contre le cancer. Cependant, leurs mécanismes d'action sont encore très mal compris et ceci est particulièrement vrai pour l'intestin. Ce dernier exerce pourtant des fonctions primordiales pour l'absorption et le métabolisme de la vitamine A. Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation négative entre le taux sanguin des lipoprotéines de haute densité (HDL) et les risques de maladies cardiovasculaires. Ces taux de HDL sont reliés aux taux d'apolipoprotéine A-I (apo A-I) puisque celle-ci fait partie intégrante de la structure des HDL. L'apo A-I est en partie synthétisée par l'intestin et contient un élément de réponse de l'AR (RARE) sur son promoteur. Le but de notre étude vise à établir si l'acide rétinoïque (AR) peut agir sur des cellules intestinales humaines et modifier le cycle cellulaire par la modulation des cyclines, favoriser la différenciation cellulaire via des protéines clés (PI3K, p38MAPK, CDX2), influencer des facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme des lipides (RXRs, RARs, PPARs, LXRs), augmenter l'expression génique et protéique de l'apolipoprotéine (apo) A-I et la production des HDL. Pour ce faire, des cellules Caco-2 ont été incubées avec 10  $\mu$ M d'AR 9-cis à différents temps de confluence. La synthèse de protéines a été étudiée par gel d'électrophorèse, l'expression protéique par Western blot et les transcripts relatifs aux facteurs de transcription par PCR. Nos résultats révèlent que l'AR inhibe la prolifération cellulaire et stimule la différenciation puisqu'elle 1) diminue l'incorporation de thymidine radioactive; 2) diminue l'expression de la cycline D1 et 3) augmente la cycline D3, la p38 MAPK et le CDX2. Toutefois, l'AR n'a un effet sur la synthèse de l'apolipoprotéine A-I qu'en présence du 22-hydroxycholestérol. Seule l'expression des gènes PPAR $\beta$ , RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  est augmentée en présence d'AR tandis que celle des PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , et RXR $\gamma$  ne présente aucun changement. Nos résultats suggèrent donc que l'AR induit la différenciation cellulaire mais ne module pas l'apolipoprotéine A-I sauf

en présence du 22-OH-cholestérol.

**MOTS-CLÉ**

Rétinoïdes, apolipoprotéines, lipoprotéines, facteurs nucléaires

## **ABSTRACT**

At present, dietary vitamin A and its active metabolites, collectively known as retinoids, are considered essential nutrients for many functions as well as potent regulators of gene transcription and growth. Although the epithelium of the small intestine is characterized by rapid and constant renewal and enterocytes play a central role in the absorption and metabolism of alimentary retinol, very little is known about the function of retinoids in the human gastrointestinal epithelium, and mechanisms by which programs engage the cell cycle are poorly understood. We have therefore assessed the effects of 9- and 13-cis-retinoic acid (RA) on proliferation and differentiation processes, as well as on lipid esterification, apolipoprotein (apo) biogenesis and lipoprotein secretion along with nuclear factor gene transcription. Treatment of Caco-2 cells with RA at different concentrations and incubation periods revealed the reduction of thymidine incorporation in 60% pre-confluent or 0 confluent cells. Concomitant with this cell proliferation decline, RA (i) modulated D-type cyclins (cell cycle regulatory proteins) by reducing the mitogen-sensitive cyclin D1 expression (thereby blocking DNA synthesis and cell proliferation) and upregulating cyclin D3 expression (thereby inducing cell differentiation); and (ii) exhibited a trend of increase in p38 MAPK, which triggers CDX2, a central protein in cell differentiation. Despite the induction of cell differentiation, RA remained without effect on lipoprotein output and apo synthesis, even for apo A-I that possesses retinoic-response element in its promoter. In combination with 22-OH, retinoic acid could induce apo A-I gene expression without any impact on apo A-I mass. Only the gene expression of PPAR $\beta$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  was augmented and no alteration was noted in PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , and RXR $\gamma$ . Taken together, these data highlight RA-induced cell differentiation via specific signalling and RA-mediated apo A-I and particular isoforms of PPAR and RAR gene expression when coupled with 22-OH.

### **KEYWORDS**

Retinoids, apolipoproteins, lipoproteins, nuclear factors

# TABLE DES MATIÈRES

Page de titre.....	i
Page d'identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
I. INTRODUCTION.....	1
1. LA VITAMINE A .....	1
1.1 Caractéristiques générales.....	1
1.2 Dérivés de la vitamine A.....	2
1.3 Vitamine A et santé .....	3
1.4 Transport et métabolisme de la vitamine A .....	4
2. PROLIFÉRATION ET DIFFÉRENTIATION CELLULAIRE.....	9
2.1 Prolifération cellulaire .....	9
2.1.1 Cycle cellulaire.....	9
2.1.2 Voie Myc/Max/Mad .....	11
2.1.3 Voie des MAPK.....	12
2.1.4 Voie de la PI3K.....	13
2.2 Différenciation cellulaire .....	14
2.2.1 Voies de la PI3K et des MAPK dans la différenciation cellulaire...	15
2.2.2 AR et différenciation cellulaire .....	18
3. MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES .....	20
3.1 Les chylomicrons.....	20



3.2 Les VLDL.....	21
3.3 Les LDL.....	21
3.4 Les HDL.....	22
3.4.1 Les propriétés anti-athérogéniques des HDL.....	24
3.4.2 Les propriétés anti-inflammatoires des HDL.....	27
3.4.3 Les propriétés anti-oxydantes des HDL.....	28
3.4.4 Les propriétés anti-thrombotiques des HDL.....	32
3.4.5 Les propriétés anti-infectieuses des HDL.....	34
3.4.6 Les propriétés anti-apoptotiques des HDL.....	35
4- L'APOLIPOPROTÉINE A-I.....	36
4.1 Synthèse de l'apo A-I.....	36
4.2 Fonctions de l'apo A-I.....	37
4.3 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'apo A-I....	38
4.3.1 La régulation transcriptionnelle de l'apo A-I.....	39
4.3.1.1 Les glucocorticoïdes.....	40
4.3.1.2 Les oestrogènes.....	40
4.3.1.3 Les fibrates.....	41
4.3.1.4 L'acide rétinoïque.....	41
4.3.1.5 L'acide cholique.....	42
4.3.2 La régulation post-transcriptionnelle de l'apo A-I.....	43
4.3.2.1 Les lipides alimentaires.....	43
4.3.2.2 Les hormones thyroïdiennes.....	43
II. PROJET DE RECHERCHE.....	45
1. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	45
2. ARTICLE: Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion and apolipoprotein biogenesis.....	47
III. DISCUSSION.....	90
IV. BIBLIOGRAPHIE.....	95

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1.</b> Conversion d'une molécule de $\beta$ -carotène en 2 molécules de rétinol	p. 2
<b>Figure 2.</b> Différentes formes actives de la vitamine	p. 2
<b>Figure 3.</b> Mécanismes d'absorption de la vitamine A par les entérocytes	p. 4
<b>Figure 4.</b> Réduction du rétinol en rétinal dans la cellule par des enzymes spécifiques	p. 6
<b>Figure 5.</b> Transport de la vitamine A jusqu'à ses récepteurs nucléaires	p. 7
<b>Figure 6.</b> Transport de la vitamine A	p. 8
<b>Figure 7.</b> Phases du cycle cellulaire	p. 10
<b>Figure 8.</b> Voie des MAPK dans la prolifération cellulaire	p. 12
<b>Figure 9.</b> Voie de la PI3K dans la prolifération cellulaire	p. 13
<b>Figure 10.</b> Villosité intestinale	p. 14
<b>Figure 11.</b> Voie de la PI3K dans la différenciation cellulaire	p. 16
<b>Figure 12.</b> Voie de signalisation de la différenciation cellulaire Intestinale	p. 17
<b>Figure 13.</b> Développement de l'athérosclérose	p. 23
<b>Figure 14.</b> Transport inverse du cholestérol par les HDL	p. 26

<b>Figure 15.</b> Effets anti-inflammatoires des HDL	p. 28
<b>Figure 16.</b> Effet des HDL sur la synthèse de NO	p. 33
<b>Figure 17.</b> Synthèse de l'apo A-I	p. 36
<b>Figure 18.</b> Synthèse de protéine	p. 38
<b>Figure 19.</b> Promoteur de l'apo A-I	p. 39

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1 :	« ATP-binding cassette transporter A1 »
ADH :	Alcool deshydrogénase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ARP-1:	Apo A-I regulatory protein-1
ALDH :	Aldéhyde deshydrogénase
APO :	Apolipoprotéines
AR :	Acide rétinoïque
ARAT :	« Acyl CoA : retinol acyltransferase »
CDK :	« Cyclin-dependent protein kinase »
CDX2:	« Caudal-type homeobox transcription factor 2 »
CE :	Cholestérol ester
C/EBP :	« CCAAT/enhancer binding protein »
CETP :	« Cholesteryl ester transfer protein »
CM :	Chylomicron
CRABP :	« Cellular retinol binding protein »
CRBP :	« Cellular retinol binding protein »
CRP :	Protéine C-réactive
EGF:	« Epidermal growth factor »
eNOS:	« Endothelial nitric oxide synthase »
ERE:	« Estrogen response element »
ERK:	« Extracellular signal regulated kinase »
FGF:	« Fibroblast growth factor »
HDL:	« High density lipoprotein »
HNF:	« Hepatocyte nuclear factor »
HUVEC:	« Human Umbilical Vein Endothelial Cells »
ICAM-1:	« Intercellular adhesion molecule-1 »
IGF:	« Insulin-like growth factors »

IL-1:	Interleukine-1
kDa :	kilodalton
LBP:	LPS binding protein
LCAT:	« Lecithin cholesterol acyltransferase »
LDL:	« Low density lipoprotein »
LH:	Lipase hépatique
LPL:	Lipoprotéine lipase
LPS:	Lipopolysaccharide
LRAT:	« Lecithine : retinol acyltransferase »
LSF :	Lysosulfatide
LXR :	« Liver X Receptor »
MAPK :	« Mitogen activated protein kinase »
MAPKK :	« Mitogen activated protein kinase kinase »
MAPKKK:	« Mitogen activated protein kinase kinase kinase »
MCP-1 :	« Monocyte chemotactic protein-1 »
MEK :	« MAPK/ERK kinase »
MPO :	Myeloperoxydase
MTP :	« Microsomal transfer protein »
NF-kB :	« Nuclear factor-kappa B »
NO :	Oxyde nitrique
PAF-AH :	« Platelet activating factor-acetylhydrolase »
PAI-1:	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1
PGI <sub>2</sub> :	Prostacycline
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-kinase
PL :	Phospholipides
PLTP:	« Phospholipid transfer protein »
PON:	Paraoxonases
PPAR :	« Peroxisome proliferator-activated receptor »
PPRE :	« Peroxisome proliferator response element »
RAR :	« Retinoic acid receptor »
RARE :	« Retinoic acid responsive element »
Rb:	« Retinoblastoma protein »
RBP :	« Retinol binding protein »

RXR :	« Retinoic X receptor »
S1P :	Sphingosine-1-phosphate
SPC :	Sphingosylphosphorylcholine
SR-BI :	Scavenger receptor de classe B type I
TG:	Triglycérides
TNF- $\alpha$ :	« Tumor necrosis factor-alpha »
tPA:	Activateur du plasminogène
TXA <sub>2</sub> :	Tromboxane A <sub>2</sub>
VCAM-1:	« Vascular cell adhesion molecule-1 »
VLDL :	« Very low density lipoprotein »
vWF:	Facteur von Willebrand

*« Ce sont rarement les réponses qui  
apportent la vérité mais l'enchaînement des  
questions. »*

*- Daniel Pennac*

## **REMERCIEMENTS**

Je souhaite remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Emile Levy, pour sa grande humanité, son dévouement constant et son aide tant au niveau académique que personnel. Merci pour votre confiance, votre écoute et votre respect qui ont grandement contribué à la réussite de mes travaux.

Je remercie spécialement toute l'équipe du laboratoire pour leur généreux accueil et leur support constant. Il a été tellement agréable de travailler avec vous tous! Un merci tout particulier à Mme Carole Garofalo et au Dr Alain T. Sané pour leur aide si précieuse, leur dévouement et leur patience. Manon, Carole, Valérie et Zola, vous êtes non seulement des collègues de travail talentueuses, mais aussi des amies.

Je remercie également mes parents et ma soeur pour leur soutien et leur amour inconditionnel. Merci pour votre bienveillance et votre appui dans tous les projets que j'entreprends. Merci à mes amis, tout particulièrement Julien et Danie, pour leur soutien, leurs encouragements et leur confiance.

Émilie, avril 2007



# INTRODUCTION

## 1. LA VITAMINE A

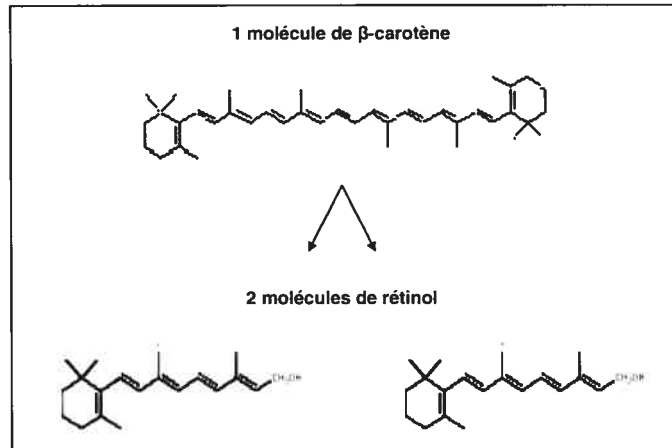
### 1.1 Caractéristiques générales

Les vitamines sont des composés organiques indispensables à la croissance, au développement et à la reproduction de l'organisme. Ne pouvant pas être synthétisées par l'organisme, les vitamines doivent être apportées en quantités suffisantes via l'alimentation.

Les vitamines peuvent être classées en deux groupes selon leur affinité avec l'eau ou les matières grasses. Elles sont alors nommées hydrosolubles ou liposolubles respectivement. Les hydrosolubles comprennent les vitamines des groupes B et C, tandis que les liposolubles regroupent les vitamines A, D, E et K.

La vitamine A a été l'une des premières vitamines découvertes en 1913. Mais, déjà à l'époque d'Hippocrate, le foie de veau (riche en vitamine A) était utilisé pour soigner les problèmes relatifs à la vision. Dans la nature, la vitamine A existe sous deux formes actives. La première forme est le rétinol, un alcool, qui se retrouve dans les aliments d'origine animale, comme le foie et les produits laitiers. La seconde, la provitamine A, est un précurseur de la vitamine A d'origine végétale (fruits et légumes). La mieux connue est le  $\beta$ -carotène. Celui-ci sera scindé dans l'intestin en deux molécules de rétinol. L'activité biologique du  $\beta$ -carotène est cependant beaucoup moindre que le rétinol, entre autres, compte tenu de l'inefficacité de son absorption<sup>1,2</sup>.

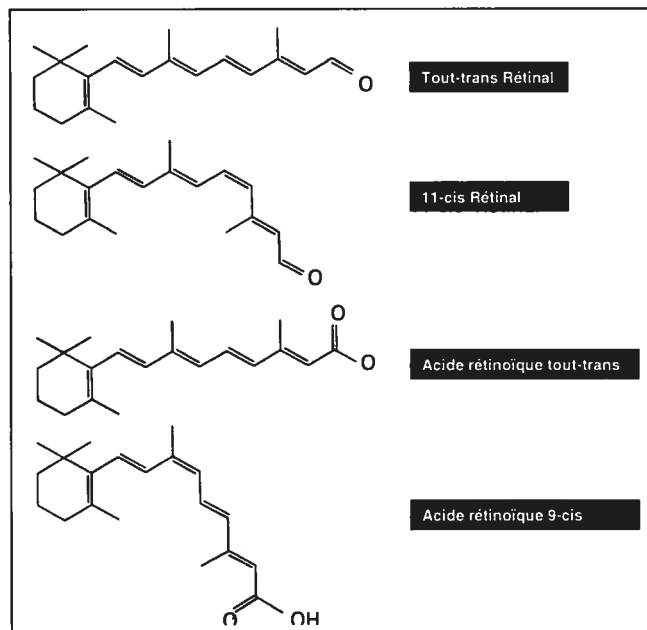
**Figure 1. Conversion d'une molécule de  $\beta$ -carotène en 2 molécules de rétinol**



## 1.2 Dérivés de la vitamine A

Afin d'être utilisé par l'organisme, le rétinol doit subir une série de transformations pour être absorbé, transporté et mis en réserve. Ces étapes engendrent différents composés et c'est pour cela que la vitamine A existe dans l'organisme sous différentes formes de dérivés ayant chacun un rôle spécifique pour le bon maintien de la santé.

**Figure 2. Différentes formes actives de la vitamine A**



Adapté de Noy<sup>3</sup>

### 1.3 Vitamine A et santé

Les dérivés de la vitamine A ont plusieurs rôles. Les mieux connus sont représentés par le rétinol 11-cis dans le mécanisme de la vision en permettant une plus grande acuité et une meilleure adaptation à la pénombre<sup>4, 5</sup>. De nombreuses études ont démontré que le rétinol 11-cis se lie avec l'opsine pour former la rhodopsine, un pigment protéique photosensible de la rétine<sup>4</sup>. Ce pigment est essentiel pour la sensibilité de l'œil à la lumière.

L'acide rétinoïque (AR) tout-trans et l'AR 9-cis plus précisément peuvent moduler l'expression de certains gènes impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire<sup>6</sup>, d'où leur grande importance comme agent thérapeutique dans le traitement du cancer.

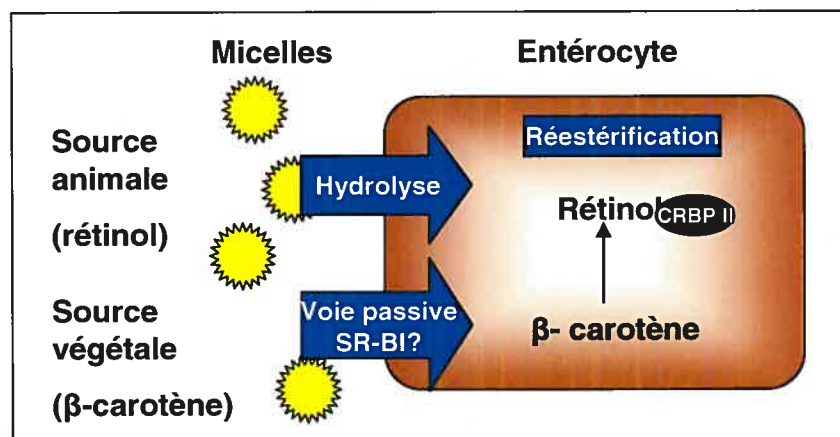
La vitamine A offre aussi plusieurs bénéfices dans le traitement des désordres de la peau, tels que l'acné, le psoriasis ou l'hyperpigmentation<sup>7</sup>. Elle participe également à la formation du squelette<sup>8</sup> et au bon maintien du système immunitaire<sup>9</sup>. Finalement, elle est essentielle à la lactation<sup>10</sup>, au développement de l'embryon<sup>11</sup> et à la spermatogenèse<sup>12</sup>.

Compte tenu de ces nombreux rôles, une carence en vitamine A peut se traduire par plusieurs signes dont des troubles dermatologiques, des désordres visuels, des anomalies de l'ossification, une diminution de la croissance staturopondérale et une baisse de la résistance aux infections. D'autre part, la vitamine A peut être toxique à de grandes doses. Ceci est particulièrement important chez les femmes enceintes chez lesquelles des doses trop élevées de vitamine A peuvent conduire à des malformations chez le fœtus<sup>13</sup>. Plusieurs études animales ont démontré qu'une hypervitaminose A peut entraîner des désordres du système nerveux central<sup>14</sup>, des mutations géniques et la mort<sup>15</sup>. Les effets toxiques de la vitamine A sont cependant rarement causés par une ingestion d'aliments riches en vitamine A, ce sont plutôt les suppléments contenant de la vitamine A qui méritent une attention particulière.

## 1.4 Transport et métabolisme de la vitamine A

Le rétinol et le  $\beta$ -carotène sont des molécules hydrophobes. Par conséquent, après avoir été ingérés, le rétinol et le  $\beta$ -carotène sont solubilisés dans les micelles qui sont hydrolysés par des hydrolases, plus précisément la phospholipase B, de la bordure en brosse de l'intestin<sup>16</sup>. Ceci permettra au rétinol de pénétrer dans la paroi intestinale. Quant au  $\beta$ -carotène, les scientifiques ont longtemps proposé qu'il soit absorbé par voie passive dans les entérocytes. Cependant, des rapports ont récemment suggéré qu'il existerait une absorption partielle par un transporteur. Les hypothèses se tournent vers le scavenger receptor de classe B type I (SR-BI) qui a été décrit dans la lignée Caco-2 (cellules intestinales humaines) comme le transporteur de la lutéine<sup>17</sup> et de la vitamine E<sup>18</sup>. Après son absorption dans les entérocytes, le  $\beta$ -carotène est converti en deux molécules de rétinol qui seront elles aussi estérifiées<sup>19</sup>.

**Figure 3. Mécanismes d'absorption de la vitamine A par les entérocytes**



*CRBP II : cellular retinol binding protein II; SR-BI: Scavenger Receptor de classe B type1*

Au niveau cellulaire, le rétinol se fixe sur des transporteurs appelés CRBP (cellular retinol binding protein). Ces récepteurs sont essentiels au métabolisme du rétinol. En effet, des études ont observé, chez des souris knock-out pour le gène CRBP, une diminution des réserves hépatiques de rétinol et une prédisposition à développer une déficience en vitamine A<sup>20</sup>. Deux formes de CRBP sont connues, soient le CRBP-I et le CRBP-II, qui ont pour fonction le transport du rétinol cellulaire et l'initiation de l'oxydation du rétinol en rétinal<sup>21</sup>. Le CRBP-I se retrouve dans plusieurs types de tissus chez le fœtus et chez l'adulte tels que le foie, les reins, les poumons et le cerveau. Le CRBP-II est quant à lui restreint au petit intestin, plus précisément aux entérocytes matures des villosités<sup>22</sup>.

Ainsi, dans les cellules intestinales, le rétinol est complexé et transporté par le CRBP-II (cellular retinol binding protein-II). Des observations chez les cellules intestinales Caco-2 ont révélé que l'AR tout-trans et 9-cis modulent les taux de rétinol absorbé et métabolisé en modulant l'expression de CRBP-II<sup>23</sup>. Cet effet de l'AR serait associé à la formation de l'hétérodimère RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$  et à sa liaison sur le promoteur du gène du CRBP-II<sup>24</sup>.

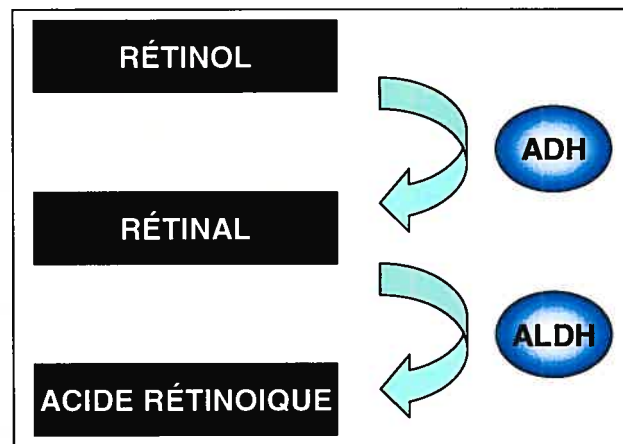
Une fois lié au CRBP-II, le rétinol est ré-estérifié grâce à la LRAT (lecithine : retinol acyltransférase). L'excès de rétinol non lié au CRBP-II serait ré-estérifié par l'ARAT (acyl CoA : retinol acyltransférase)<sup>16</sup>. Les esters de rétinol obtenus sont incorporés dans les chylomicrons, des complexes lipoprotéiniques intestinaux transportant des triglycérides, des phospholipides et du cholestérol. Les chylomicrons passeront dans la lymphe par le phénomène d'exocytose, puis rejoindront la circulation sanguine<sup>25</sup>. Notons que les chylomicrons transporteront les esters de rétinol tout au long de leur parcours jusqu'au foie<sup>26</sup>.

Le foie est l'organe de réserve de la vitamine A. En effet, une partie de la quantité absorbée quotidiennement (de 30 à 60 %) est mise en réserve dans le foie<sup>27</sup>. Celui-ci contrôle la régulation du statut en vitamine A. Lorsque nécessaire, les esters de rétinol sont hydrolysés pour libérer le rétinol fixé à une protéine, la RBP (retinol binding protein), qui est synthétisée par le foie et sécrétée dans le plasma sous forme de complexe RBP-rétinol<sup>28</sup>. Ce complexe se lie ensuite à la

transthyrétine, une protéine plasmatique<sup>28, 29</sup>. Cette protéine permettra de réduire la perte de RBP-rétinol qui aurait eu lieu lors de la filtration glomérulaire du rein<sup>3</sup>.

Une fois à l'intérieur de la cellule et lié au CRBP, le rétinol sera réduit en acide rétinoïque. Des enzymes spécifiques sont nécessaires pour cette conversion. L'ADH (alcool deshydrogénase) assure la transformation du rétinol en rétinol par une réaction d'oxydation<sup>30</sup>. Les trois formes d'ADH impliquées sont l'ADH1, l'ADH3 et l'ADH4<sup>31</sup>. Par la suite, le rétinol sera converti en AR par la ALDH (aldehyde dehydrogenase)<sup>32</sup>.

**Figure 4. Réduction du rétinol en rétinol dans la cellule par des enzymes spécifiques**

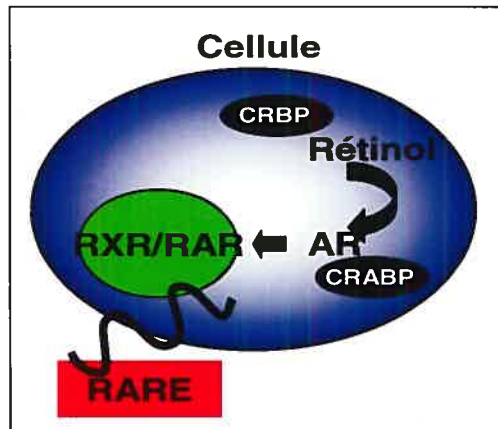


*ADH : alcool deshydrogénase; ALDH : aldehyde dehydrogenase*

L'AR obtenu sera ensuite véhiculé par le CRABP (cellular retinoic acid binding protein). Le CRABP est présent dans le noyau des cellules suggérant ainsi son rôle comme véhicule de l'acide rétinoïque jusqu'à ses récepteurs nucléaires. Le CRABP se présente sous deux formes soient le CRABP-I et le CRABP-II<sup>33</sup>. Le CRABP-I est exprimé de façon ubiquitaire tandis que le CRABP II est une protéine abondante au niveau du petit intestin<sup>23</sup> mais elle se retrouve également dans la peau<sup>34</sup>, l'utérus<sup>35</sup> et les ovaires<sup>36</sup>.

Au noyau de la cellule se retrouve des récepteurs de l'acide rétinoïque appelés RAR (retinoic acid receptor), de type  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et RXR (retinoic X receptor)  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , ainsi que leurs cibles, les RARE (retinoic acid responsive elements)<sup>37</sup>. L'acide rétinoïque peut pénétrer dans le noyau et agir sur ses récepteurs nucléaires. Ces derniers sont alors activés et se dimérisent, formant des homodimères ou des hétérodimères, et se lient aux éléments de réponse de l'acide rétinoïque (RARE) présents sur certains gènes.

**Figure 5. Transport de la vitamine A jusqu'à ses récepteurs nucléaires**

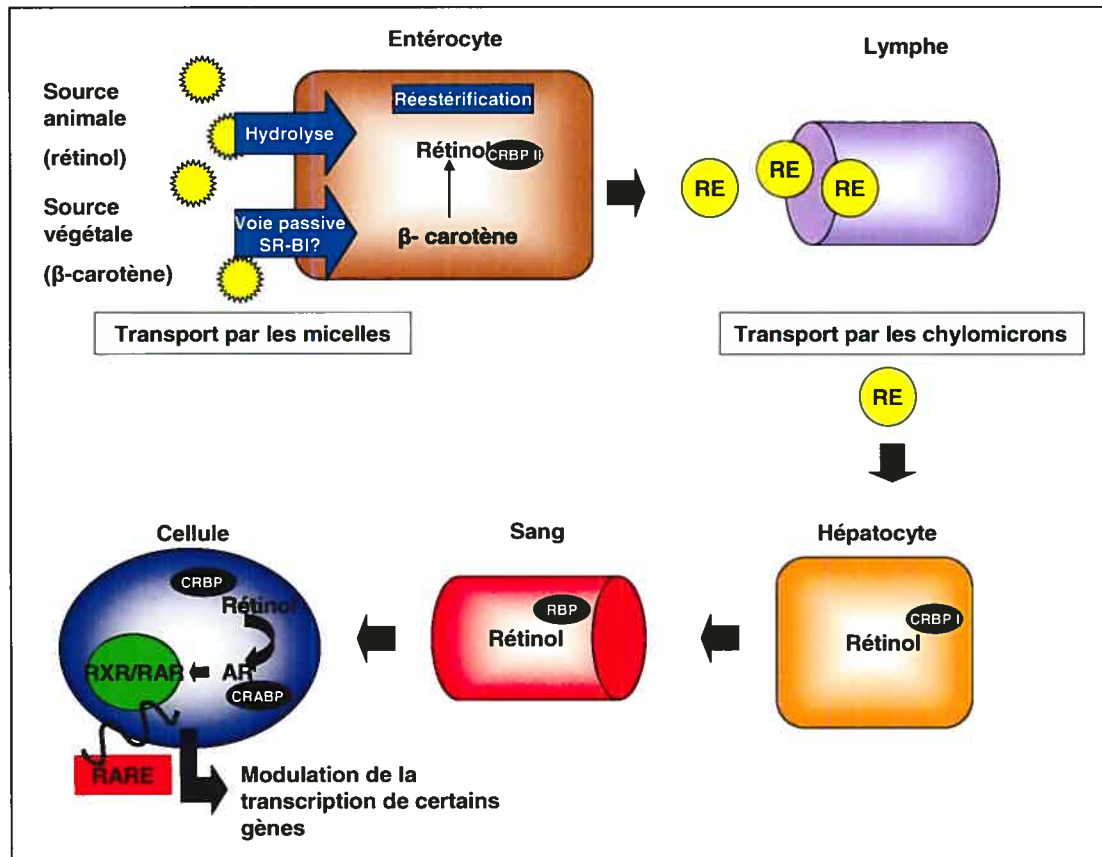


*CRBP: cellular retinol binding protein; CRABP: cellular retinoic acid binding protein; AR: acide rétinoïque; RXR: retinoic X receptor; RAR: retinoic acid receptor; RARE: retinoic acid responsive element*

Des études ont démontré que l'AR tout-trans et 9-cis sont des ligands des RAR, mais que seulement l'AR 9-cis se lie avec une haute affinité aux RXR<sup>38</sup>. Ces récepteurs nucléaires sont essentiels à l'action de l'AR. Des expériences sur des knock-out des RAR et RXR ont rapporté le développement de multiples désordres biologiques chez les animaux. Ces études ont démontré une augmentation de l'incidence des troubles oculaires, des anomalies dans la croissance et le développement du squelette chez des souris mutantes pour les récepteurs RAR<sup>39-41</sup>. Chez des animaux mutants pour RXR, des problèmes cardiaques ont été très fréquemment rapportés<sup>42, 43</sup>.

C'est donc en se liant à ses récepteurs nucléaires que l'AR peut accomplir de nombreuses fonctions biologiques telles que la modulation de certains gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

**Figure 6. Transport de la vitamine A**



*CRBP-II : cellular retinol binding protein-II; SR-BI : scavenger receptor de classe B type I; RE : rétinol estérifié; CRBP-I : cellular retinol binding protein-I; RBP : retinol binding protein; CRABP : cellular retinoic acid binding protein; RXR : retinoic X receptor; RAR : retinoic acid receptor; RARE : retinoic acid responsive element*



## 2. PROLIFÉRATION ET DIFFÉRENTIATION CELLULAIRE

### 2.1 Prolifération cellulaire

#### 2.1.1 Cycle cellulaire

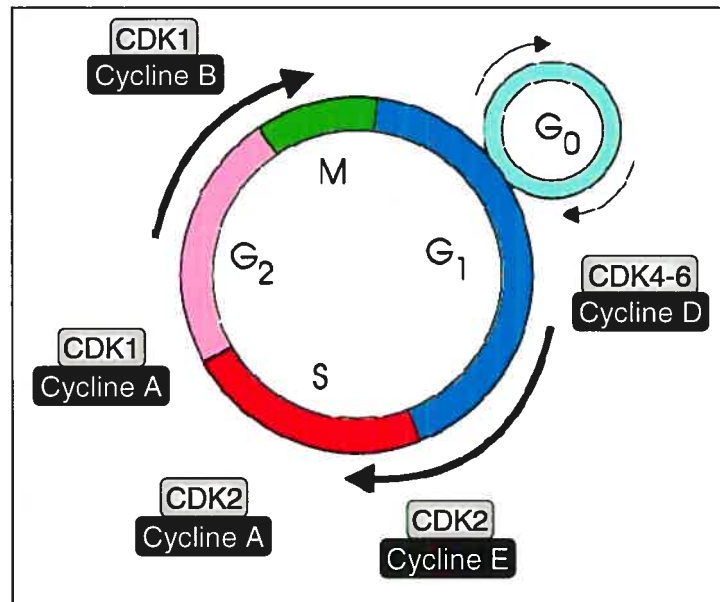
Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications que subit une cellule lors de sa division ou de sa reproduction. Il s'agit d'une série d'étapes ordonnées au cours desquelles la cellule duplique son ADN et se divise en deux cellules filles. Ce cycle comporte deux phases principales soit l'interphase (croissance) et la phase mitotique (reproduction). L'interphase englobe les phases  $G_1$ , S et  $G_2$ . Durant la phase  $G_1$ , la cellule est en croissance, en phase S, elle débute la réplication de son ADN et en phase  $G_2$ , elle se prépare à la division cellulaire. Les chromosomes sont ensuite séparés en phase M (phase mitotique) et la cellule se divise en deux cellules filles. Puis, en phase  $G_0$ , elle quitte le cycle cellulaire<sup>44</sup>. Tout au long de ce cycle, des points de contrôle permettent à la cellule de confirmer qu'aucune erreur génétique n'a lieu. Si tel est le cas, le cycle cellulaire s'arrête et la cellule entre en apoptose<sup>45</sup>.

La régulation extrêmement fine du cycle cellulaire est capitale. Un dérèglement des systèmes de contrôle du cycle peut conduire, par exemple, à une prolifération désordonnée qui est souvent associée au développement de tumeurs cancéreuses. Afin d'assurer ce contrôle essentiel, la compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent la progression du cycle cellulaire est indispensable. Ces dernières années, des molécules impliquées dans la progression du cycle cellulaire ont fait sujet de plusieurs travaux. Il s'agit des protéines kinases (Cdk : cyclin-dependent protein kinases) et de leurs sous-unités, les cyclines. Les Cdk ne sont fonctionnelles que lorsqu'elles forment des complexes hétérodimériques avec une cycline. Ces complexes assurent la progression de la cellule dans le cycle cellulaire<sup>44</sup>. Il existe plusieurs cyclines et

chacune d'elle est synthétisée juste avant son action et est rapidement dégradée une fois sa fonction effectuée par ubiquitination<sup>46</sup>.

La première cycline impliquée dans le cycle cellulaire est la cycline D. Celle-ci contrôle la progression du cycle cellulaire de la phase  $G_1$  à la phase S par l'intermédiaire de l'activation des Cdk4 et Cdk6<sup>46</sup>. Une fois activé, le complexe cycline D/Cdk4 initie la phosphorylation et l'inactivation de la protéine Rb (pRb ou Rétinoblastoma protein)<sup>47</sup>. Brièvement, dans les cellules en  $G_0$ , la protéine pRb est reliée à un facteur de transcription nucléaire appelé E2F qui est essentiel à l'initiation de la phase S. Suite à sa phosphorylation la protéine relâche le E2F<sup>48</sup>, un facteur de transcription du gène de la cycline E de la phase suivante. La cycline E, reliée à la Cdk2, est responsable de la transition entre la phase  $G_1$  et la phase S. La cycline A, unie également à la Cdk2, agit en phase S afin d'entretenir la réplication de l'ADN. Puis la cycline B/Cdk1 viendra favoriser la transition de la phase  $G_2$  à la phase M<sup>46</sup>.

**Figure 7. Phases du cycle cellulaire**



*CDK : Cyclin-dependent protein kinase*

La cycline D comprend trois sous-types soient les cyclines D1, D2 et D3. La cycline D1 est reconnue comme un marqueur de la prolifération cellulaire. Les tumeurs étant caractérisées par une prolifération désordonnée de cellules, de nombreuses investigations dans des types cellulaires variés ont rapporté qu'une surexpression de la cycline D1 est associée à leur développement. Entre autres, des études ont démontré qu'une surexpression de la cycline D1 peut transformer des entérocytes normaux en cellules cancéreuses<sup>49</sup>. D'ailleurs, la cycline D1 est l'un des gènes candidats responsables du développement et de la progression du cancer du sein<sup>50</sup>. En outre, elle est impliquée dans le développement de tumeurs dans les glandes parathyroïdes chez des souris<sup>51</sup>. Ce sont ces observations qui poussent de nombreux chercheurs à s'intéresser à la cycline D1.

Les cyclines D2 et D3 ont été beaucoup moins étudiées que la cycline D1. La cycline D2 est présente dans l'iléon et le colon mais n'est que faiblement détectable au niveau du duodénum<sup>52</sup>. Elle a également été associée au développement de certains cancers, tels que ceux des testicules<sup>53</sup> et de l'estomac<sup>54</sup>. La cycline D3 est exprimée de façon ubiquitaire<sup>55</sup>. Elle est davantage associée à la différenciation cellulaire. Ainsi, une surexpression de la cycline D3 peut réduire le développement des tumeurs de la peau<sup>56</sup> et augmenter la différenciation des cellules HL-60<sup>57</sup>.

### **2.1.2 Voie Myc/Max/Mad**

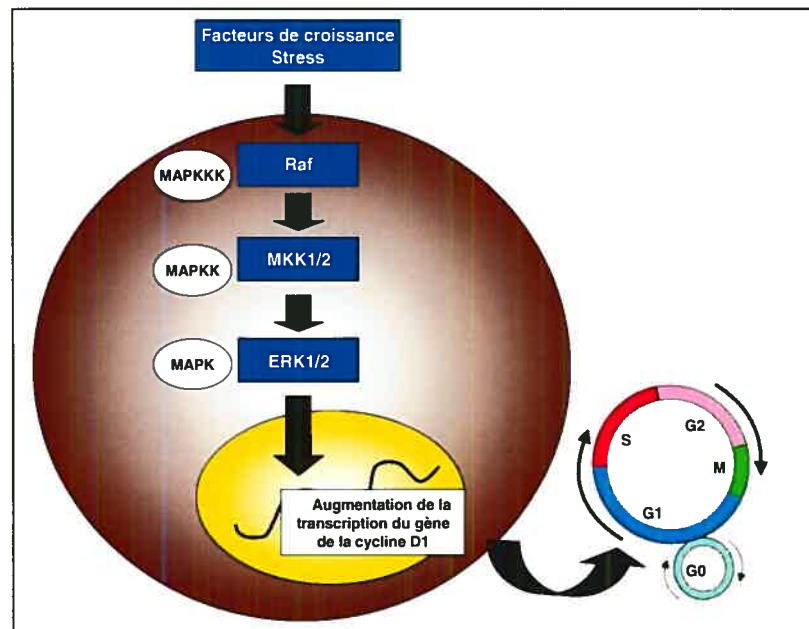
L'initiation du cycle cellulaire peut être déclenchée par la voie Myc/Max/Mad. Ces trois protéines font partie d'une famille de facteurs de transcription ayant un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire<sup>58</sup>. Tout d'abord, Myc, un oncogène, forme un hétérodimère avec Max (Myc-Max) et active ainsi la transcription des gènes des cyclines D et E. D'ailleurs, une étude chez des cellules *myc* *-/-* a observé que l'activité de la cycline D1 avec Cdk4 et Cdk6 a diminuée de 12 fois<sup>59</sup>. Myc-Max est par conséquent étroitement relié au processus de prolifération cellulaire.

L'hétérodimère Mad-Max aurait quant à lui un effet inverse<sup>60</sup> puisqu'il serait impliqué dans la transition entre la prolifération et la différenciation cellulaire<sup>61, 62</sup>.

### 2.1.3 Voie des MAPK

Le début du cycle cellulaire peut aussi être provoqué par la liaison d'un facteur de croissance à son récepteur. Des facteurs de croissance (tels que IGF-1<sup>63</sup>, FGF<sup>64</sup> ou EGF<sup>65</sup>) par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires du type tyrosine kinase ainsi que des stimuli mitogènes, déclenchent des cascades de type MAPKKK/MAPKK/MAPK<sup>66</sup>. Les MAPK appartiennent à une famille de kinases qui sont activées par la phosphorylation de leurs résidus thréonine et tyrosine. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire puisqu'elles sont capables de stimuler la transcription de certains gènes tels que ceux de la cycline D1<sup>67</sup>.

**Figure 8. Voie des MAPK dans la prolifération cellulaire**



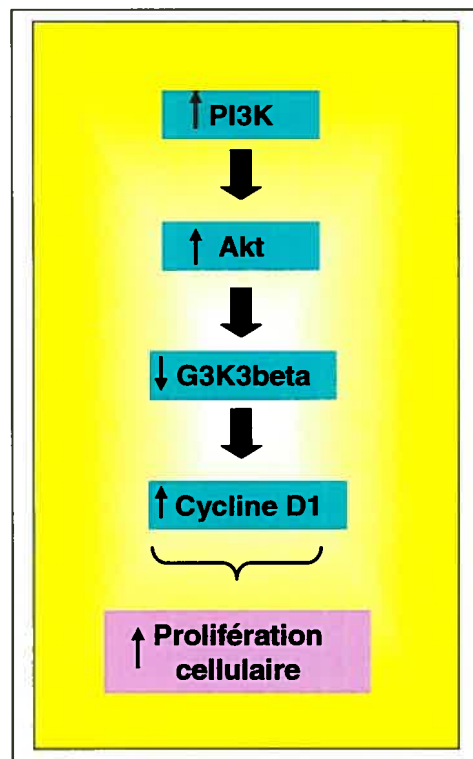
*MAPKKK : Mitogen activated protein kinase kinase kinase ; MAPKK : Mitogen activated protein kinase kinase ; MAPK : Mitogen activated protein kinase ; Raf ; MKK ; ERK : Extracellular signal regulated kinase*

Adapté de Terada<sup>68</sup>

### 2.1.4 Voie de la PI3K

La voie de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) influence également la prolifération cellulaire. Par exemple, un traitement avec des inhibiteurs de la PI3K chez des souris a réduit la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal<sup>69</sup>. La PI3K est elle aussi stimulée par des facteurs externes (tels que les facteurs de croissance)<sup>70</sup>. Par la suite, elle active la protéine Akt par phosphorylation. L'Akt est une protéine pouvant bloquer l'apoptose et augmenter la quantité de la cycline D1<sup>69</sup> et donc favoriser la prolifération cellulaire intestinale.

Figure 9. Voie de la PI3K dans la prolifération cellulaire



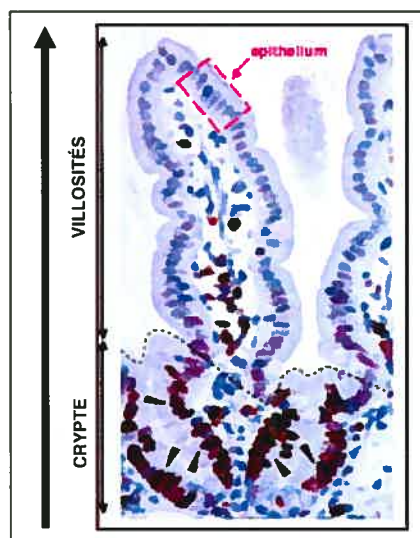
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

La prolifération cellulaire est donc le processus par lequel les cellules croissent et se multiplient rapidement. Une fois le cycle terminé, les cellules se dirigeront vers la différenciation cellulaire ou l'apoptose. La différenciation cellulaire est le processus par lequel les cellules deviennent matures et se spécialisent c'est-à-dire qu'elles acquièrent leurs fonctions. Pendant ces changements, les cellules verront leur structure modifiée et exprimeront certains facteurs tels que la sucrase-isomaltase, un marqueur bien connu de la différenciation cellulaire<sup>71</sup>. Il existe également des phénomènes de dédifférenciation par lesquels des cellules relativement spécialisées peuvent redevenir moins spécialisées.

## 2.2 Différenciation cellulaire

L'épithélium intestinal est un modèle de choix pour l'étude des phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire puisqu'il est caractérisé par un renouvellement rapide et continu. Ce processus implique une génération constante de cellules qui migreront de la crypte intestinale jusqu'aux villosités. Au cours de cette migration, les cellules prolifératives non différenciées de la crypte acquerront des fonctions spécifiques et deviendront donc des cellules différenciées pleinement fonctionnelles formant l'épithélium intestinal<sup>72</sup>.

**Figure 10. Villosité intestinale**



Tiré de Pinto<sup>73</sup>

### 2.2.1 Voies de la PI3K et des MAPK dans la différenciation cellulaire

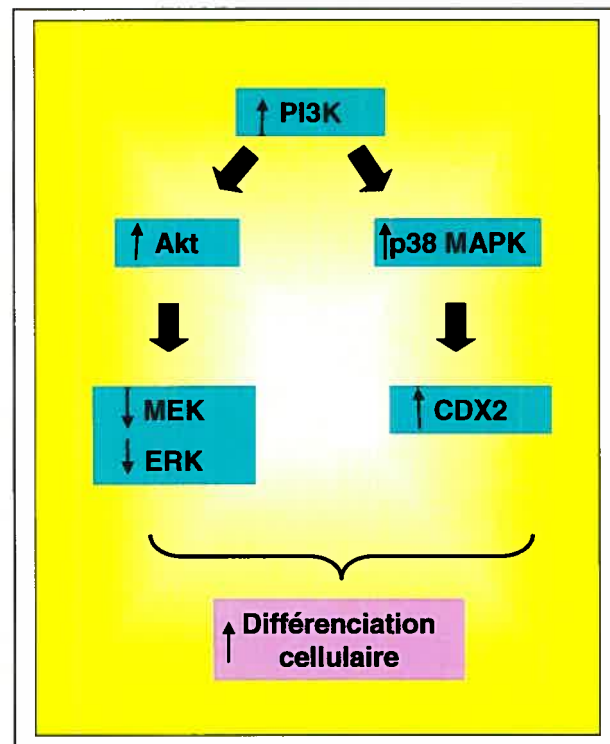
La voie des MAPK et celle de la PI3K/Akt sont impliquées à la fois dans la prolifération et dans la différenciation cellulaire. Les phénomènes de prolifération et de différenciation sont distincts et ne peuvent se dérouler simultanément. Des études proposent que le degré de différenciation des cellules régule le choix entre la prolifération et la spécialisation<sup>74</sup>.

Ainsi, une activation de la PI3K a été observée lors la différenciation des cellules de l'intestin<sup>75</sup>, du cristallin<sup>76</sup> et de l'épithélium<sup>77</sup>. Au niveau de l'intestin, Li et al. proposent que les divergences dans le rôle de la PI3K pourrait s'expliquer selon les deux isoformes de l'Akt : l'Akt 1 est davantage associée à la crypte et l'akt 2 aux villosités<sup>78</sup>. Les MAPK jouent des rôles variés dans la régulation de l'expression génique des facteurs de transcription phosphorylés<sup>79</sup>. Comme mentionné précédemment, la cascade des MAPK est grandement impliquée dans la progression du cycle cellulaire. Diverses études ont démontré que l'activité de la p42/p44 MAPK stimule la prolifération cellulaire. Mais elle aurait aussi un impact très important dans le processus de différenciation<sup>80</sup>. Ainsi, des taux significatifs de MAPK (principalement de p42 MAPK) ont été observés dans des cellules Caco-2/15 différenciées<sup>80</sup>. Par ailleurs, la p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), une protéine kinase cytoplasmique, est également impliquée dans la transmission des signaux de différenciation cellulaire dans une multitude de types cellulaires tels que les cellules intestinales<sup>81</sup>, les cellules musculaires<sup>82</sup> et les oligodendrocytes<sup>83</sup>. Au niveau intestinal, la p38 MAPK est grandement augmentée par l'établissement des contacts cellule-cellule<sup>81</sup>. Il a été démontré que la p38MAPK a la capacité de favoriser la transactivation de CDX2, une protéine centrale de la différenciation cellulaire<sup>81</sup>. Par conséquent, l'inhibition de la voie p38 MAPK entraîne une diminution de l'activité de CDX2<sup>81</sup>. La p38 MAPK n'aurait cependant pas d'effet sur le cycle cellulaire. En effet, des études ont démontré que l'inhibition de la p38 MAPK n'interfère pas avec la progression du cycle cellulaire mais diminue l'expression de certains marqueurs de différenciation tels que la sucrase-isomaltase<sup>81</sup>. Il existe quatre isoformes de la p38 MAPK soient  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$

<sup>84, 85</sup>. Les recherches suggèrent que la p38α serait l'isoforme majeure impliqué dans la différenciation cellulaire<sup>81</sup>.

Tel que mentionné précédemment, le CDX2 est une protéine centrale dans le processus de différenciation. Il est exprimé dans les cellules intestinales différenciées<sup>86</sup> et est impliqué dans la régulation de la sucrase-isomaltase. Le CDX2 peut engendrer des modifications morphologiques et fonctionnelles au niveau des entérocytes<sup>87</sup>. Entre autres, le CDX2 altère de façon significative la prolifération des cellules de la crypte intestinale (HIEC)<sup>88</sup>. Une diminution significative de l'expression de la cycline D1 a d'ailleurs été observée dans ces cellules<sup>88</sup>.

**Figure 11. Voie de la PI3K dans la différenciation cellulaire**

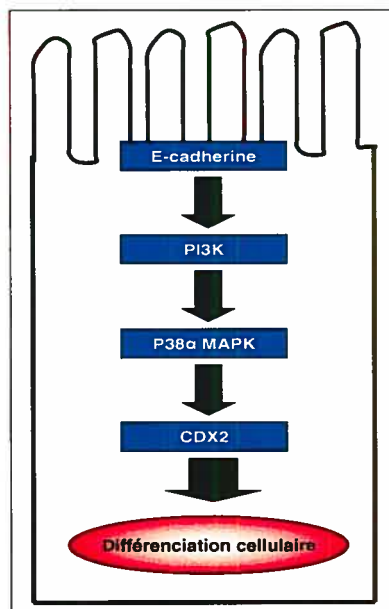


*PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase; MAPK : Mitogen activated protein kinase; MEK : MAPK/ERK kinase; ERK : Extracellular signal regulated kinase; CDX2 : Caudal-type homeobox transcription factor 2*



L'épithélium intestinal forme une barrière constituée de cellules polarisées reliées par des jonctions serrées. Les cadherines sont responsables de cette polarisation et de l'adhésion cellulaires suite à une interaction calcium dépendante. Les cadherines ont une grande importance dans l'établissement des contacts cellules-cellules au niveau de l'intestin, des testicules<sup>89</sup>, des os<sup>90</sup> et de l'épiderme<sup>91</sup>. D'ailleurs, une altération de la E-cadherine a été observée dans certaines pathologies dans lesquelles la polarisation et la différenciation cellulaire sont altérées, comme dans les cas de cancer colorectal<sup>92</sup>. De plus, des études montrent qu'une surexpression de la E-cadherine dans la crypte intestinale réduit la prolifération et la migration cellulaire. Ceci pourrait s'effectuer par l'activation de la voie PI3K/Akt<sup>75, 93</sup> qui provoque une diminution de la voie MEK/ERK<sup>94</sup>. Laprise et al.<sup>75</sup> propose que le processus qui induit la différenciation cellulaire intestinale implique, tout d'abord, l'action de la E-cadherine qui favorise l'activation de la voie de la PI3K. La PI3K promeut alors l'assemblage de la F-actine, ce qui active la cascade de la p38 $\alpha$  MAPK, et par conséquent augmente la transactivation de CDX2.

**Figure 12. Voie de signalisation de la différenciation cellulaire intestinale**



*PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase; MAPK : Mitogen activated protein kinase; CDX2 : Caudal-type homeobox transcription factor 2*

Adapté de Laprise<sup>75</sup>

### 2.2.2 AR et différenciation cellulaire

Tel que mentionné précédemment, l'AR peut moduler la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, dans de nombreuses expériences *in vitro*, l'AR s'est avéré être un inhibiteur de la prolifération cellulaire de différentes tumeurs, par exemple au niveau des cancers du sein<sup>95</sup>, de la prostate<sup>96</sup>, du poumon et du foie<sup>97</sup>. *In vivo*, l'AR a démontré le même pouvoir d'inhibition de la prolifération cellulaire, entre autres, chez des rongeurs présentant des tumeurs pulmonaires<sup>98</sup>. Il n'est donc pas surprenant que de nombreuses investigations s'attardent aux bénéfices possibles de l'AR sur le traitement du cancer. Cependant, d'autres recherches n'ont observé aucun effet de l'AR sur le développement du cancer. Une étude a même remarqué des effets divergents dans deux lignées de cellules cancéreuses intestinales dont l'une n'a présenté aucun effet suite à l'exposition avec l'AR tandis que l'autre a vu sa croissance augmentée<sup>99</sup>. Afin de mieux comprendre ses variations des effets de l'AR sur le cycle cellulaire des travaux sont menés sur les mécanismes moléculaires impliqués.

Des observations suggèrent l'implication des PPAR et des RXR. Les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) sont connus sous trois isoformes soient  $\alpha$ ,  $\beta$  (ou  $\delta$ ) et  $\gamma$ . Ils constituent une famille de facteurs de transcription qui forment des hétérodimères avec les RXR. PPAR  $\gamma$  joue un rôle central dans la différenciation de plusieurs types cellulaires. Des études ont relevé l'inhibition de la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses du colon avec une activation de PPAR $\gamma$ <sup>100, 101</sup>. Il a également été suggéré que c'est en formant un hétérodimère RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  qu'il y aurait une augmentation de la différenciation cellulaire<sup>102</sup>. Cette inhibition de la prolifération a été observée dans des cellules épithéliales intestinales de rats et pourrait résulter d'une diminution de la cycline D1<sup>103</sup>.

D'autres facteurs pourraient bien être impliqués dans ce phénomène et des études supplémentaires sont requises afin de comprendre précisément le rôle de l'AR sur la prolifération et la différenciation cellulaire.

Lorsqu'elles sont différenciées, certaines cellules acquièrent des fonctions qui leur sont spécifiques, tel est le cas des cellules intestinales. En effet, des études ont démontré dans la lignée cellulaire Caco-2, laquelle développe les caractéristiques de l'épithélium du petit intestin telles que la bordure en brosse et les microvillosités<sup>104</sup>, une habileté à sécréter des apolipoprotéines (apos) et des lipoprotéines<sup>105</sup>. Effectivement, les cellules intestinales Caco-2 synthétisent les apos A-I, A-IV, B-48, B-100, apo C-III et E et les lipoprotéines HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) et VLDL (very low density lipoprotein). Ces fonctions sont parmi les plus importantes de l'intestin<sup>106</sup>.

### 3. MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

La vitamine A fait partie de la classe des vitamines liposolubles. Ce type de vitamine requiert donc une certaine quantité de matières grasses et de sels biliaires pour être absorbée correctement. Tout comme les lipides alimentaires, la vitamine A est absorbée par l'intestin grêle puis incorporée dans les chylomicrons ce qui lui permettra d'entrer dans la circulation sanguine et d'être utilisée par les cellules<sup>16</sup>.

#### 3.1 Les chylomicrons

Suite à leur ingestion, les lipides alimentaires (triglycérides (TG), phospholipides (PL) et cholestérol ester (CE)) sont hydrolysés par des enzymes lipolytiques. Les produits de cette hydrolyse sont hydrophobes et doivent être émulsifiés par les acides biliaires formant ainsi des micelles qui les transporteront jusqu'à la bordure en brosse des cellules intestinales où ils seront absorbés. Les produits lipolytiques sont absorbés par les entérocytes et resynthétisés en TG, PL et CE dans le réticulum endoplasmique.

Les entérocytes forment les chylomicrons, des lipoprotéines de faible densité principalement composées de triglycérides (environ 90%), phospholipides (environ 8%) et de cholestérol (environ 5%). Les chylomicrons sont les véhicules des lipides exogènes et des vitamines liposolubles, comme la vitamine A. L'apolipoprotéine B-48 (apo B-48) est l'apo essentielle à la stabilisation du chylomicron ainsi qu'à son assemblage et à son exocytose cellulaire<sup>107</sup>. Le chylomicron contient également les apolipoprotéines A-I, A-IV et C-III. Le MTP (microsomal transfer protein) est essentiel à l'assemblage des chylomicrons et des VLDL dans l'intestin. D'ailleurs, des études, chez des animaux déficitaires en MTP et les patients souffrant d'abêtalipoprotéïnémie, démontrent des taux de chylomicrons et de VLDL plasmatiques extrêmement faibles<sup>107, 108</sup>. Le MTP est une

protéine qui permet le transfert des lipides à l'apo B en formation. Ce processus de lipidation empêche l'apo B d'être dégradée par le protéasome<sup>109, 110</sup>.

Les chylomicrons ainsi formés par l'intestin sont par la suite relâchés par exocytose afin d'entrer dans la circulation sanguine via la lymphe. À cette étape, les triglycérides des chylomicrons seront hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), suite à l'acquisition de l'apo C-II, un cofacteur de la LPL. Les acides gras ainsi libérés seront des sources d'énergie pour les muscles ou seront mis en réserve dans le tissu adipeux. Les résidus de chylomicrons (« remnants ») obtiennent rapidement l'apolipoprotéine E du plasma, ce qui leur permettra d'être reconnu, puis internalisés et dégradés par les hépatocytes<sup>110</sup>.

### **3.2 Les VLDL**

Les VLDL (Very Low Density Lipoprotein) sont des lipoprotéines riches en triglycérides synthétisées et excrétées par les entérocytes lors de jeun ainsi que par les hépatocytes<sup>111</sup>. Leur formation est similaire à celle des chylomicrons.

### **3.3 Les LDL**

Les LDL (Low Density Lipoprotein) sont également appelées « mauvais cholestérol » compte tenu de leur association avec le développement des maladies cardiovasculaires. Ces lipoprotéines véhiculent de grande quantité de cholestérol ester et sont sujets à l'oxydation. Lorsqu'elles sont oxydées, les LDL peuvent initier l'athérosclérose en stimulant, entre autres, l'infiltration de monocytes, l'apoptose de cellules endothéliales et un déséquilibre dans le processus de la coagulation<sup>112</sup>. Les LDL petites et denses sont reconnues comme les particules les plus athérogènes, compte tenu de leur taille elles ont plus de facilité à pénétrer l'endothélium vasculaire<sup>113</sup>.

### 3.4 Les HDL

Les HDL sont les lipoprotéines les plus denses. Elles sont appelées « bon cholestérol » puisqu'elles livrent le surplus de cholestérol de la périphérie au foie<sup>114</sup>. Elles sont synthétisées à 15 % par le foie, 15 % par l'intestin et 70 % résulte du métabolisme circulatoire sous l'action de la LPL (lipoprotéine lipase)<sup>115</sup>. Cette dernière est une enzyme dont le cofacteur est l'apo C-II. Elle hydrolyse les TG des CM afin de libérer les acides gras du glycérol qui serviront comme source d'énergie pour les cellules. Lors de ce processus, certaines apolipoprotéines, dont l'apo A-I, se dissocieront du CM et formeront de nouveaux HDL naissants de forme discoïdale, composés majoritairement de PL et d'apolipoprotéines<sup>115</sup>.

Les HDL renferment plusieurs apolipoprotéines (A-I, A-II, A-IV, C, E et J) et de nombreuses enzymes comme les PON1 et 3 (paraoxonases 1 et 3), la PAF-AH (platelet activating factor-acetylhydrolase), la LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase) et le CETP (cholesteryl ester transfer protein) ce qui leur confère plusieurs fonctions<sup>116,117</sup>.

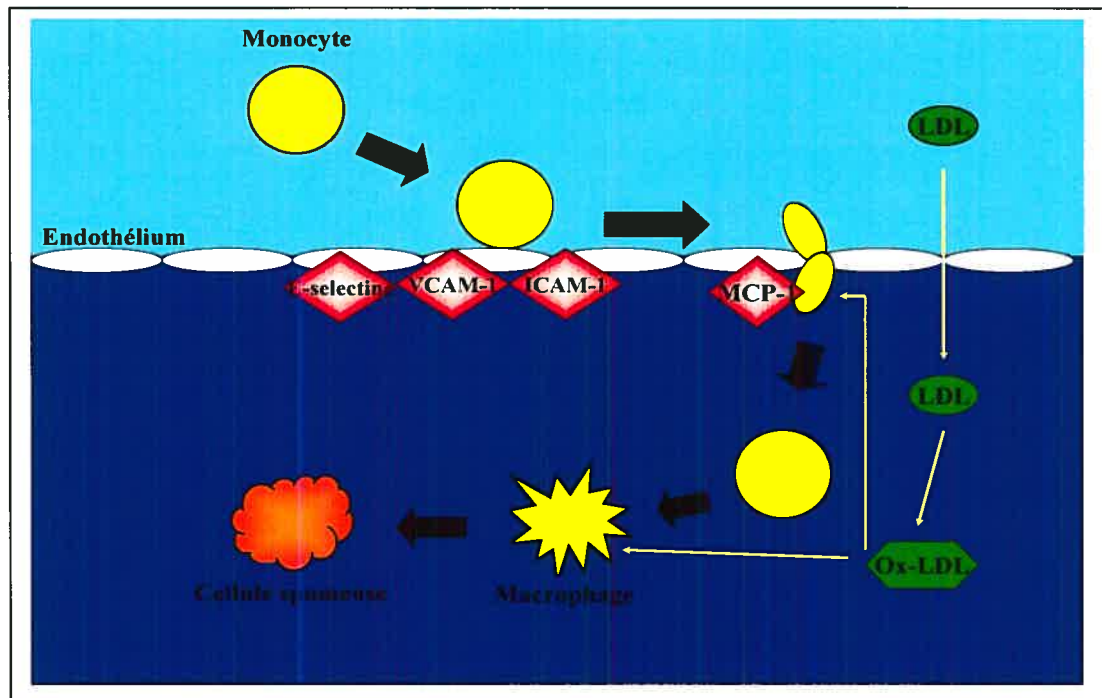
Il n'est donc pas surprenant qu'actuellement de nombreuses études mettent l'emphase sur les HDL. Les scientifiques ne s'y intéressent pas uniquement pour leurs propriétés anti-athérogéniques, mais également à cause de leurs caractéristiques anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-thrombotiques, anti-infectieuses et anti-apoptotiques.

#### L'athérosclérose

L'athérosclérose est un désordre chronique inflammatoire initié par une accumulation de LDL-oxydées dans l'espace sous-endothélial. Ce désordre est caractérisé par une accumulation de macrophages et de lymphocytes T à l'intérieur de l'intima artérielle et d'une augmentation de plusieurs marqueurs d'inflammation, de protéines d'adhésion et de chemokines. L'augmentation des molécules d'adhésion facilite l'adhésion des monocytes sanguins à l'endothélium.

Ces molécules comprennent la E-selectine, la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et la ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)<sup>118</sup>. Par la suite, la MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), une chemokine, facilitera leur passage dans l'espace sous-endothélial<sup>119</sup>. C'est à cet endroit que les monocytes se différencieront en macrophages et exprimeront des récepteurs scavengers, des protéines membranaires liant les lipoprotéines modifiées telles que les LDL oxydés (ox-LDL). Les macrophages s'emparent de ces LDL-oxydés et deviennent des cellules spumeuses.

**Figure 13. Développement de l'athérosclérose**



*VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1 ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1 ; MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1; LDL : Low density lipoprotein*

Inspiré de Barter<sup>120</sup>

### 3.4.1 Les propriétés anti-athérogéniques des HDL

Il est bien établi que les concentrations sanguines de HDL élevées amoindrissent les risques de développer l'athérosclérose. Nul doute que la fonction anti-athérogénique la mieux connue des HDL est sa capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol des cellules et son retour au foie en vue de son élimination dans la bile.

L'efflux du cholestérol cellulaire est l'étape au cours de laquelle le cholestérol est transféré des cellules périphériques vers les HDL. Il constitue la première phase du transport inverse du cholestérol. Il a été prouvé que les transferts de cholestérol ne résultent pas uniquement d'une diffusion passive. En effet, des travaux démontrent que l'efflux du cholestérol se fait largement sous la dépendance de protéines spécifiques.

L'ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) est une protéine ubiquitaire exprimée abondamment, en particulier, dans le foie, les macrophages et le cerveau<sup>121</sup>. L'ABCA1 joue un rôle majeur dans la formation des HDL naissants en combinaison avec l'apo A-I<sup>122</sup>. En effet, l'apo A-I et le domaine extracellulaire de l'ABCA1 se lient, puis l'apo A-I est lipidé pour ensuite former le HDL naissant. L'ABCA1 est aussi essentielle à l'extraction du cholestérol des tissus périphériques en faveur des HDL<sup>123</sup>. Des anomalies du gène ABCA1 sont à l'origine de déficits sévères en HDL, tel qu'observé dans la maladie de Tangier<sup>124</sup>. Par ailleurs, selon une étude effectuée sur la lignée cellulaire Caco-2, l'ABCA-1 peut être régulée par l'AR, étant donné que l'AR favorise la formation de l'hétérodimère LXR/RXR. Signalons que le récepteur nucléaire LXR est un ligand des oxystérols qui stimule la formation de LXR/RXR, induisant ainsi l'expression génique et l'efflux du cholestérol<sup>125</sup>.

La protéine LCAT (lecithine : cholestérol acyltransférase) est sécrétée par le foie et circule dans le sang liée aux lipoprotéines. Elle agit sur le cholestérol libre à la surface des HDL en leur transférant un groupe 2-acyl de la lecithine ou de la phosphatidylethanolamine sur leur résidu hydroxyl libre<sup>121</sup>. Le cholestérol ester

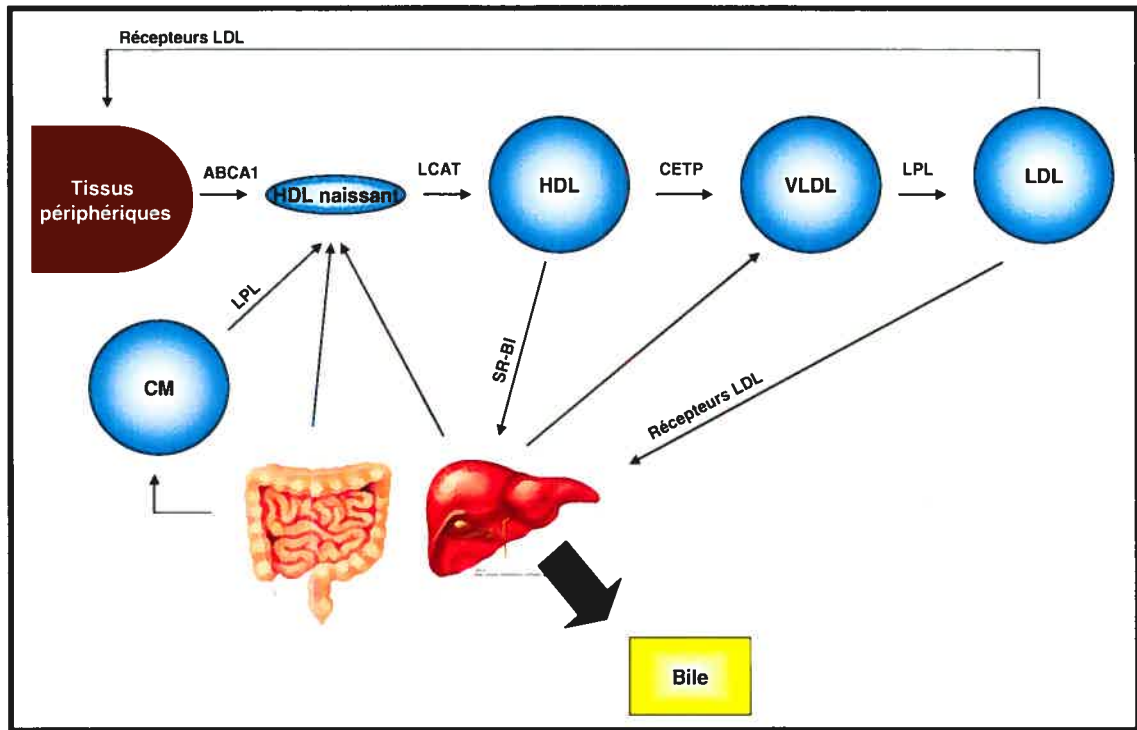


ainsi formé migre au cœur du HDL. L'emmagasinement de cholestérol ester donne une forme sphérique aux HDL que l'on nomme alors HDL3. Ces lipoprotéines entrent ensuite en contact avec les autres lipoprotéines (chylomicron, VLDL, IDL, LDL) et sous l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), elles échangeront le cholestérol ester contre des triglycérides provenant des VLDL et des LDL<sup>114, 126</sup>. C'est à cette étape que le HDL3 devient HDL2. La lipase hépatique (LH) hydrolyse les TG et phospholipides du HDL2 pour ainsi régénérer un HDL3 qui retourne à la circulation pour recommencer le cycle. L'apo A-I, composante majeure des HDL, est reconnue comme le principal activateur de la LCAT<sup>127</sup>. Par conséquent, il a été observé qu'une mutation de l'apo A-I ou de la LCAT peut causer une accumulation des HDL discoïdaux plasmatique<sup>128</sup>.

Le SR-BI (scavenger receptor class B type 1) est une glycoprotéine membranaire de 82 kDa présente majoritairement dans le foie, mais aussi au niveau du cerveau, de l'intestin, des macrophages et des cellules endothéliales<sup>129</sup>. Le SR-BI influence la prise du cholestérol ester des HDL par le foie pour son élimination dans la bile. L'apo A-I, l'apolipoprotéine majeure des HDL, est un important ligand du SR-BI<sup>130</sup>. D'ailleurs la conformation de l'apo A-I influence l'interaction entre le SR-BI et les HDL. Notons que le SR-BI a une plus grande affinité pour les HDL sphériques, riches en CE, que pour HDL naissantes, pauvres en CE<sup>131</sup>.

L'apo A-I est donc impliquée tout au long du transport inverse du cholestérol vers le foie. En effet, l'apo A-I est non seulement impliquée dans l'efflux de cholestérol de la cellule aux HDL grâce à l'ABCA1<sup>122</sup>, mais favorise également l'augmentation de l'activité de la LCAT<sup>127</sup> et la liaison du SR-BI aux HDL<sup>131</sup>. Ce mécanisme de retour du cholestérol au foie est particulièrement important puisque c'est le seul moyen que possède notre organisme pour éliminer l'excès de cholestérol.

Figure 14. Transport inverse du cholestérol par les HDL



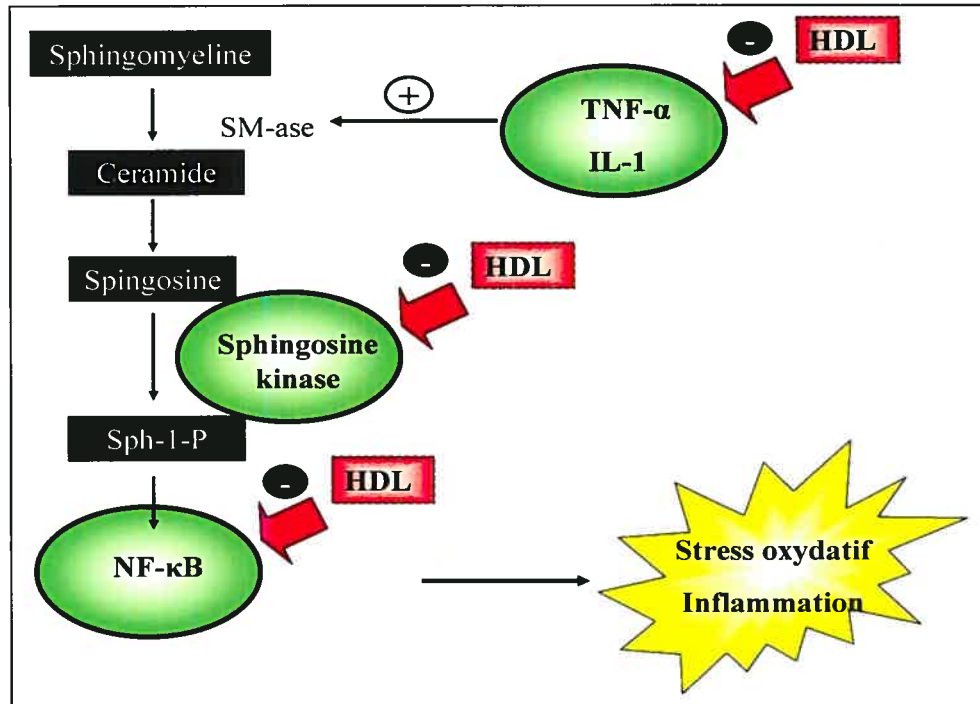
*HDL : High density lipoprotein; VLDL : Very low density lipoprotein; LDL : Low density lipoprotein; CM : Chylomicron ; SR-BI : Scavenger receptor de classe B type 1; ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1; LCAT : Lecithin cholesterol acyltransferase; CETP : Cholesteryl ester transfer protein ; LPL : Lipoprotéine lipase*

### 3.4.2 Les propriétés anti-inflammatoires des HDL

L'athérosclérose est un désordre inflammatoire chronique caractérisé par une accumulation de macrophages et de lymphocytes T dans l'intima artérielle. Ce processus est caractérisé par l'augmentation des protéines d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine) qui favoriseront l'attachement de monocytes aux cellules endothéliales.

Les LDLox sont des puissants inducteurs de l'expression des protéines d'adhésion telles que la VCAM-1, la ICAM-1 et la E-selectine<sup>132</sup>. Ces molécules sont exprimées par les cellules endothéliales et favorisent l'adhésion de monocytes à leur surface qui seront ensuite recrutés dans l'espace sous-endothélial par certaines chemokines dont la MCP-1. Cette protéine est produite par les cellules endothéliales en réponse, par exemple, à un stress, à la présence de LDLox ou à la protéine C-réactive (CRP), un marqueur de l'athérosclérose<sup>119, 133</sup>. De plus, la CRP peut entraîner une réduction de la eNOS et une induction des protéines d'adhésion. Plusieurs études ont observé une atténuation des produits d'inflammation en présence d'HDL<sup>134</sup>. Le mécanisme pourrait s'expliquer par le fait que les HDL réduiraient le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1 et la sphingosine kinase<sup>135</sup>. Ceci aurait pour conséquence d'inhiber l'activation de NF-kB, un puissant facteur de transcription nucléaire qui stimule le stress oxydatif et l'inflammation<sup>135,136</sup>. Les HDL peuvent également inhiber la MCP-1<sup>133</sup>. En effet, la protéine C-réactive, qui augmente la sécrétion de MCP-1, réduit la eNOS et induit la VCAM-1, la ICAM-1 et la E-selectine, est inhibée par les HDL. Ce phénomène a été observé en incubant des cellules HUVEC stimulées par la CRP en présence de HDL<sup>137</sup>.

**Figure 15. Effets anti-inflammatoires des HDL**



*HDL : High density lipoprotein; TNF-α : Tumor necrosis factor-alpha; NF-κB : Nuclear factor-kappa B*

Adapté de Xia<sup>135</sup>

### 3.4.3 Les propriétés anti-oxydantes des HDL

L'impact de l'oxydation des LDL dans la formation de la plaque d'athérosclérose est largement admis<sup>138</sup>. Les LDL peuvent être oxydées par l'action de radicaux d'oxygène réactifs (par exemple  $O_2^-$  et  $OH^\cdot$ ) sur leurs phospholipides et cholestérol estérifié<sup>139</sup>. Les hydroperoxydes ainsi formés ont des pouvoirs pro-athérogéniques puissants. En effet, les LDLox peuvent induire l'expression des molécules d'adhésion et des facteurs chemotactiques. Cette théorie oxydative a conduit les scientifiques à envisager que les HDL pourraient aussi avoir des propriétés anti-oxydantes.

Effectivement, de nombreuses études ont démontré que les HDL possèdent dans leurs structures des enzymes qui leur permettent de se protéger elles-mêmes et de prévenir l'oxydation des LDL. Les principales enzymes qui confèrent aux HDL des propriétés anti-oxydantes sont l'apo A-I, les paraoxonases (PON 1, PON 3), la PAF-AH (Platelet Activating Factor AcetylHydrolase), la LCAT (lecithin :cholesterol acyltransferase)<sup>140</sup> et le CETP (cholesteryl ester transfer protein)<sup>141</sup>.

Tout d'abord, l'apo A-I, l'apolipoprotéine majeure des HDL, a le pouvoir de rendre les LDL résistants à l'oxydation. Ainsi, des injections d'apo A-I chez des souris et des humains ont rendu les LDL moins susceptibles à l'oxydation<sup>142</sup>. Des études animales ont démontré que les HDL provenant de souris contrôles ont inhibé la peroxydation lipidique des LDL, mais l'effet des HDL provenant des souris transgéniques (apo A-I) a été de deux fois supérieur à celui des HDL des souris contrôles<sup>143</sup>. Par ailleurs, il a été proposé que les résidus de méthionine de l'apoA-I pourraient piéger les radicaux d'oxygène réactifs et donc prévenir l'oxydation de LDL<sup>144</sup>. Par conséquent, en plus de jouer des rôles cruciaux dans le processus du transport inverse du cholestérol, l'apo A-I s'avère être un joueur important au niveau de la défense anti-oxydante des HDL.

Les paraoxonases sont des enzymes qui confèrent aux HDL des propriétés anti-oxydantes. Il existe trois paraoxonases soit PON1, PON2 et PON3. PON 1 est largement plus connue que les autres PON étant donné la multitude de travaux s'y étant intéressée. Elle est synthétisée par le foie et est associée aux HDL<sup>145</sup>. PON1 constituerait l'un des principaux mécanismes inhibant l'oxydation des LDL et des HDL en hydrolysant par exemple des hydroperoxydes<sup>146,147</sup>. Elle serait également capable de diminuer la captation des LDLox par les macrophages<sup>145, 148</sup>. Des investigateurs ont observé une réduction de l'activité de PON1 dans des pathologies comportant un taux élevé de stress oxydatif comme les maladies cardiovasculaires, certaines conditions inflammatoires et le diabète. Le rôle direct de PON1 a été démontré par le fait que des HDL isolées de souris knockout pour PON1 sont incapables de réduire les LDL oxydées contrairement à des HDL isolées de souris contrôles<sup>148</sup>. PON2 est exprimée de façon ubiquitaire dans les

cellules<sup>149</sup>. Ses fonctions sont encore mal connues mais il est proposé que PON 2 pourrait être un agent antioxydant au niveau cellulaire<sup>147</sup>. PON3 est essentiellement associée aux HDL, mais à des niveaux moins élevés que PON1, et possède aussi une activité antioxydante. En effet, PON3 pourrait entraver l'oxydation des LDL<sup>150, 151</sup>.

La PAF (platelet-activating factor) stimule les macrophages à produire l'anion superoxyde contribuant ainsi au développement de l'athérosclérose<sup>152</sup>. Ce facteur est inactivé par la PAF-AH (PAF- acetylhydrolase), une enzyme associée aux HDL, qui hydrolyse le groupe sn-2 du PAF. La PAF-AH est relâchée, entre autres, par les monocytes, les macrophages, les plaquettes et les érythrocytes<sup>153</sup>. Des études ont démontré que la surexpression de l'apo A-I humain augmente le potentiel anti-inflammatoire et antioxydatif de la PAF-AH liée aux HDL<sup>154</sup>. Chez l'humain, la PAF-AH est véhiculée par les lipoprotéines, soit le 2/3 avec les LDL et le 1/3 avec les HDL<sup>136</sup>. Par ailleurs, il a été suggéré que PON1 aurait le pouvoir d'activer la PAF-AH.

Il est bien établi que la LCAT joue un rôle essentiel dans le retour inverse du cholestérol. Selon certaines recherches, la LCAT ne serait pas uniquement capable d'estérifier le cholestérol à la surface des HDL. En effet, des travaux ont mis en évidence que la LCAT offre une prévention contre l'accumulation des lipides oxydés dans les LDL<sup>155</sup>. La LCAT semble par conséquent posséder une certaine activité antioxydante.

Le CETP est connu pour sa promotion du transfert de CE des HDL vers les lipoprotéines contenant l'apo B, incluant les VLDL et les LDL. Une déficience en CETP est par conséquent associée à une augmentation des HDL et à une diminution des LDL<sup>156</sup>. En plus d'être impliqué dans ce transfert de CE, des investigations ont démontré que l'inhibition du CETP augmente les enzymes antioxydantes des HDL et provoque ainsi une diminution de l'oxydation des LDL<sup>141</sup>. Cependant, les données concernant le potentiel bénéfique du CETP pour les propriétés antioxydantes des HDL sont encore peu nombreuses et divergentes<sup>157,</sup>

Des recherches assez récentes ont observé la présence de HDL dysfonctionnelles chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires ou de diabète<sup>159</sup>. De plus, chez des patients en phase pré-opératoire, des HDL isolés présentaient des propriétés anti-inflammatoires, cependant, chez ces mêmes patients lors de la phase post-opératoire, les HDL isolés ont favorisé l'oxydation des LDL<sup>160</sup>. Ces résultats appuient le concept selon lequel, en situation aigue, les HDL peuvent être incapables de se défendre convenablement et deviendraient une lipoprotéine dysfonctionnelle ne maîtrisant plus le développement de l'athérosclérose. Les mécanismes impliqués dans cette transition restent encore obscurs. Cependant, des investigations démontrent que la myeloperoxydase (MPO), une enzyme inflammatoire, serait impliquée dans cette transition où le « bon » cholestérol devient « mauvais ». En effet, la MPO aurait une affinité particulière pour l'apo A-I, l'apo majeure des HDL<sup>161</sup>. La MPO est abondante dans les macrophages lors des lésions athérosclérotiques<sup>115</sup> et endommagerait particulièrement l'apo A-I sur ses acides aminés tyrosine<sup>162</sup>. Ces dommages provoqueraient alors une réduction dans le contenu en apo A-I et en paraoxonase. Il existe d'ailleurs une relation inverse entre le nombre de tyrosines modifiées par la MPO et la capacité des HDL à capter le cholestérol des cellules. La MPO favorise également la peroxydation lipidique et la formation des LDL oxydées. Compte tenu des modifications effectuées sur l'apo A-I, les HDL sont moins aptes à promouvoir l'efflux de cholestérol des cellules via l'ABCA-1<sup>163, 164</sup>. On constate par conséquent une augmentation de l'inflammation et des lipides dans les artères des patients ayant une maladie cardiovasculaire.

Ce phénomène pourrait bien soulever de nombreux questionnements sur les traitements pharmaceutique et nutritionnel actuellement préconisés puisque ceux-ci valorisent en tout temps une augmentation des HDL sanguins. Nul doute qu'un taux bas de HDL est néfaste pour la santé, mais il semble bien que la qualité des HDL deviendrait peut être le meilleur indicateur du risque de développer une maladie cardiovasculaire.

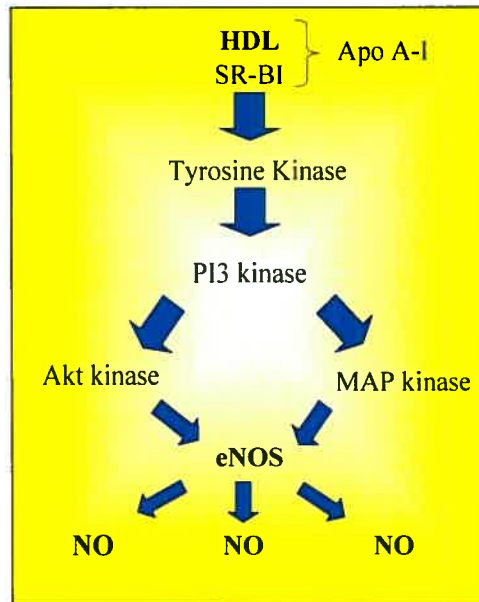
### 3.4.4 Les propriétés anti-thrombotiques des HDL

La thrombose se définit comme la formation d'un caillot dans un vaisseau sanguin. L'oxyde nitrique (NO) qui est un puissant vasodilatateur inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium<sup>165</sup>. Il est donc un facteur de protection pour la santé cardiovasculaire. Il a été d'ailleurs démontré qu'une inhibition chronique de la synthèse de NO entraîne une accélération de la dysfonction vasculaire<sup>166, 167</sup>. Les LDLox sont des puissants inhibiteurs du NO favorisant ainsi une augmentation des risques de thrombose. Par contre, les HDL peuvent contrecarrer les effets sur la synthèse du NO et agir en tant que facteur de protection.

Des études ont observé que les HDL induisent la relaxation de l'endothélium chez des souris via une augmentation de NO, ce qui ne se produit cependant pas chez des souris knock-out pour SR-BI<sup>168</sup>. Il est donc suggéré que le SR-BI est essentiel à ce mécanisme. Des chercheurs proposent qu'en se liant au SR-BI grâce à l'apo A-I<sup>168, 169</sup>, les HDL activeraient une tyrosine kinase (Src), laquelle induirait à son tour la PI3 Kinase. Cette dernière stimulerait ensuite l'activation de l'Akt kinase et de MAP kinases par deux voies distinctes<sup>170</sup>. L'Akt kinase activerait l'eNOS en phosphorylant directement l'enzyme sur les résidus Ser-1179<sup>170</sup>. Le mécanisme par lequel les MAPK stimulerait l'eNOS est cependant peu connu. Il semble toutefois que l'action commune de l'Akt et des MAPK est requise pour l'activation de la voie eNOS induite par les HDL<sup>170</sup>.



**Figure 16. Effet des HDL sur la synthèse de NO**



*HDL : High density lipoprotein; SR-BI : Scavenger receptor de classe B type 1; Apo A-I : Apolipoprotéine A-I; PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase; MAPkinase : Mitogen activated protein kinase; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; NO: Oxyde nitrique*

Adapté de Mineo<sup>170</sup>

La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) est une prostaglandine produite par l'endothélium et a un effet vasodilatateur<sup>171</sup>. La PGI<sub>2</sub> agit sur les récepteurs de la prostacycline des muscles lisses afin d'activer l'adénylate cyclase et ainsi inhiber la contraction musculaire. Elle aurait aussi le pouvoir de diminuer l'agrégation plaquettaire<sup>161</sup>. D'autre part, elle est capable d'augmenter la synthèse de NO dans les cellules endothéliales et, en retour, le NO amplifie l'effet de la prostacycline sur la relaxation musculaire<sup>165</sup>. La PGI<sub>2</sub> et le NO agissent donc de façon synergique pour induire la relaxation des muscles lisses. De son côté, la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) est également une prostaglandine produite par l'endothélium qui contrairement à la prostacycline, favorise la contraction musculaire et l'agrégation plaquettaire<sup>165</sup>. Il est essentiel d'avoir un ratio PGI<sub>2</sub> /TXA<sub>2</sub> pour une bonne santé cardiaque. Des cellules endothéliales en culture en présence de HDL produisent une augmentation dose dépendante de PGI<sub>2</sub><sup>172</sup>.

Des études ont également démontré que les taux de HDL seraient inversement proportionnels aux taux du facteur von Willebrand (vWF)<sup>173</sup>. Ce facteur est un ligand produit par les cellules endothéliales et est essentiel à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes lors de bris vasculaires<sup>165</sup>. Un taux plus élevé de HDL conduit encore une fois à une diminution des risques de thrombose.

Finalement, l'endothélium contrôle la relâche de l'activateur du plasminogène (tPA) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1). Ensemble, ces derniers régulent l'activité de la plasmine, une enzyme qui coupe les liens de la fibrine et donc fait entrave à la formation du thrombus. Les LDLox augmenteraient la tPA et diminueraient la PAI-1. Les HDL renverseraient cet effet en favorisant un équilibre normal entre le tPA et le PAI-1<sup>174</sup>.

### **3.4.5 Les propriétés anti-infectieuses des HDL**

Le LPS est un lipopolysaccharide que l'on retrouve dans la membrane des cellules gram négative<sup>175</sup>. Il favorise l'inflammation en augmentant l'expression de cytokines, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1<sup>176</sup>. Les HDL auraient la capacité d'inhiber les effets du LPS. L'une des hypothèses est que les HDL serait capable de capter sur leurs membranes le LPS et de le neutraliser. Ce mécanisme est cependant encore mal compris. Actuellement, il est proposé que deux protéines plasmatiques, la LBP (LPS binding protein) et le CD14 joueraient un grand rôle dans le transport du LPS jusqu'au HDL<sup>177</sup>. La LBP semble favoriser le transport du LPS au CD14 avec lequel il forme un complexe<sup>136, 178</sup>. La LBP serait également responsable du transfert de ce complexe jusqu'aux HDL qui participeraient à sa neutralisation<sup>136</sup>.

D'autre part, d'autres études suggèrent que la LBP et le PLTP (phospholipid transfer protein) serviraient de navette pour le LPS vers les HDL puis vers les LDL. Ce transfert favoriserait la formation d'un complexe HDL-LDL<sup>179</sup>. Ce phénomène se produirait lors de l'inflammation et contribuerait possiblement aux dyslipidémies observées dans les cas cliniques d'infections aiguës<sup>179</sup>.

### 3.4.6 Les propriétés anti-apoptotiques des HDL

L'apoptose des cellules endothéliales est observée dans de multiples pathologies cardiovasculaires, incluant l'athérosclérose. Elle peut entraîner, par exemple, une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire et une élévation des risques de thrombose<sup>171</sup>.

Les LDLox favorisent l'apoptose de plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales<sup>180</sup> et les cellules musculaires lisses<sup>181</sup>. Cet effet des LDLox peut résulter de l'activation des caspases 3 et 9 favorisant ainsi la voie de l'apoptose<sup>180</sup>. Des observations ont démontré que les HDL et particulièrement l'apo A-I sont capables de prévenir la mort cellulaire de cellules endothéliales induites par des LDLox<sup>182</sup>. En effet, les HDL peuvent protéger les cellules endothéliales humaines contre l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  et cet effet est le résultat de l'inhibition de l'activité de la caspase 3 et 9<sup>183, 184</sup>. Les HDL pourraient également diminuer le relâchement du cytochrome C des mitochondries qui est également impliqué dans l'apoptose.

Par ailleurs, d'autres études ont démontré que l'activité anti-apoptotique des HDL serait également reliée à l'activation de l'Akt, un médiateur anti-apoptotique, via la PI3K<sup>185</sup>. Cette voie augmente la synthèse du NO et offre donc une protection contre l'apoptose.

Des recherches récentes proposent que les lysophingolipides transportés par les HDL seraient actifs et qu'ils pourraient agir sur l'endothélium, probablement par signalisation cellulaire, augmenter la synthèse de NO et inhiber la voie des caspases. Ces lysophingolipides sont la spingosine-1-phosphate (S1P), la sphingosylphosphorylcholine (SPC) et le lysosulfatide (LSF)<sup>185</sup>. Des études récentes ont d'ailleurs démontré qu' *in vitro*, les HDL et la S1P peuvent protéger des cardiomyocytes contre l'apoptose. Ce potentiel antiapoptotique dépendrait du S1P<sub>3</sub><sup>186</sup> et impliquerait également la voie de synthèse du NO<sup>186, 187</sup>.

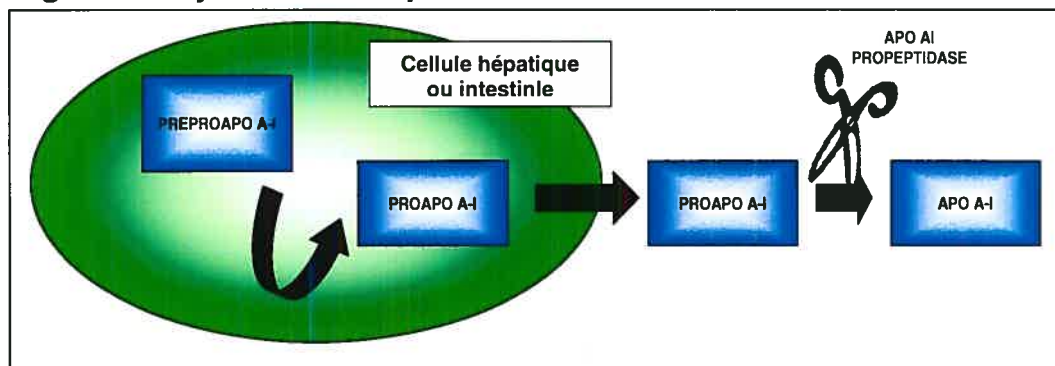
## 4- L'APOLIPOPROTÉINE A-I

Les HDL ont de nombreuses fonctions bénéfiques pour la santé. Les scientifiques leur reconnaissent aujourd'hui des fonctions anti-athérogéniques, anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-thrombotiques, anti-infectieuses et anti-apoptotiques. L'apolipoprotéine A-I (apo A-I) est reconnue comme l'apolipoprotéine majeure constitutive des HDL avec un pouvoir protecteur contre les maladies cardiovasculaires. La production de l'apo A-I étant associée aux taux plasmatiques des HDL<sup>188</sup>, l'augmentation de sa synthèse pourrait donc contribuer à l'élévation des niveaux de HDL sanguins entraînant ainsi une diminution des risques de développer l'athérosclérose. Compte tenu de la grande incidence des maladies cardiovasculaires nul doute que la régulation de la synthèse de l'apo A-I est un sujet de choix pour de nombreux chercheurs.

### 4.1 Synthèse de l'apo A-I

Le foie et l'intestin grêle sont les deux sites majeurs de la synthèse de l'apo A-I<sup>189</sup>. L'apo A-I est synthétisée dans ces organes sous la forme d'un précurseur appelé preproapo A-I<sup>190</sup>. Un clivage du prépeptide intervient dans la cellule afin d'obtenir le proapo A-I. Dans la circulation sanguine, la proapo A-I est coupée par une enzyme protéolytique spécifique nommée apo A-I propeptidase afin d'obtenir l'apo A-I mature<sup>191</sup>. L'apo A-I mature est un polypeptide non glycosylé composé de 243 acides aminés et ayant un poids moléculaire de 28 kDa<sup>192</sup>.

Figure 17. Synthèse de l'apo A-I



*Apo : Apolipoprotéine*

## 4.2 Fonctions de l'apo A-I

L'une des fonctions les mieux connues de l'apo A-I est son rôle crucial dans le transport inverse de cholestérol. En effet, l'apo A-I est un acteur indispensable au processus du retour du cholestérol au foie ; elle est non seulement impliquée dans l'efflux de cholestérol de la cellule aux HDL grâce à l'ABCA1<sup>122</sup>, mais favorise également l'augmentation de l'activité de la LCAT<sup>127</sup> et la liaison du SR-BI aux HDL<sup>131</sup> afin d'assurer le retour du cholestérol au foie. Ce mécanisme est particulièrement important puisque c'est le seul moyen que le corps humain possède pour éliminer l'excès de cholestérol. Par conséquent, des défauts dans la structure ou la synthèse de l'apo A-I peuvent conduire à des désordres dans le système de transport des lipides plasmatiques et ainsi augmenter les risques de développer une maladie artérielle. L'inhibition de la synthèse de l'apo A-I chez des souris a d'ailleurs été associée à des réductions des taux de HDL, à une augmentation de l'inflammation ainsi qu'à des maladies artérielles<sup>193</sup>. Inversement, chez des souris transgéniques surexprimant l'apo A-I, des concentrations plus élevées d'apo A-I et de HDL plasmatiques ont été observées accompagnées d'une diminution des effets d'une diète riche en cholestérol sur les risques de développer l'athérosclérose<sup>194</sup>.

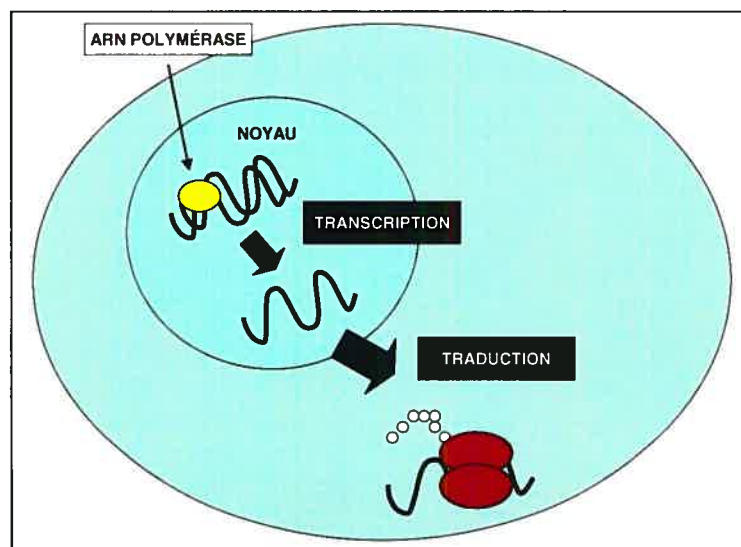
La surexpression de l'apo A-I humain élève aussi le potentiel anti-inflammatoire et antioxydant de la PAF-AH liée aux HDL<sup>154</sup>. L'apo A-I semble être également essentielle aux fonctions anti-thrombotiques des HDL, puisqu'en se liant au SR-BI grâce à l'apo A-I que les HDL peuvent activer la voie de synthèse du NO et favoriser la dilatation des artères. Finalement, l'apo A-I a une activité antioxydante, car les résidus méthionine de l'apo A-I sont capables d'emprisonner les radicaux d'oxygène réactifs<sup>144</sup>. L'apo A-I participe donc à la protection des HDL et des LDL contre l'oxydation<sup>142, 143</sup>.

### 4.3 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'apo A-I

Les scientifiques prennent de plus en plus conscience des nombreuses fonctions bénéfiques de l'apo A-I sur la santé et la compréhension de sa modulation se révèle alors primordiale. Grâce aux nombreuses études effectuées sur la régulation du gène de l'apo A-I, les scientifiques ont établi certains facteurs physiologiques, pharmacologiques et nutritionnels agissant comme des stimulateurs ou des inhibiteurs de la transcription du gène de l'apo A-I et donc de sa protéine. Ainsi, il semble que la régulation de l'apo A-I s'effectue de façon transcriptionnelle et post-transcriptionnelle<sup>190</sup>.

La transcription est un processus qui consiste à faire une copie des régions codantes de l'ADN en ARN. L'enzyme qui initie la transcription est l'ARN polymérase. Sa fixation sur le promoteur et son activation sont influencées par des facteurs de transcription qui peuvent être des activateurs ou des inhibiteurs de la transcription génique. Ces derniers se fixeront au niveau des séquences cis-régulatrices sur le promoteur en réponse à certains stimuli. Une fois la transcription terminée, l'ARN sortira du noyau afin de commencer sa traduction dans le cytoplasme. La traduction est l'interprétation de l'ARNm en acides aminés. L'ARN est donc traduit en protéine.

**Figure 18. Synthèse de protéine**

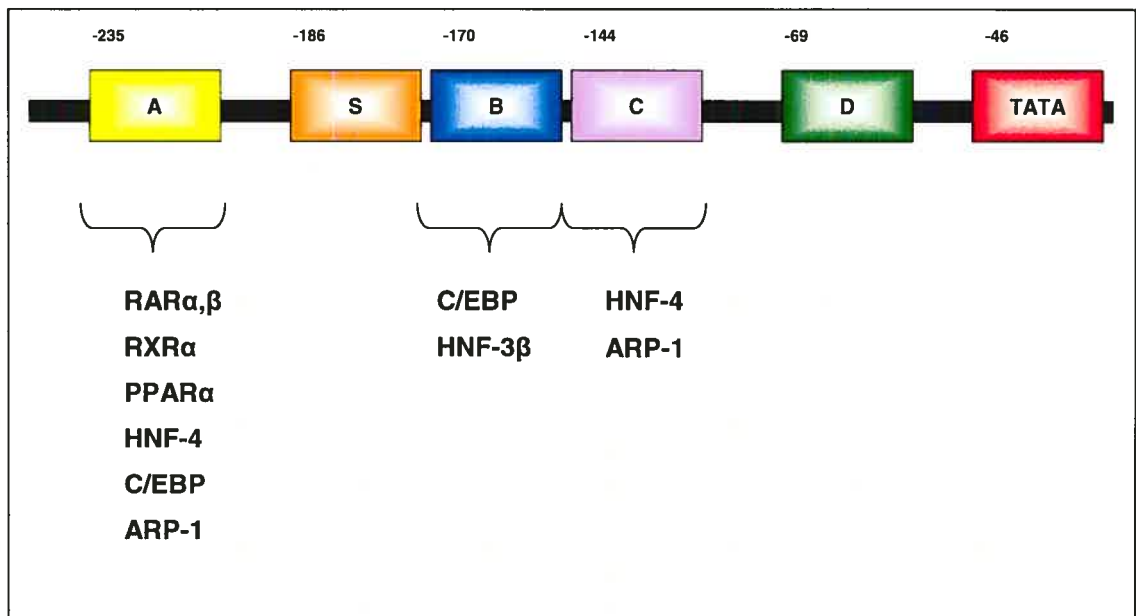


### 4.3.1 La régulation transcriptionnelle de l'apo A-I

Le promoteur du gène de l'apo A-I renferme trois sites dont l'intégrité est essentielle à la modulation de l'apo A-I, soient le site A (-214 à -192), le site B (-169 à -146) et le site C (-134 à -119)<sup>195</sup>. Ces sites sont modulés par une variété de signaux hormonaux ou métaboliques. Le promoteur contient également une boîte TATA qui termine la partie régulatrice du gène<sup>196</sup>.

Les facteurs de transcription peuvent donc avoir un effet stimulateur ou inhibiteur sur la transcription du gène de l'apo A-I. Ainsi, Le site A peut se lier aux récepteurs RAR, RXR $\alpha$  et PPAR $\alpha$ , le site B aux C/EBP, HNF-3  $\beta$  et aux glucocorticoïdes et le site C aux HNF-4 et ARP-1<sup>196</sup>.

**Figure 19. Promoteur de l'apo A-I**



*RAR : Retinoic acid receptor; RXR : Retinoic X receptor; PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor; HNF-4 : Hepatocyte nuclear factor; HNF-3 $\beta$  : Hepatocyte nuclear factor; C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein; ARP-1: Apo A-I regulatory protein-1*

#### 4.3.1.1 Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes qui sont utilisées surtout pour leurs effets anti-inflammatoires. Des observations cliniques ont démontré des taux plus élevés d'apo A-I et de HDL chez des patients présentant un excès de glucocorticoïdes<sup>197</sup>. Cette augmentation de taux d'apo A-I et des HDL a été également retrouvée lors d'études animales. Des glucocorticoïdes synthétiques injectés à des rats ont augmenté leurs taux sanguins d'apo A-I et de l'ARNm de l'apo A-I hépatique<sup>198</sup>. Cette hausse de l'apo A-I a aussi été remarquée de façon dose-dépendante lors d'incubation de cellules hépatiques (HepG2) avec la dexaméthasone<sup>199</sup>. Cet effet des glucocorticoïdes, au niveau des cellules hépatiques, semble résulter de la liaison du site B du promoteur du gène de l'apo A-I et du facteur de transcription HNF-3 $\beta$ . Cette liaison engendre alors une activation de la transcription du gène de l'apo A-I<sup>200, 201</sup>.

#### 4.3.1.2 Les oestrogènes

Plusieurs études ont remarqué une augmentation des concentrations de HDL et d'apo A-I plasmatique chez des femmes post ménopausées recevant des oestrogènes<sup>202, 203</sup>. Ce phénomène a également été observé dans des cellules hépatiques (HepG2) en culture où les oestrogènes ont modulé à la hausse la transcription du gène de l'apo A-I<sup>204</sup>. Le promoteur du gène de l'apo A-I ne contient cependant pas l'élément réponse de l'oestrogène (ERE : estrogen response element)<sup>205</sup>. Des recherches effectuées sur des cellules hépatiques indiquent que l'augmentation de la transcription du gène de l'apo A-I se ferait grâce à une action synergique des facteurs de transcription HNF-4 et HNF-3 $\beta$  qui se lieraient aux sites A et B, respectivement, du gène de l'apo A-I<sup>200, 201</sup>.



### 4.3.1.3 Les fibrates

Les fibrates sont des agents pharmacologiques entraînant une réduction du cholestérol total. Chez les rongeurs, les fibrates diminuent l'ARNm hépatique de l'apo A-I, sans avoir d'effet au niveau intestinal<sup>206</sup>. Chez l'humain, les fibrates entraînent une augmentation des HDL sanguins via une induction de l'expression du gène de l'apo A-I. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que chez le rat, et non chez l'humain, la transcription de l'apo A-I est diminuée par un récepteur nucléaire nommé Rev-erba qui se lie à la boîte TATA sur le promoteur de l'apo A-I. Des études démontrent que les fibrates augmentent l'ARNm de Rev-erba de 10 fois et donc provoquent une diminution de l'expression de l'apo A-I hépatique (et non intestinale)<sup>207</sup>. Chez l'humain, l'activation de l'expression de l'apo A-I passe par le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  lequel agit sur le PPRE (peroxisome proliferator response element) localisé dans le site A du gène de l'apo A-I<sup>208</sup>.

### 4.3.1.4 L'acide rétinoïque

Les effets de l'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A, sur l'expression de l'apo A-I sont encore aujourd'hui contradictoires. En effet, chez des cellules hépatiques de singes en culture, une augmentation de l'expression de l'apo A-I a été observée suite à l'ajout d'acide rétinoïque (9-cis ou 13-cis)<sup>209</sup>, tandis que d'autres études ont démontré que l'acide rétinoïque diminue l'expression du gène de l'apo A-I chez des rats<sup>210</sup>. Cette diminution de l'expression de l'apo A-I a également été observée dans une co-culture d'hépatocytes et de cellules épithéliales hépatiques incubés avec de l'AR<sup>211</sup>. D'autres travaux effectués chez le rat n'ont observé aucun effet de l'AR sur l'expression d'apo A-I hépatique<sup>212</sup>. Malgré le grand nombre d'études sur la régulation de l'apo A-I par l'AR au niveau hépatique, le mécanisme de régulation est encore mal compris et demande plus d'investigation. Contrairement au foie, les recherches portant sur l'effet de l'AR sur la synthèse de l'apo A-I au niveau de l'intestin sont fort peu nombreuses. Il est suggéré que le mécanisme d'action de l'AR sur le gène de l'apo A-I se ferait via

les récepteurs nucléaires RAR et RXR. Ces derniers pourraient se lier au RARE qui est présent dans la région régulatrice du gène de l'apo A-I<sup>213, 214</sup>. L'élément RARE de l'apo A-I humain pourrait lier l'homodimère RXR-RXR ou l'hétérodimère RAR-RXR, et serait essentiel à l'activation du promoteur du gène de l'apo A-I<sup>215, 216-217</sup>.

#### **4.3.1.5 L'acide cholique**

L'acide cholique est l'un des acides biliaires les plus abondants. Dans les études animales, il est utilisé en combinaison avec des régimes élevés en gras et en cholestérol. Une diminution de l'ARNm hépatique a été observée, chez des souris nourries avec de l'acide cholique<sup>218</sup>. Des études suggèrent que l'acide cholique exerce une régulation transcriptionnelle négative sur le gène de l'apo A-I via le facteur de transcription ARP-1 (ApoA-I regulatory protein 1). Ce facteur est connu pour son effet inhibiteur du gène de l'apo A-I.<sup>219</sup> L'ARP-1, un lie les sites A et C du promoteur de l'apo A-I et est un récepteur nucléaire dont le ligand n'est pas connu<sup>218</sup>.

### 4.3.2 La régulation post-transcriptionnelle de l'apo A-I

La régulation post-transcriptionnelle, comme son nom l'indique, a lieu lorsque l'ARN subit des modifications après l'étape de la transcription génique. En ce qui concerne le gène de l'apo A-I, deux principaux facteurs moduleraient la synthèse du gène de façon post-transcriptionnelle, soient les lipides alimentaires et les hormones thyroïdiennes.

#### 4.3.2.1 Les lipides alimentaires

Un régime riche en lipides chez l'humain induit des niveaux plasmatiques plus élevés en LDL et en HDL<sup>190</sup>. Chez des souris, il a été observé qu'une diète riche en lipides, en acides gras saturés et non en cholestérol, augmenterait la synthèse de l'apo A-I et des HDL<sup>220</sup>. Une diète riche en acides gras saturés provenant de l'huile de noix de coco a induit chez des lapins une augmentation de la synthèse des HDL et de l'apo A-I<sup>221</sup>. Le mécanisme d'action des acides gras saturés sur la régulation de l'apo A-I semble encore mal compris. Des observations suggèrent cependant que la régulation de l'apo A-I par les lipides alimentaires est post-transcriptionnelle. D'ailleurs, une étude sur des souris chez lesquelles l'apo A-I est augmentée par des lipides alimentaires n'a observé aucune augmentation de l'ARNm de l'apo A-I hépatique ou intestinale. Le taux de catabolisme des HDL et de l'apo A-I est cependant diminué traduisant une régulation post-transcriptionnelle de la part des lipides alimentaires, mais le mécanisme est encore mal compris<sup>222</sup>.

#### 4.3.2.2 Les hormones thyroïdiennes

L'impact des hormones thyroïdiennes sur la régulation de l'apo A-I chez l'humain semble contradictoire. Entre autres, des études ont observé des taux sanguins bas de HDL dans des cas d'hyperthyroïdie<sup>223</sup> et d'hypothyroïdie<sup>224</sup>.

Des résultats plus clairs ont été retrouvés chez les animaux. Chez des rats, en présence d'hypothyroïdie, l'ARNm hépatique de l'apo A-I est diminuée de

moitié, tandis qu'en présence d'hyperthyroïdie, l'ARNm est de deux fois augmenté, et ceci résulterait d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm de l'apo-A-I<sup>225</sup>. Ceci serait le principal effet des hormones thyroïdiennes sur la régulation de l'apo A-I. Cependant, certaines études rapportent que les hormones thyroïdiennes induiraient aussi une régulation transcriptionnelle du gène de l'apo A-I. Ainsi, chez les rongeurs, HNF-4 est connu pour se lier au site A du promoteur de l'apo A-I et en supprimer l'activité. HNF-4 serait également capable d'intervenir sur le récepteur de l'hormone thyroïdienne T3 (L-triiodothyronine) et ainsi contribuer négativement à l'expression du gène de l'apo A-I<sup>226</sup>.

Compte tenu de l'importance de l'apo A-I pour la santé, tous ces facteurs physiologiques, pharmacologiques et nutritionnels qui influencent sa régulation suscitent de grands espoirs. Étant l'apolipoprotéine constitutive majeure des HDL, elle pourrait en fait servir à la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires. Actuellement, l'un des régulateurs de l'apo A-I est l'acide rétinoïque qui possède un élément de réponse sur le promoteur du gène de l'apo A-I. Jusqu'à maintenant, les recherches se sont davantage intéressées à la synthèse de l'apo A-I au foie et les résultats obtenus sont contradictoires. Il est donc primordial d'effectuer de plus amples recherches afin de mieux comprendre la régulation de l'apo A-I au niveau hépatique et intestinal.

# **PROJET DE RECHERCHE**

## **1. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

De nombreuses études ont établi que la vitamine A et ses dérivés, les rétinoïdes, sont essentiels pour la croissance, la vision, la reproduction, le développement embryogénique et foetal. Il a aussi été démontré que les rétinoïdes inhibent le développement de plusieurs types de tumeurs et restreignent la propagation de cellules néoplasiques, suggérant ainsi leur possible implication comme agent thérapeutique pour le traitement du cancer. Cependant, les mécanismes d'action moléculaires de ce micronutriment pléiotropique sont encore très mal compris. Ceci est particulièrement vrai pour l'intestin, lequel joue pourtant un rôle central dans l'absorption, l'assimilation, le métabolisme et le transport de la vitamine A et de tous les rétinoïdes. Même si les rétinoïdes sont essentiels à une variété de processus cruciaux à la vie, la compréhension de leurs effets régulateurs sur la différenciation des cellules intestinales et leurs fonctions reste limitée. Compte tenu de leurs nombreux effets bénéfiques sur la santé, de nombreuses études se consacrent présentement à trouver des molécules pouvant augmenter les taux plasmatiques de l'apolipoprotéine A-I et des HDL. Plusieurs travaux démontrent que l'AR est capable d'agir via les récepteurs nucléaires RXR et RAR et de moduler ainsi l'expression de certains gènes cibles. Étant donné que l'apo A-I est l'apolipoprotéine constitutive majeure des HDL et possède sur son gène un élément réponse de l'AR, nous émettons l'hypothèse que l'AR pourrait contribuer à l'augmentation de la synthèse de l'apo A-I et par conséquent des HDL. Par ailleurs, nous postulons que l'apo A-I pourrait être abondamment synthétisée suite à l'action de l'AR sur la différenciation cellulaire.

Notre projet de recherche a pour objectif d'évaluer les effets de l'AR sur la prolifération et la différenciation cellulaire, d'étudier les mécanismes d'action de

l'AR sur les cellules intestinales et d'observer ses effets sur la synthèse des apolipoprotéines et des lipoprotéines, en particulier l'apo A-I et les HDL.

Pour répondre à ces nombreuses questions, nous avons utilisé les cellules intestinales Caco 2/15 qui ont la particularité d'acquérir les caractéristiques de l'intestin grêle (bordure en brosse, microvillosités) et de synthétiser des apolipoprotéines et des lipoprotéines. Les cellules Caco 2/15 ont été incubées à différents temps de confluence avec de l'AR. Nous avons évalué l'influence de l'AR sur la différenciation cellulaire, la synthèse des apolipoprotéines et des lipoprotéines. L'article qui suit présente en détail les méthodes utilisées et les résultats obtenus.

**Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion and apolipoprotein biogenesis**

Emilie Grenier<sup>1,2</sup>, Françoise Schwalm Maupas<sup>2</sup>, Edgard Delvin<sup>3</sup>, Ernest Seidman<sup>4</sup>, Alain Sane<sup>1,2</sup>, Jean-François Beaulieu<sup>5</sup>, Eric Tremblay<sup>5</sup>, Carole Garofalo<sup>1</sup>, Emile Levy<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Research Centre, CHU-Ste-Justine, Departments of <sup>2</sup>Nutrition, <sup>3</sup>Biochemistry, and <sup>4</sup>Pediatrics, Université de Montréal, Montreal (Quebec), Canada

<sup>5</sup>*Group on the Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract, Canadian Institute of Health Research, and Department of Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1H 5N4, Canada*

**Address correspondence to:**

Dr. Emile Levy  
Research Centre  
Gastroenterology, hepatology and nutrition Unit  
CHU-Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5  
Tel.: (514) 345-7783  
Fax: (514) 345-4999  
E-mail: [emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca)

**ABSTRACT**

Dietary vitamin A and its active metabolites, collectively known as retinoids, are considered essential nutrients for many functions as well as potent regulators of gene transcription and growth. Although the epithelium of the small intestine is characterized by rapid and constant renewal and enterocytes play a central role in the absorption and metabolism of alimentary retinol, very little is known about the function of retinoids in the human gastrointestinal epithelium, and mechanisms by which programs engage the cell cycle are poorly understood. We have assessed the effects of 9-cis-retinoic acid (RA) on proliferation and differentiation processes, as well as on lipid esterification, apolipoprotein (apo) biogenesis and lipoprotein secretion along with nuclear factor gene transcription. Treatment of Caco-2 cells with RA at different concentrations and incubation periods revealed the reduction of thymidine incorporation in 60% pre-confluent or 0 confluent cells. Concomitant with this cell proliferation decline, RA (i) modulated D-type cyclins (cell cycle regulatory proteins) by reducing the mitogen-sensitive cyclin D1 expression (thereby blocking DNA synthesis and cell proliferation) and upregulating cyclin D3 expression (thereby inducing cell differentiation); and (ii) exhibited a trend of increase in p38 MAPK, which triggers CDX2, a central protein in cell differentiation. Despite the induction of cell differentiation, RA remained without effect on lipoprotein output and apo synthesis, even for apo A-I that possesses retinoic-response element in its promoter. In combination with 22-OH, RA could induce apo A-I gene expression without any impact on apo A-I mass. Only the gene expression of PPAR $\beta$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  was augmented and no alteration was noted in PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXRA, LXR $\beta$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , and RXR $\gamma$ . Taken together, these data highlight RA-induced cell differentiation via specific signalling and RA-mediated apo A-I and particular isoforms of PPAR and RAR gene expression when coupled with 22-OH.

**KEYWORDS**

Retinoids, apolipoproteins, lipoproteins, nuclear factors, lipids



## **INTRODUCTION**

Retinoic acid (RA), a low molecular weight lipophilic metabolite of Vitamin A (retinol), is the most potent natural retinoid able to influence biological processes such as cell growth and differentiation of various epithelia in the body (1, 2). RA acts by binding to retinoic receptors (RAR- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), which form heterodimers with retinoid X receptors (RXR- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), thereby inducing transcription of a wide array of specific target genes (3). Synthesis and degradation of RAR and RXR by proteasomes and phosphorylations control amount and timing of the retinoid responses. During development, absence of vitamin A can lead to an uncontrolled proliferation of epithelial stem cells that fail to differentiate into the normal phenotype in many lining epithelia (4). Although the small intestine is the first gateway for contact with dietary retinol as well as the unique organ for its absorption and metabolism, limited information is available as to the effects of RA on the mechanisms governing functional maturation.

Earlier studies established that mammalian apolipoprotein (apo) A-I is synthesized principally in the small intestine in addition to liver (5, 6). Apo A-I represents the major protein component of high-density lipoprotein (HDL) particles and has been attributed antiatherogenic properties in view of its potential to initiate the removal of excess cholesterol from peripheral tissues by enhancing cholesterol efflux, and to deliver it to the liver for degradation through reverse cholesterol transport pathways (7, 8). Apo A-I exhibits supplementary functions, which includes the protection against oxidative stress, inflammation, endothelium vasoconstriction and thrombosis (10-12). Therefore, multiple efforts have been exerted to find out nutrients and chemical agents that raise the levels of apo A-I, thereby providing new therapeutic options for the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. There have been several tantalizing clues that revealed diverse influences on apo A-I expression in liver versus intestine in response to developmental, dietary, hormonal, toxic, and pharmacologic stimuli (13-17). Retinoid status seems to regulate hepatic apo A-I gene expression. The administration of vitamin A to rats lowered hepatic apo A-I mRNA (18) and treatment of rat hepatocytes with retinoic acid resulted in a decrease in apo A-I gene expression (19). These observations indicate that retinoic acid suppressed the expression of apo A-I in rats. In contrast, a stimulatory effect on apo A-I

synthesis was noted in hepatoma cell lines (20) and in primary cultures from cynomolgus monkey (21). The reason for the discrepancy among studies is not fully clear. Additionally, opposite results were observed in intestinal cells (22, 23), which prompted us to investigate the regulation by retinoic acid of apo A-I in Caco-2 cell line, an interesting model frequently used to study lipid transport and lipoprotein assembly (24). Since a considerable body of evidence supports the concept that intestinal cell differentiation is an obligatory prerequisite for apolipoprotein biogenesis, we decided to focus on retinoic acid-mediated apo A-I modulation in the proliferative and differentiated states. The last aim of the present work was to determine the expression profile of various nuclear factors representing transacting factors that bind to retinoic acid response element (RARE) that have been identified in the promoter region of the apo A-I gene promoter (25).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in MEM (GIBCO BRL, Grand Island, NY) containing 1% penicillin/streptomycin and 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO BRL) and supplemented with 10% decomplexed fetal bovine serum (FBS; Flow, McLean, VA). Caco-2 cells (passages 30-40) were maintained in T-75 cm<sup>2</sup> flasks (Corning Glass Works, Corning, NY). Cultures were split (1:6) when they reached 70-90% confluence, using 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4- $\mu$ m pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as described above) supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayers. Cells were cultured for various periods, including 21 days, at which the Caco-2 cells are highly differentiated and appropriate for lipid synthesis (26, 27). The medium was refreshed every second day.

Retinoic acid (Sigma, Montreal, PQ, Canada) was then added to cells at different concentrations for 24 h. Sucrase activity was measured as a marker of cell differentiation and transepithelial resistance as a marker of monolayer integrity (Millipore, Bedford, MA) (26, 27). Cell viability was assessed by trypan blue exclusion (27). Furthermore, DNA and protein content was evaluated as previously described (27, 28). All these parameters were tested in the presence or absence of retinoic acid.

### **Cell Proliferation Analysis by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation**

The effect of retinoic acid on Caco-2 cell proliferative activity was determined by incubating cells with or without retinoic acid, in the presence of unlabeled oleic acid (as above) for 20 h. After 18 h of incubation, [<sup>3</sup>H] thymidine (10  $\mu$ Ci; sp act, 20  $\mu$ Ci / $\mu$ mol; Du Pont, Markham, ON, Canada) was added to each well. Cells were incubated for 2 h, washed with MEM (serum free), and then harvested with a rubber policeman. Cells were sonicated, and the incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine into DNA was measured in homogenates (counts. min<sup>-1</sup> DNA<sup>-1</sup>). DNA was quantified by a microfluorometric method.

### **Measurement of lipid synthesis and secretion**

Lipid synthesis and secretion were assayed as previously described (27, 29, 30). Briefly, radiolabeled [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid (sp act, 53 mCi/mmol; Amersham, Oakville, ON, Canada) was added to unlabeled oleic acid and then solubilized in fatty acid-free BSA [BSA/oleic acid, 1:5 (mol:mol)]. The final oleic acid concentration was 0.7 mM (0.45  $\mu\text{Ci}$ )/well. Cells were first washed with PBS (GIBCO), and the [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid-containing medium was added to the upper compartment.  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate (0.2 mM:2 mM) was added to the upper chamber in serum-free MEM. At the end of a 24-h incubation period, cells were washed, then scraped with a rubber policeman in a PBS solution containing antiproteases (phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, EDTA, aminocaproic acid, chloramphenicol, leupeptin, glutathione, benzamidine, dithiothreitol, sodium azide, and Trasylol, all at a final concentration of 1 mM). An aliquot was taken for lipid extraction by standard methods (27, 29, 30) in the presence of unlabeled carrier [phospholipids (PL), monoglycerides, diglycerides, triglycerides (TG), free fatty acids, free cholesterol (FC), and cholesteryl ester (CE)].

The various lipid classes synthesized from [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid were then separated by TLC using the solvent mixture of hexane, ether, and acetic acid (80:20:3, vol/vol/vol), as previously described (27, 29, 30). The area corresponding to each lipid was scratched off the TLC plates, and the silica powder was placed in a scintillation vial with Ready Safe counting fluid (Beckman, Fullerton, CA). Radioactivity was then measured by scintillation counting (LS 5000 TD, Beckman). Cell protein was quantified by the Bradford method, and results were expressed as dpm per milligram of cell protein. Lipid secreted in the basolateral compartment was analyzed and quantified, as described above, after centrifugation (2,000 rpm for 30 min at 4°C) to remove cell debris.

### **Lipid carrier**

Blood was drawn 2 h after the oral intake of a fat meal by human volunteers, and postprandial plasma was prepared to serve as a carrier for the lipoproteins synthesized by Caco-2 cells. The TG-enriched plasma was incubated at 56°C for 1 h to inactivate enzymatic activity in the presence of antiproteases.

### **Isolation of lipoproteins**

For the determination of secreted lipoproteins, Caco-2 cells were incubated with the lipid substrate as described above, in the presence or absence of retinoic acid. The medium supplemented with antiproteases (as described above) was first mixed with a plasma lipid carrier (4:1, vol/vol) to efficiently isolate de novo lipoproteins synthesized. The lipoproteins were then isolated by sequential ultracentrifugation using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman), as described previously (30). Briefly, chylomicrons were isolated after ultracentrifugation (20,000 rpm for 20 min). Very low-density lipoprotein (VLDL) (1.006 g/ml) and low-density lipoprotein (LDL) (1.063 g/ml) were separated by spinning at 100,000 g for 2.26 h with a tabletop ultracentrifuge 100.4 rotor at 4°C. The high-density lipoprotein (HDL) fraction was obtained by adjusting the LDL infranant to density at 1.21 g/ml and centrifuging for 6.5 h at 100,000 g. Each lipoprotein fraction was exhaustively dialyzed against 0.15 M NaCl and 0.001 M EDTA, pH 7.0, at 4°C for 24 h.

### **De novo apolipoprotein synthesis**

The effect of retinoic acid on newly synthesized and secreted apolipoprotein A-I (apo A-I), apo A-IV, apo B-48, apo B-100, and apo E was assessed as described previously (26, 27, 29, 30). To first induce apolipoprotein synthesis, cells were incubated apically with unlabeled oleic acid bound to albumin in serum-free medium, 24 h before [<sup>35</sup>S]methionine incubation. The concentration of the unlabeled lipid was equivalent to the labeled substrate described above. During this time, retinoic acid was again added to the apical chamber. After a 24-h incubation, cells as well as the outer chambers were rinsed twice with PBS (GIBCO). The apical compartment was replaced with 1.5 ml of methionine-free medium containing the unlabeled substrate and [<sup>35</sup>S]methionine (100 μCi/ml) (Amersham Life Sciences, 50 mCi/mmol). After incubation for 3 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, the medium from the basolateral compartment was collected. Cells were scraped off the inserts in the cell lysis buffer, as described above. The medium and cell lysates were supplemented with the antiprotease cocktail. To assay a considerable amount of de novo apolipoprotein synthesis, the material from two wells was pooled.

### **Immunoprecipitation of apolipoproteins**

The medium and cell lysates were first supplemented with unlabeled methionine to act as a carrier (final concentration, 0.1 mM). Immunoprecipitation was performed in the presence of excess polyclonal antibodies to human apolipoproteins (Boehringer Mannheim) at 4°C overnight (27, 30). Samples were then washed with Nonidet P-40 (0.05%). They were subsequently centrifuged and resuspended in sample buffer (1.2% SDS, 12% glycerol, 60 mM Tris, pH 7.3, 1.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.003% bromophenol blue) and analyzed by a linear 4-15% polyacrylamide gradient preceded by a 3% stacking gel, as described previously. Radioactive molecular weight standards (Amersham Life Sciences) were run in the same conditions. Gels were sectioned into 2-mm slices and counted after an overnight incubation with 1 ml of Beckman tissue solubilizer (0.5 N quaternary ammonium hydroxide in toluene) and 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready Organic, Beckman). Results for each apolipoprotein studied were expressed as percent dpm/mg protein to assess the specific effect of retinoic acid on apolipoprotein synthesis and secretion.

### **RT-PCR**

PCR experiments for the various genes as well as  $\beta$ -actin (as a control gene) were performed using the GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) as described previously (31). Approximately 30–40 cycles of amplification were used at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Amplicons were visualized on standard ethidium bromide-stained agarose gels. Importantly, we have established the experimental conditions relative to RT-PCR, which correspond to the linear portion of the exponential phase for every gene expression.

### **Statistical analysis**

All values were expressed as means  $\pm$  SE. Data were analyzed by two-tailed Student's t-test.

## **RESULTS**

### **Effect of RA on Caco-2 Cell Proliferation and integrity.**

Cell proliferation was assessed by [3H]thymidine incorporation at various periods of confluence. RA caused a decrease in Caco-2 cell proliferation as measured by [3H]-thymidine incorporation. On the other hand, RA remained without impact when the differentiation process was engaged, i.e. 10 d- and 21-d post-confluence.

Following treatment with RA, Caco-2 cell integrity was assessed by the determinations of cell monolayer transepithelial resistance and cell viability by trypan blue exclusion. No cytotoxic effect of RA was observed (Results not shown).

### **Effect of RA on Caco-2 Cell differentiation.**

Since D-type cyclins are believed to be cell cycle-promoting agents, we first studied their protein expression in proliferative and differentiated states. The treatment of Caco-2 cells with RA lowered cyclin D1 and raised cyclin D3, giving rise to the cyclin D3/cyclin D1 ratio (Figure 2).

Then, we examined the protein expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), an enzyme required for morphological and differentiation of enterocytes. The addition of RA resulted in little effect on PI3K protein expression at 60% as well as 0- and 10-day post-confluence. Besides, RA was able to reduce PI3K protein expression at 21-day post-confluence (Figure 3).

P38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) has recently emerged as a key modulator of various vertebrate cell differentiation processes. We therefore investigated whether it is modulated by RA. A significant raise was noted in its protein expression at 60% confluence, whereas only a trend was noted at confluence or at 10- and 21-d post-confluence (Figure 4). Additionally, we tested the influence of RA on activated p38 MAPK

by exposure of Caco-2 cells to environmental stress and found a fall at 10-d post confluence (Figure 5).

Finally, we sought to address the effect of RA on CDX2, a protein capable of suppressing proliferation and of promoting differentiation. Interestingly, RA significantly increased CDX2 protein expression at 60% confluence and lowered it at 10- and 21-d post-confluence (Figure 6).

#### **Effect of RA on apolipoprotein synthesis in Caco-2 cells.**

We explored the modulation of de novo apolipoprotein synthesis by RA in the presence and absence of 22-hydroxycholesterol (22-OH) during 6- and 24-h incubation culture. For the short incubation period, RA was unable to influence the biogenesis of apo A-I and apo A-IV (Figure 7) as well as that of apo B-48, apo B-100 and apo E (Figure 8). In contrast, 22-OH could increase the synthesis of all the apos. However, the addition of RA to 22-OH suppressed the 22-OH-induced biogenesis.

During the long incubation period, RA enhanced the apo A-IV synthesis only while 22-OH was effective in activating the production of apo A-I, apo A-IV, apo B-100 and apo E. The combination of RA and 22-OH did not induce any change in the level of synthesis of all the apolipoproteins.

#### **Effect of RA on lipoprotein secretion by Caco-2 cells.**

As illustrated in Figure 9, no substantial variations were observed in lipoprotein output following the addition of RA either at 4 or 24 hour-incubation.

#### **Effect of RA on nuclear factors in Caco-2 cells.**

In order to approach the mechanisms triggered by RA, we assessed the gene expression of PPAR, LXR, RXR and RAR in Caco-2 cells at 6 and 24 hours of incubation. RA and 22-OH did not exhibit an influence on PPAR $\alpha$  at the short incubation period (Figure 10). A significant lowering effect was recorded for 22-OH and 22-OH+RA. RA



elicited an enhancement in the gene expression of PPAR $\beta$  at 4 and 24 hours of incubation. The combination of RA and 22-OH significantly lowered PPAR $\beta$  gene expression. RA and 22-OH alone or in combination reduced the PPAR $\gamma$  gene expression.

When we tested the influence on RA and 22-OH on gene expression of LXR $\alpha$  and  $\beta$ , we could not note any substantial effect (Figure 11).

We also explored the impact of RA treatment on RXR in Caco-2 cells. We almost noted an increase in RXR $\alpha$  and RXR $\beta$  following the administration of RA to Caco-2 cells. 22-OH alone or in combination with RA seemed to cause a decline in their gene expression (Figure 12).

We finally turned to RAR regulation by RA and 22-OH. In general, a raise of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  resulted from the addition of RA. A trend of decrease was noted in the gene expression of this nuclear factors following the addition of 22-OH and an enhancement was recorded in RAR $\beta$  when RA and 22-OH were combined.

## **DISCUSSION**

RA is known to exert pleiotropic effects given its ability to modulate gene expression of various genes involved in growth, adaptation and function. We have, therefore, undertaken systematic studies to examine the impact of retinoic acid treatment on intestinal epithelial cell in order to examine its regulatory role in cellular proliferation and differentiation, as well as on lipid transport processes and transcriptional programs elicited by nuclear factors. Our data indicate that retinoic acid acted as a differentiation factor since, at 60% pre-confluence and at 0 day confluence, it (1) lowered labeled thymidine incorporation; (2) modulated D-type cyclins (cell cycle regulatory proteins) by reducing the mitogen-sensitive cyclin D1 expression (thereby blocking DNA synthesis and cell proliferation) and upregulating cyclin D3 expression (thereby inducing cell differentiation); and (3) showed a trend of increase in p38 MAPK, which triggers CDX2, a central protein in cell differentiation. Despite its capacity to diminish cell proliferation, retinoic acid was unable to increase intestinal apo A-I gene expression, apo A-I synthesis and HDL production. Furthermore, it remains without effect on the esterification of TG, CE and PL, the production of CM, VLDL and LDL, and the biogenesis of apo A-IV, B-48, B-100 and E. Moreover, it augmented the gene expression of PPAR $\beta$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  without altering that of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , and RXR $\gamma$ . Finally, when combined with 22-OH, retinoic acid could induce apo A-I gene expression without any impact on apo A-I mass.

In our studies with Caco-2 cells, retinoic acid diminished cell proliferation and raised cell differentiation in conditions of pre-confluence and confluence. Similarly, a number of in vivo and in vitro studies using various experimental models have revealed that RA plays a key role in embryonic development, the prevention and treatment of tumors, as well as cell proliferation and differentiation<sup>227, 228</sup>. In particular, our data are in line with many reports suggesting that RA is more active in inhibiting proliferation and inducing differentiation in relatively undifferentiated systems, i.e., murine F9 teratocarcinoma cells, promyelocytic HL-60 cells, L-6 melanoma cells, and neuroblastoma and embryonal stem cells P19<sup>229-231</sup>. In contrast, in other systems, such as keratinocytes<sup>232</sup>, embryonal lung cells<sup>233</sup>, and chick embryo hepatocytes<sup>234</sup>, proliferation is stimulated. Differentiation is also blocked in chondrocytes, osteocytes and adipocytes<sup>231</sup>. The reported contrasting

effects of RA can be explained by the existence of many types of RA-nuclear receptors, regulated both temporally and in a tissue-specific fashion.

In proliferating eukaryotic cells, the progression from G1 phase to S phase of the cell cycle is controlled by the expression of a subset of the cell cycle control genes. These include the D-type cyclin genes, which consist of three family members, cyclins D1, D2 and D3. The regulatory function of the d-type cyclins is mediated by their interactions with cyclin-dependent kinases (CDK) 2, 4 and 6 (39). Abnormal or untimely expression has the potential to disrupt the cell cycle, and therefore assign them as proliferation-promoting genes or oncogenes (40). Indeed, overexpression of the D-type cyclins has been reported in a large number of tumours (41-44). However, not all three D type cyclins are overexpressed in the same tumour and the three cyclins are differentially linked to poor prognosis (45, 46). In our study, the administration of RA to Caco-2 cells decreased cyclin D1 and increased cyclin D3, resulting in a significant D3/D1 ratio at 60% pre-confluence and at 0 day confluence. These data are congruent with the observation that overexpression of cyclin D1, but not cyclin D3 is linked to cancer carcinogenesis (47). At present, the mechanism by which RA enhanced cyclin D3 and lowered D1 is not clear.

PI3K belongs to a family of signal transducer heterodimeric enzymes composed of a 85-kDa regulatory subunit (p85  $\alpha$  or  $\beta$ ) containing SH2 and SH3 domains and a 110-kDa catalytic subunit (p110  $\alpha$  or  $\beta$ ) (48, 49) that phosphorylates the D3 hydroxyl in the inositol ring of phosphatidylinositol. PI3K is involved in the regulation of normal cellular processes such as cellular growth, vesicular trafficking, insulin-regulated glucose uptake and apoptosis. Although PI3K-signaling pathway has been implicated.

Recently, PI3K has been shown to be an important regulator of differentiation in certain cell types, including myogenic, intestinal and adipocyte differentiation (50). However, PI3K may behave as a negative regulator of cellular differentiation (51, 52). In our studies, PI3K did not change following RA treatment at 60% pre-confluence or at 0 confluence. On the other hand, p38 MAPK was augmented, which is congruent with its important role in various mammalian cell differentiating processes (50). Consistent with the notion that CDX2 has a critical function in intestinal cell differentiation within a regulatory

network that establishes the differentiated phenotype of intestinal epithelial cells (53), we found a RA-induced enhancement in Caco-2 cells at 60% confluence.

At present, the physiological effect of RA on apo A-I expression is not clear and likely to be complex as contradictory data have been noted both in vivo and in vitro. In the liver where most of the studies have been carried out, retinoids decreased apo A-I gene expression in rat (54, 55), while increasing it in HepG2 cells and primary hepatocyte culture (56, 57). Other reports showed that retinoids have no effect on the abundance of hepatic apo A-I mRNA (58). Similarly, investigators have shown that retinoids have (i) transient stimulatory or inhibitory influence of retinoids on intestinal apo A-I gene transcription; and (ii) a lack of correlation between intestinal apo A-I mRNA level and apo A-I secretion (56, 58, 59). Undoubtedly, additional effort is definitely necessary to define the impact of retinoids on apo A-I synthesis and secretion in the intestine. There is also merit in evaluating whether retinoids play a role in intestinal HDL formation and export, given the relationship of these processes with protection against coronary heart disease. Currently, no data are available in human intestinal tissue on whether retinoids may be brought into play for HDL production or assembly of other types of lipoproteins. This is particularly relevant considering the discordant effects of retinoic acid in clinical studies. In humans, the administration of synthetic retinoids, isotretinoin and etretinate, for the treatment of dermatologic disorders led to decreased concentrations of HDL, accompanied with significant increases in triglycerides, total and LDL-cholesterol (60-62). However, there appears to be little risk of causing hyperlipidemia or adverse effects on HDL by prolonged therapy with isotretinoin (63-66) when data were compared with placebo-treated patients. Overall these observations argue in favour of further investigations, which would lend strong credibility to the practical relevance of retinoids for apo A-I and HDL regulation. In view of our preliminary data, we hypothesize that RA isomers may enhance intestinal levels of apo A-I by augmenting gene and protein expression.

Retinoids exert their biologic and pharmacologic activity primarily by modulating the transcription of specific target genes. Retinoids are ligands for specific transcription factors that belong to the superfamily of nuclear receptors (67). Two distinct classes of retinoids receptors have been identified: the RARs and the RXRs, each composed of at least 3 different subtypes: (i) RAR- $\alpha$ , RAR- $\beta$  and RAR- $\gamma$  which bind all-trans-RA

with high-affinity; and (ii) RXR- $\alpha$ , RXR- $\beta$  and RXR- $\gamma$  which bind 9-cis-RA with high affinity and all-trans-RA with lower affinity (68-72). These activated receptors bind to cognate DNA sites, known as response elements, in the enhancer/promoter regions of retinoid-response genes, activating or repressing transcription (68). As reported previously (73-75), retinoic receptor DNA response element (RARE) is present in the regulatory region of the apo A-I gene, which suggests that plasma levels of HDL and apo A-I may be controlled by retinoids. The RARE in the human apo A-I promoter has been shown to bind both RXR-RXR homodimers and RAR-RXR heterodimers, and to be essential for apo A-I promoter activity in transactivation assays (69, 75). In our studies, RA enhanced RAR isoforms ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) following an incubation of 6 h or 24 h. However, it was effective in augmenting RXR $\alpha$  and RXR $\beta$  only after a 24-h incubation. LXR remained insensitive and PPAR $\beta$  responded by a substantial increase. Despite ligand activation and possibly heterodimerisation of RAR and RXR, RA did not display a major impact on apo A-I mRNA and protein. These results demonstrate the high complexity of apo A-I regulation.

Although much is known about the modulation of apo A-I by diet, hormones and development, there remains a dearth of information regarding the intestinal regulation of apo A-I synthesis and HDL production by natural and synthetic retinoid members of the vitamin A family. Our studies have revealed the potential of RA to induce cell differentiation without modulating apo A-I synthesis. A better understanding of the regulatory mechanisms in the future may offer us useful information in order to manipulate apo A-I expression and to benefit patients with coronary events.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by the Dairy Bureau of Canada.

**REFERENCES**

1. Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J* 10: 1002–1013, 1996.
2. Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* 10: 993–1001.
3. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:451–480, 2006.
4. Rexer BN, Zheng WL, Ong DE. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res* 61: 7065–7070, 2001.
5. Zannis, V. I., Cole, F. S., Jackson, C. L., Kurnit, D. M., Karathanasis, S. K. Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry* 24:4450-4455, 1985.
6. Elshourbagy, N. A., Boguski, M. S., Liao, W. S., Jefferson, L. S., Gordon, J. I., Taylor, J. M. Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8242-8246, 1985.
7. Fielding, C. J., Fielding, P. E. Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin:cholesterol acyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3911-3914, 1981.
8. Kashyap, M. L. Basic considerations in the reversal of atherosclerosis: significance of high-density lipoprotein in stimulating reverse cholesterol transport. *Am. J. Cardiol.* 63: 56H-59H, 1989.
9. M. Navab, G.M. Ananthramaiah, S.T. Reddy, B.J. Van Lenten, B.J. Ansell, G.C. Fonarow, K. Vahabzadeh, S. Hama, G. Hough and N. Kamranpour, Thematic review

series: the pathogenesis of atherosclerosis: the oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL, *J Lipid Res* 45: 993–1007, 2004.

10. K.B. Reilly, S. Srinivasan, M.E. Hatley, M.K. Patricia, J. Lannigan, D.T. Bolick, G. Vandenhoff, H. Pei, R. Natarajan, J.L. Nadler and C.C. Hedrick, 12/15 lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte:endothelial interactions and atherosclerosis in vivo, *J Biol Chem* 279: 9440–9450, 2004.
11. J-R Nofer, B Kehrel, M Fobker. HDL and atherosclerosis: beyond reverse cholesterol transport, *Atherosclerosis* 161: 1–6, 2002.
12. PJ Barter, S Nicholls and KA Rye. Antiinflammatory properties of HDL, *Circ Res* 95: 764–772, 2004.
13. Staels, B., J. Auwerx, L. Chan, A. van Tol, M. Rosseneu, and G. Verhoeven. Influence of development, estrogens, and food intake on apolipoprotein A-I, A-11, and E mRNA in rat liver and intestine. *J Lipid Res.* 30: 1137-1145, 1989.
14. Soyal SM, Seelos C, Lin-Lee YC, Sanders S, Gotto AM Jr, Hachey DL, Patsch W. Thyroid hormone influences the maturation of apolipoprotein A-I messenger RNA in rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 270: 3996–4004, 1995.
15. Murao K, Wada Y, Nakamura T, Taylor AH, Mooradian AD, Wong NC. Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 273: 18959–18965, 1998.
16. Ness GC, Lopez D, Chambers CM, Newsome WP, Cornelius P, Long CA, Harwood HJ Jr. Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. *Biochemical Pharmacology* 56: 121–129, 1998.
17. Hargrove GM, Junco A, Wong NC. Hormonal regulation of apolipoprotein AI. *Journal of Molecular Endocrinology* 22: 103–111, 1999



18. Zolfaghari R, Ross AC. Effect of vitamin A deficiency and retinoic acid repletion on intestinal and hepatic apolipoprotein A-I mRNA levels of adult rats. *J Lipid Res* 35:1985–1992, 1994.
19. Berthou L, Langouet S, Grude P, Deneffe P, Branellec D, Guillouzo A. Negative regulation of Apo A-I gene expression by retinoic acid in rat hepatocytes maintained in a coculture system. *Biochim Biophys Acta* 1391:329–336, 1998.
20. Berthou L, Staels B, Saldicco I, Berthelot K, Casey J, Fruchart JC, Deneffe P, Branellec D. Opposite in vitro and in vivo regulation of hepatic apolipoprotein A-I gene expression by retinoic acid. Absence of effects on apolipoprotein A-II gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14:1657–1664, 1994.
21. Kaptein, A., E. C. M. de Wit, and H. M. G. Princen. Retinoids stimulate apoA-I synthesis by induction of gene transcription in primary hepatocyte cultures from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Arterioscler. Thromb.* 13: 1505-1514, 1993.
22. Giller, T., U. Hennes, and H. J. Kempen. Regulation of human apolipoprotein A-I expression in Caco-2 and HepG2 cells by all-trans and 9-cis retinoic acids. *J Lipid Res.* 36: 1021-1028, 1995.
23. Wagner, R. D., E. S. Krul, J. B. Moberly, D. H. Alpers, G. Schonfeld. Apolipoprotein expression and cellular differentiation in Caco-2 intestinal cells. *Am. J Physiol.* 263: E374-E382, 1992.
24. Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J.* May; 9(8):626-35, 1995.
25. Rottman, J. N., R. L. L. Widom, B. Nadal-Ginard, V. Mahdavi, S. K. Karathanasis. A retinoic acid responsive element in the apolipoprotein A-I gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3814-3820, 1991.
26. Mehran, M, Levy E, Gurbindo C, Bendayan M, Seidman EG. Lipid apolipoprotein and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 33: 118-128, 1997.

27. Mehran, M, Seidman E, Marchand R, Gurbindo C, Levy E. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits lipids and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269: G953-G960, 1995.
28. Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
29. Spalinger, JH, Seidman EG, Lepage G, Ménard D, Gavino V, Levy E. Uptake and metabolism of a structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G652-G659, 1998
30. Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC, Seidman E. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem*. Oct 26;276(43):39679-84, 2001.
31. Sane AT, Sinnott D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF, Levy E. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res*. Oct;47(10):2112-20, 2006.
32. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J*. 5, 2924-2933, 1991.
33. Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. 10, 940-954, 1996.
34. Amos, B., Lotan, D., Lotan, R. Increased fucosylation of high-molecular-weight glycoproteins accompanies retinoic-acid-induced differentiation of F-9 embryonal carcinoma cells. *Int.J.Cancer* 46, 86-94, 1990.
35. Galvin-Parton, P. A., Watkins, D. C., Malbon, C. C. Retinoic acid modulation of transmembrane signaling. Analysis in F9 teratocarcinoma cells. *J.Biol.Chem*. 265, 17771-17779, 1990.
36. Morre, D. M. Intracellular actions of vitamin A. *Int.Rev.Cytol*. 135, 1-38, 1992.

37. Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S. The retinoids vols 1 and 2, Academic Press, Orlando, 1984
38. Schuger, L., Varani, J., Mitra, R., Jr., Gilbride, K. Retinoic acid stimulates mouse lung development by a mechanism involving epithelial-mesenchymal interaction and regulation of epidermal growth factor receptors. *Dev.Biol.* 159, 462-473, 1993.
39. Terenzi, F., Falasca, L., Marino, M., Mele, R., Velardi, G., Conti, D. L. Modulation of proliferative activity and amino acid transport in chick embryo hepatocytes by EGF and retinoic acid. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 43, 861-871, 1997.
39. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34<sup>PSK</sup>-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71: 323-334, 1992
40. Bartkova J. Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog. Cell Cycle* 3 : 211-220, 1997.
41. Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL.. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J pathol* 194: 35-42, 2001.
42. Ito Y, Takeda T, Wakasa K, Tsujimoto M, Matsuura N. Expression and possible role of cyclin D3 in human pancreatic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 21:1043-1048, 2001.
43. Ebert MP, Hernberg S, Fei G, Sokolowski A, Schulz HU, Lippert H, Malfertheiner P. Induction and expression of cyclin D3 in human pancreatic cancer. *J.Cancer Res Clin Oncol* 127: 449-454, 2001.
44. Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R.. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin. Cancer Res.* 6 :3614-3620, 2000.

45. Yasogawa Y, Takano Y, Okayasu I, Kakita A. The 5D4 antibody (anti-cyclin D1/D2) related antigen: cytoplasmic staining is correlated to the progression of gastric cancer *Pathol Int* 48 : 717-722, 1998.
46. Takano Y, Kato Y, Masuda M, Ohshima Y, Okayasu I.. Cyclin D2, but not cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis *J Pathol* 189 :194-200, 1999.
47. Mermelshtein A, Gerson A, Walfisch S, Delgado B, Shechter-Maor G, Delgado J, Fich A, Gheber L.. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. *British Journal of Cancer* 93 : 338-345, 2005.
48. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN, Brugge JS. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* 17: 4406-4418, 1997.
49. Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 153-158, 1996.
50. Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 25:257-260, 2000.
51. Ptasznik A, Beatie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez A, Hayek A. Phosphatidylinositol 3-kinase is a negative regulator of cellular differentiation. *J Cell Biol* 137:1127-1136, 1997.
52. Busca R, Bertolotto C, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70<sup>S6</sup>-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem* 271:31824-31830, 1996.
53. Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N.. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *JBC* 276:21885-21894, 2000.

54. Zolfaghari, R. and Ross, A. C. Effect of vitamin A deficiency and retinoic acid repletion on intestinal and hepatic apolipoprotein A-I mRNA levels of adult rats *J.Lipid Res* 35, 1985-1992, 1994.
55. Berthou, L., Staels, B., Saldicco, I., Berthelot, K., Casey, J., Fruchart, J. C., Deneffe, P., Branellec, D. Opposite in vitro and in vivo regulation of hepatic apolipoprotein A-I gene expression by retinoic acid. Absence of effects on apolipoprotein A-II gene expression. *Arterioscler.Thromb.* 14, 1657-1664, 1994.
56. Giller, T., Hennes, U., Kempen, H. J. Regulation of human apolipoprotein A-I expression in Caco-2 and HepG2 cells by all-trans and 9-cis retinoic acids. *J.Lipid Res* 36: 1021-1028, 1995.
57. Kaptein, A., de Wit, E. C., Princen, H. M. Retinoids stimulate ApoA-I synthesis by induction of gene transcription in primary hepatocyte cultures from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Arterioscler.Thromb.* 13: 1505-1514, 1993.
58. Nagasaki, A., Kikuchi, T., Kurata, K., Masushige, S., Hasegawa, T., Kato, S. Vitamin A regulates the expression of apolipoprotein AI and CIII genes in the rat. *Biochem.Biophys. Res Commun.* 205: 1510-1517, 1994.
59. Wagner, R. D., Krul, E. S., Moberly, J. B., Alpers, D. H., Schonfeld, G. Apolipoprotein expression and cellular differentiation in Caco-2 intestinal cells. *Am.J Physiol* 263: E374-E382, 1992.
60. Zech, L. A., Gross, E. G., Peck, G. L., Brewer, H. B. Changes in plasma cholesterol and triglyceride levels after treatment with oral isotretinoin. A prospective study. *Arch.Dermatol.* 119: 987-993, 1983.
61. O'Leary, T. J., Simo, I. E., Kanigsberg, N., Walker, J., Goodall, J. C., Ooi, T. C. Changes in serum lipoproteins and high-density lipoprotein composition during isotretinoin therapy. *Clin.Invest Med* 10: 355-360, 1987.
62. Melnik, B. C., Bros, U., Plewig, G. Evaluation of the atherogenic risk of isotretinoin-induced and etretinate-induced alterations of lipoprotein cholesterol metabolism. *J Invest Dermatol.* 88: 39S-43S, 1987.

63. Redlich, C. A., Chung, J. S., Cullen, M. R., Blaner, W. S., Van Bennekum, A. M., and Berglund, L. Effect of long-term beta-carotene and vitamin A on serum cholesterol and triglyceride levels among participants in the Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET). *Atherosclerosis* 145: 425-432, 1999.
64. Singhal, S., Gupta, R., and Goyle, A. Comparison of antioxidant efficacy of vitamin E, vitamin C, vitamin A and fruits in coronary heart disease: a controlled trial. *J Assoc.Physicians India* 49: 327-331, 2001.
65. Alvarez, R. D., Conner, M. G., Weiss, H., Klug, P. M., Niwas, S., Manne, U., Bacus, J., Kagan, V., Sexton, K. C., Grubbs, C. J., Eltoum, I. E., and Grizzle, W. E. The efficacy of 9-cis-retinoic acid (alitretinoin) as a chemopreventive agent for cervical dysplasia: results of a randomized double-blind clinical trial. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 12: 114-119, 2003.
66. Baxter, K. F., Ling, T. C., Barth, J. H., and Cunliffe, W. J. Retrospective survey of serum lipids in patients receiving more than three courses of isotretinoin. *J Dermatolog.Treat.* 14: 216-218, 2003.
67. Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., and Evans, R. M. (1999) The retinoid receptors. In Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Godman, D. S., editors. *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, Raven Press, New York
68. Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci* 1: 427-433, 1992.
69. Zhang, X. K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M. I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P., and Pfahl, M. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 358: 587-591, 1992.
70. Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kakizuka, A., and Evans, R. M. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6: 329-344, 1992.
71. Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A., and al. 9-cis

retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355: 359-361, 1992.

72. Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., and Thaller, C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68: 397-406, 1992.
73. Crowe DL, Chandraratna RA. A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Research*. 6: R546-R555, 2004.
74. Widom, R. L., Rhee, M., and Karathanasis, S. K. Repression by ARP-1 sensitizes apolipoprotein AI gene responsiveness to RXR alpha and retinoic acid. *Mol.Cell Biol.* 12: 3380-3389, 1992.
75. Rottman, J. N., Widom, R. L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V., Karathanasis, S. K. A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol.Cell Biol.* 11, 3814-3820, 1991.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1** Effects of retinoic acid (RA) on the proliferation using Caco-2 cell line. The incorporation of [3H]-thymidine was studied in Caco-2 cells at various conditions: A. 60% confluence; B. 0 day confluence; C. 10 days post- confluence; D. 21 days post-confluence. Experiments were performed in duplicate.

Values are expressed as means  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.05 vs controls; \*\*p < 0.01 vs controls

**Figure 2** Effects of retinoic acid (RA) on the cyclin D3/D1 ratio in Caco-2 cells. The proteins of cell homogenates were fractionated by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitro-cellulose membranes. The blots were then incubated with the polyclonal antibody overnight at 4 °C. Immunocomplexes were revealed by means horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin and an enhanced chemiluminescence's kit. D1 and D3 mass were quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software. Thereafter, ratios were calculated in 4 experimental conditions: A. 60% confluence; B. 0 day confluence; C. 10 days post-confluence; D. 21 days post-confluence.

Values are expressed as means  $\pm$  SE.

\*p < 0.05 vs controls; \*\*p < 0.01 vs controls

**Figure 3** Effects of retinoic acid (RA) on the protein level of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in Caco-2 cells. Homogenates were immunoprecipitated and blotted with anti-PI3K antibody as described in Materials and Methods.



Studies were performed at various conditions: A. 60% confluence; B. 0 day confluence; C. 10 days post-confluence; D. 21 days post-confluence.

Values are expressed as means  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.05 vs controls; \*\*p < 0.01 vs controls

**Figure 4** Effects of retinoic acid (RA) on the protein expression of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in Caco-2 cells. Samples of each fraction were subjected to immunoprecipitation, SDS-PAGE and Western blotting at various conditions: A. 60% confluence; B. 0 day confluence; C. 10 days post-confluence; D. 21 days post-confluence.

Values represent the mean  $\pm$  SE for 4 separate experiments.

\*p < 0.05 vs controls; \*\*p < 0.01 vs controls.

**Figure 5** Effects of retinoic acid (RA) on the protein expression of phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (phospho-p38 MAPK). Caco-2 cells were treated with NaCl (80 mM for 30 min.) in order to activate p38 MAPK. Phospho-p38 MAPK profile was examined by SDS-PAGE and Western blotting using anti-phospho- p38 MAPK antibody at various conditions: A. 60% confluence; B. 0 day confluence; C. 10 days post-confluence; D. 21 days post-confluence.

Values are expressed as means  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.05 vs respective controls; \*\*p < 0.01 vs respective controls.

**Figure 6** Effects of retinoic acid (RA) on the protein expression of CDX2, a caudal-related homeobox gene encoding an intestine-specific transcription factor in Caco-2 cells. CDX2 profile was examined by SDS-PAGE and Western

blotting at various conditions: A. 60% confluence; B. 0 day confluence; C. 10 days post-confluence; D. 21 days post-confluence.

Values represent the mean  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.05 vs respective controls; \*\*p < 0.01 vs respective controls.

**Figure 7** Effects of retinoic acid (RA) and 22-hydroxycholesterol (22-OH) on the synthesis of apolipoproteins A-I and A-IV in Caco-2 cells. These epithelial cells were incubated with [<sup>35</sup>S]-methionine in the presence of unlabeled oleic acid for 4 hours or 24 hours to stimulate the biogenesis of apolipoproteins. At the end of the labeling period, cells were washed, homogenized, and centrifuged. Supernatants from the cell homogenates were then reacted with excess antibodies for 18 h at 4 °C to precipitate specific apolipoproteins. Immune complexes were washed and analyzed by linear 4-20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, gels were sliced and counted for radioactivity. Data represent the means  $\pm$  SEM of four experiments in each group: A. A-I (4-hr incubation); B. A-I (24-hr incubation); C. A-IV (4-hr incubation); D. A-IV (24-hr incubation).

\*p < 0.05 vs controls; \*\*p < 0.01 vs controls.

**Figure 8** Effects of retinoic acid (RA) and 22-hydroxycholesterol (22-OH) on the synthesis of apolipoproteins B-48, B-100 and E in Caco-2 cells. These epithelial cells were incubated with [<sup>35</sup>S]-methionine in the presence of unlabeled oleic acid for 4 hours or 24 hours to stimulate the biogenesis of apolipoproteins. At the end of the labeling period, cells were washed, homogenized, and centrifuged. Supernatants from the cell homogenates were then reacted with excess antibodies for 18 h at 4 °C to precipitate specific apolipoproteins. Immune complexes were washed and analyzed by

linear 4-20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, gels were sliced and counted for radioactivity. Data represent the means  $\pm$  SEM of four experiments in each group: A. apo B-48 (4-hr incubation); B. apo B-48 (24-hr incubation); C. apo B-100 (4-hr incubation); D. apo B-100 (24-hr incubation); E. apo E (4-hr incubation); F. apo E (24-hr incubation).

Values represent the mean  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.05 vs controls; \*\*p < 0.01 vs controls.

**Figure 9** Effects of retinoic acid (RA) on levels of lipoproteins isolated from the basolateral media of Caco-2 cells. After the incubation of Caco-2 cells with [<sup>14</sup>C]-oleic acid, lipoproteins were separated by ultracentrifugation. *CM*, chylomicrons; *VLDL*, very low density lipoproteins; *LDL*, low density lipoproteins; *HDL*, high density lipoproteins.

Values represent the mean  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

**Figure 10** Effects of retinoic acid (RA) and 22-hydroxycholesterol (22-OH) on PPAR gene expression in Caco-2 cells. PCR analysis was performed to analyze mRNA of A. PPAR $\alpha$  (4-hr incubation); B. PPAR $\alpha$  (24-hr incubation); C. PPAR $\beta$  (4-hr incubation); D. PPAR $\beta$  (24-hr incubation) E. PPAR $\gamma$  (4-hr incubation); F. PPAR $\gamma$  (24-hr incubation).

Values are means  $\pm$  SEM for 4 separate experiments.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.01 vs control.

**Figure 11** Effects of retinoic acid (RA) and 22-hydroxycholesterol (22-OH) on LXR gene expression in Caco-2 cells PCR analysis was performed to analyze mRNA of A. LXR $\alpha$  (4-hr incubation); B. LXR $\alpha$  (24-hr incubation); C.

LXR $\beta$  (4-hr incubation); D. LXR $\beta$  (24-hr incubation)

Values

are means  $\pm$  SEM for 4 separate experiments.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.01 vs control.

**Figure 12** Effects of retinoic acid (RA) and 22-hydroxycholesterol (22-OH) on RXR gene expression in Caco-2 cells. PCR analysis was performed to analyze mRNA of A. RXR $\alpha$  (4-hr incubation); B. RXR $\alpha$  (24-hr incubation); C. RXR $\beta$  (4-hr incubation); D. RXR $\beta$  (24-hr incubation) E. RXR $\gamma$  (4-hr incubation); F. RXR $\gamma$  (24-hr incubation).

Values are means  $\pm$  SEM for 4 separate experiments.

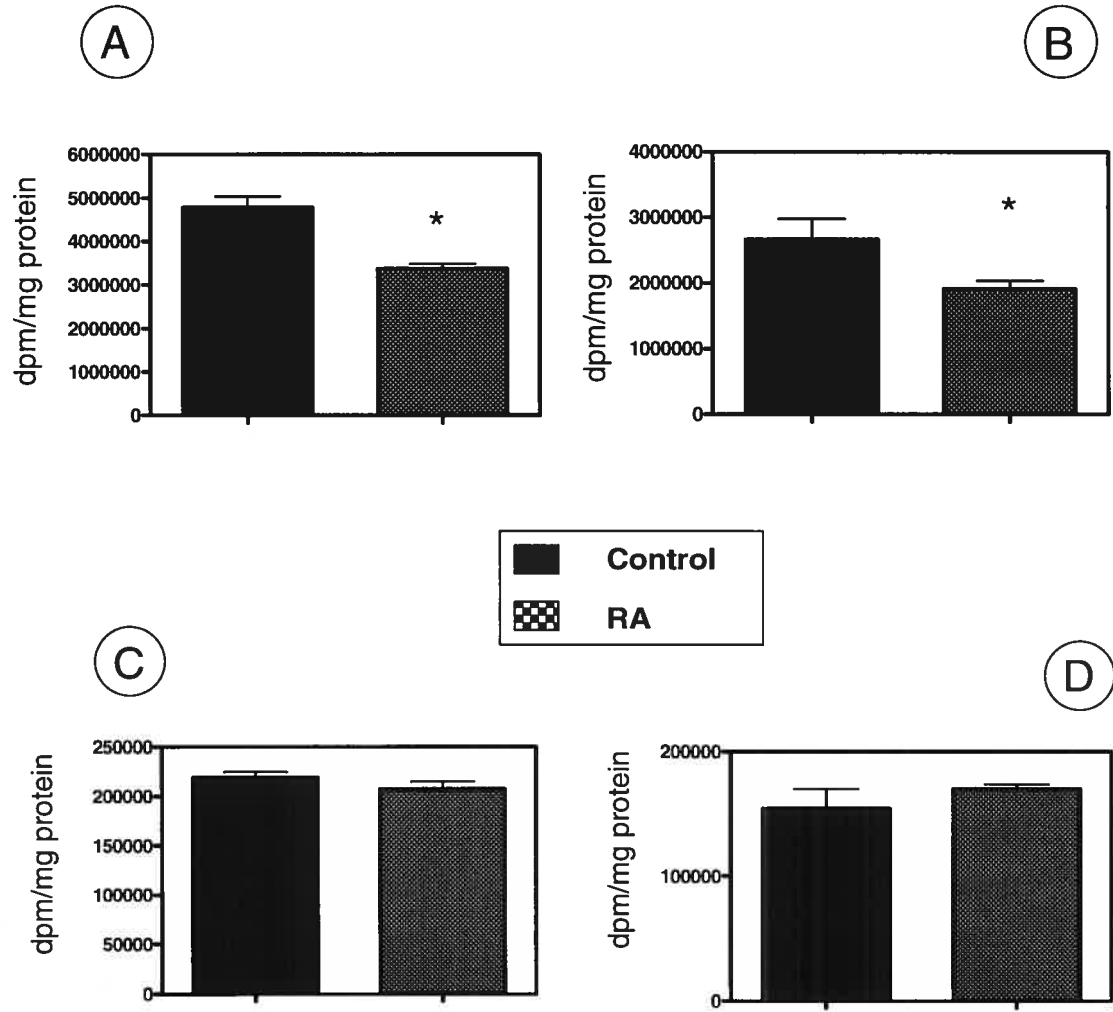
\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.01 vs control.

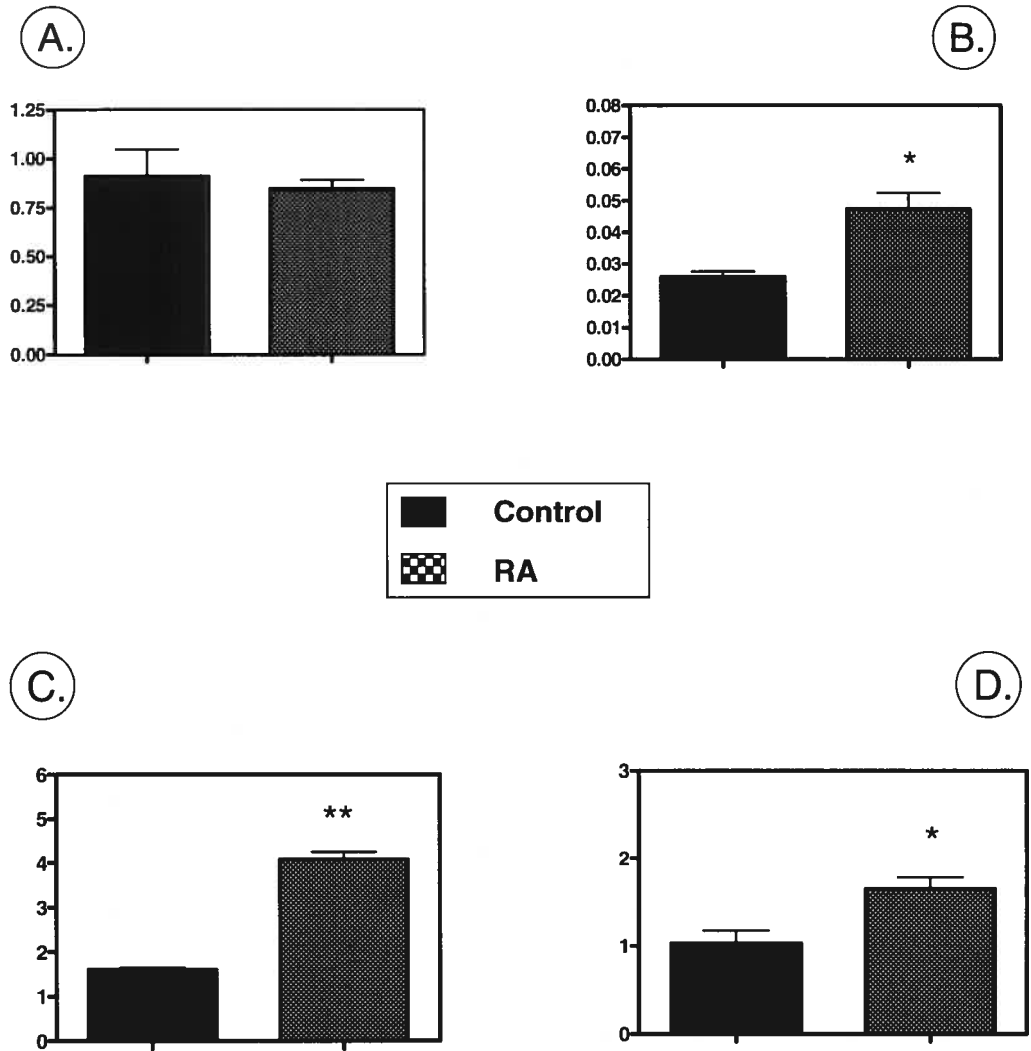
**Figure 13** Effects of retinoic acid (RA) and 22-hydroxycholesterol (22-OH) on RAR gene expression in Caco-2 cells. PCR analysis was performed to analyze mRNA of A. RAR $\alpha$  (4-hr incubation); B. RAR $\alpha$  (24-hr incubation); C. RAR $\beta$  (4-hr incubation); D. RAR $\beta$  (24-hr incubation) E. RAR $\gamma$  (4-hr incubation); F. RAR $\gamma$  (24-hr incubation).

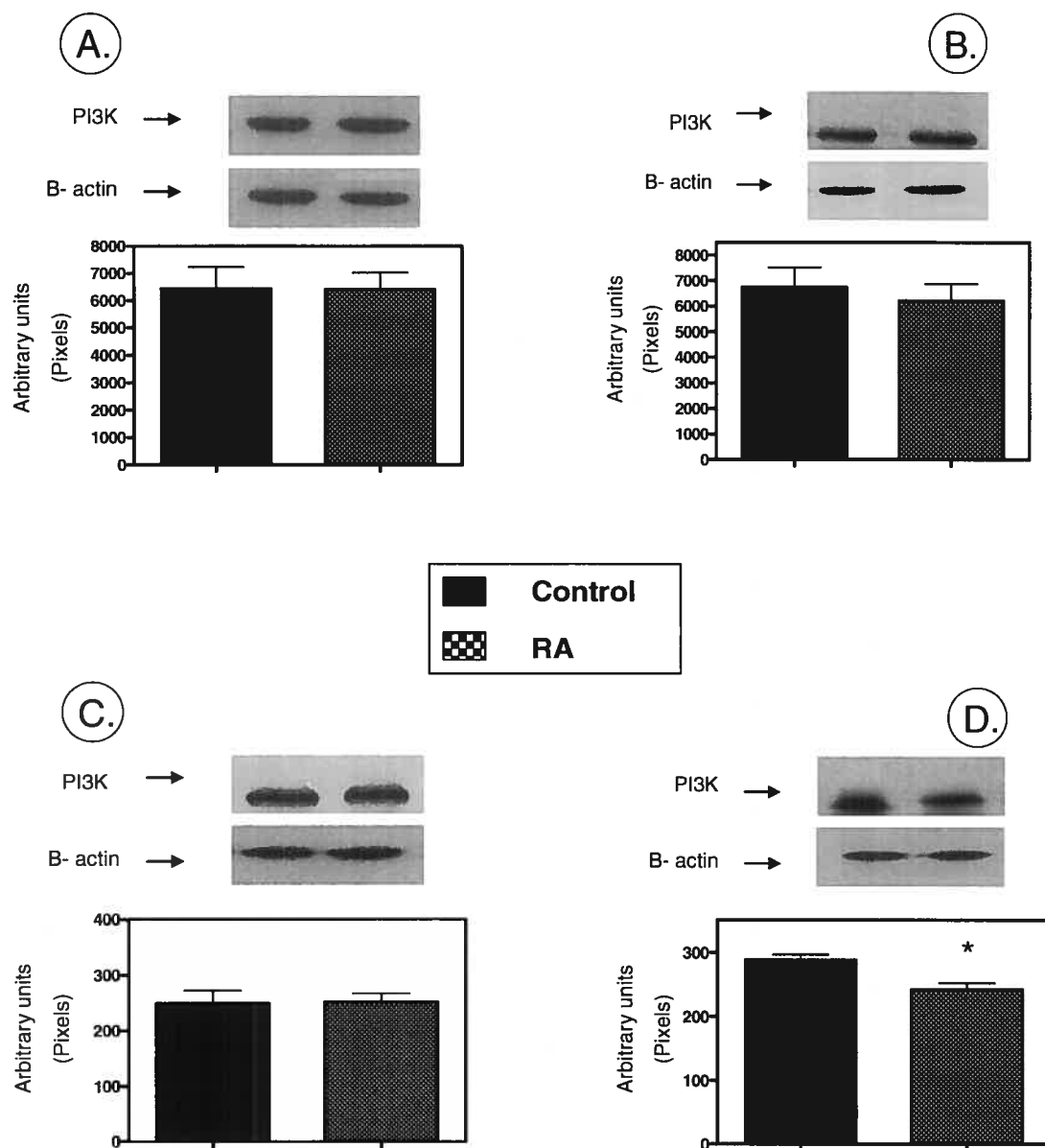
Values are means  $\pm$  SEM for 4 separate experiments.

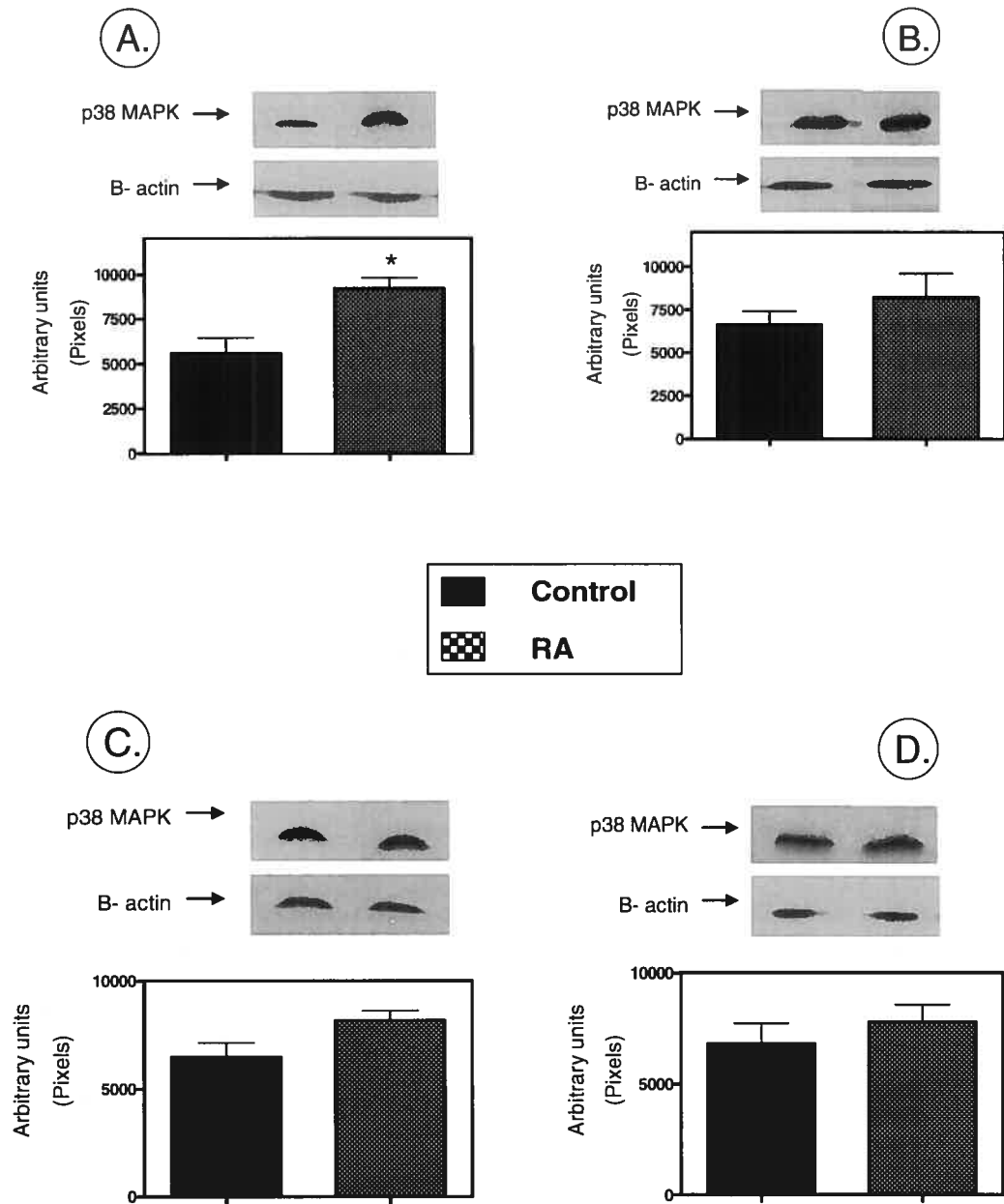
\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.01 vs control.

**Figure 1**

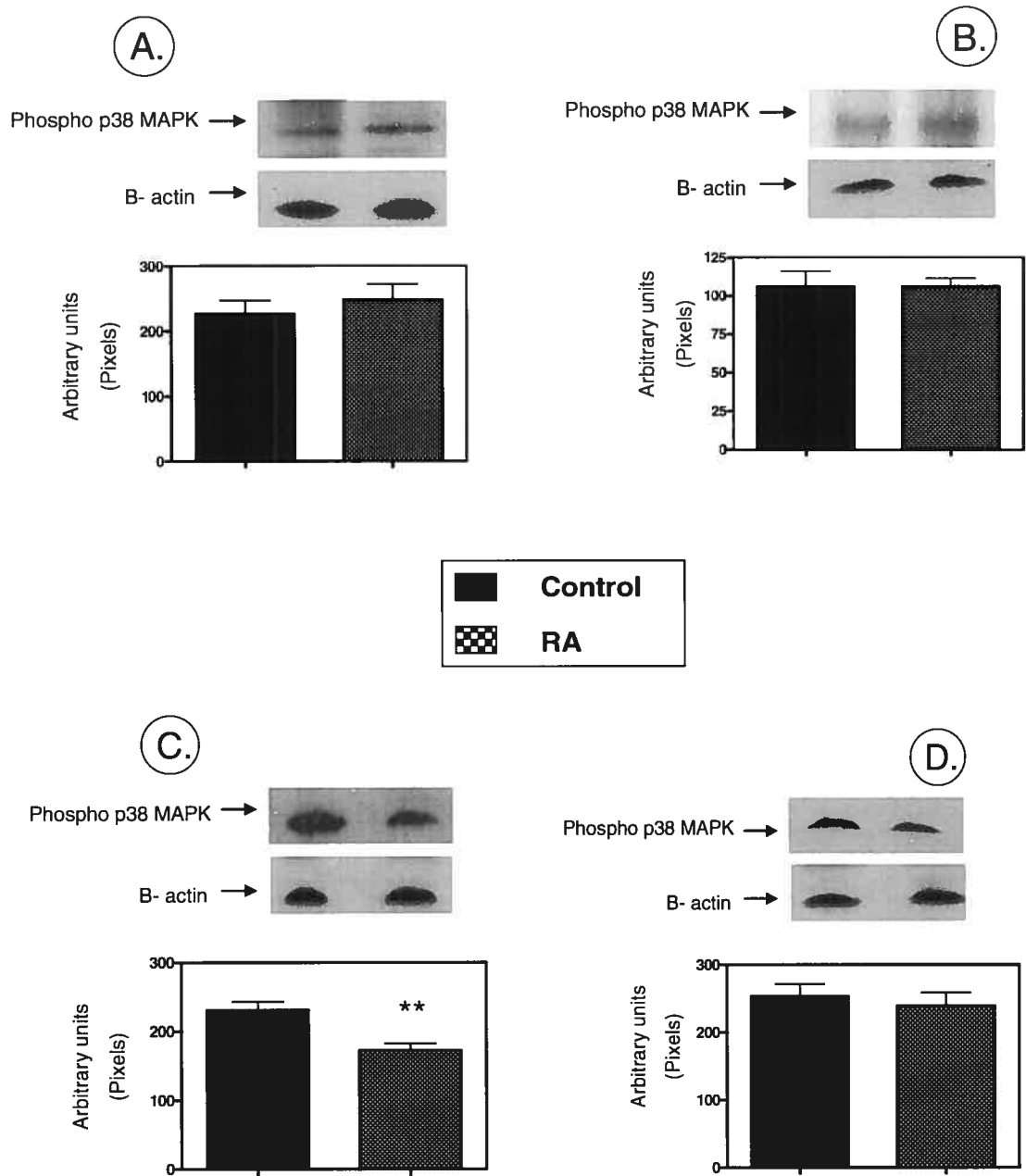


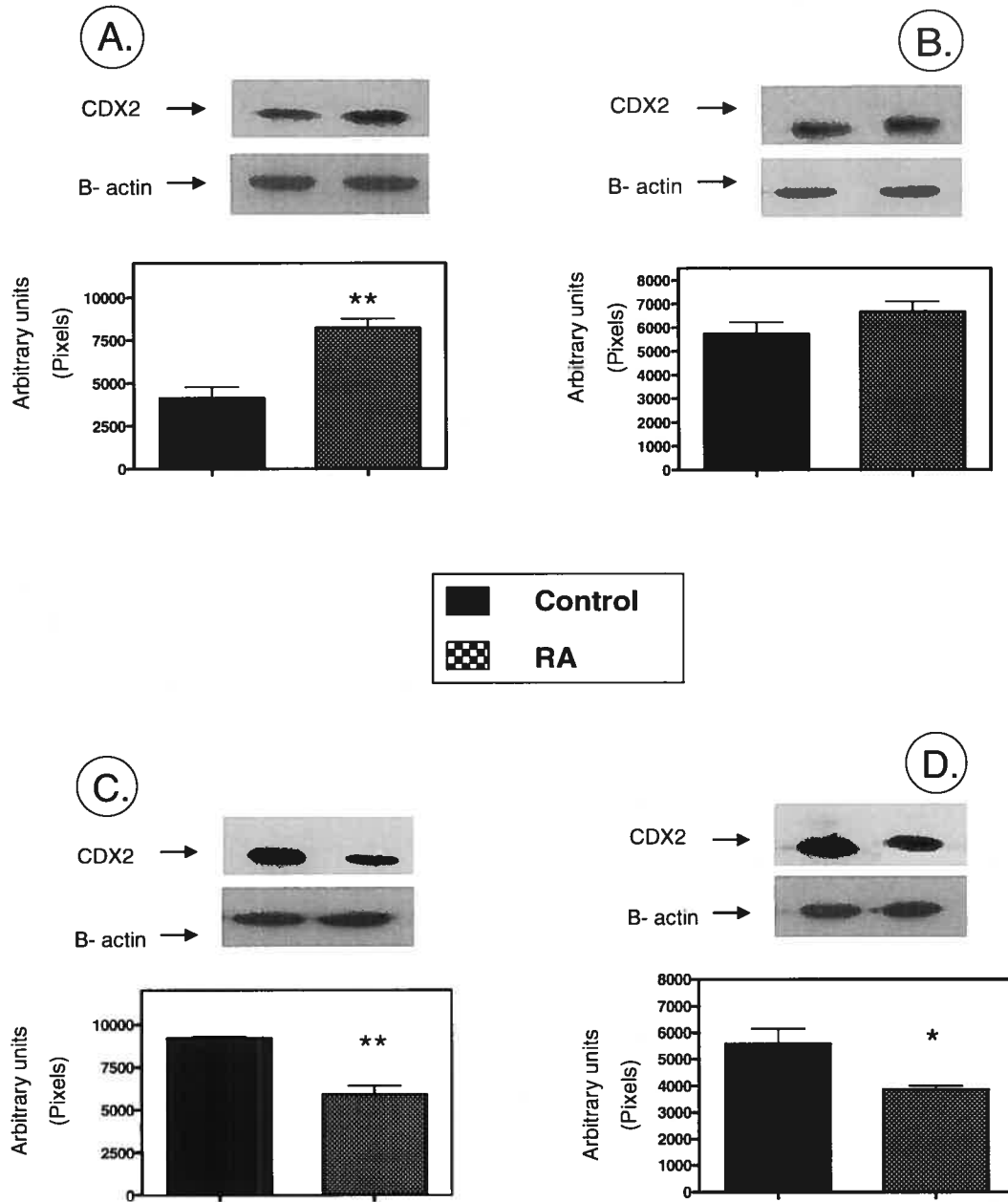
**Figure 2**

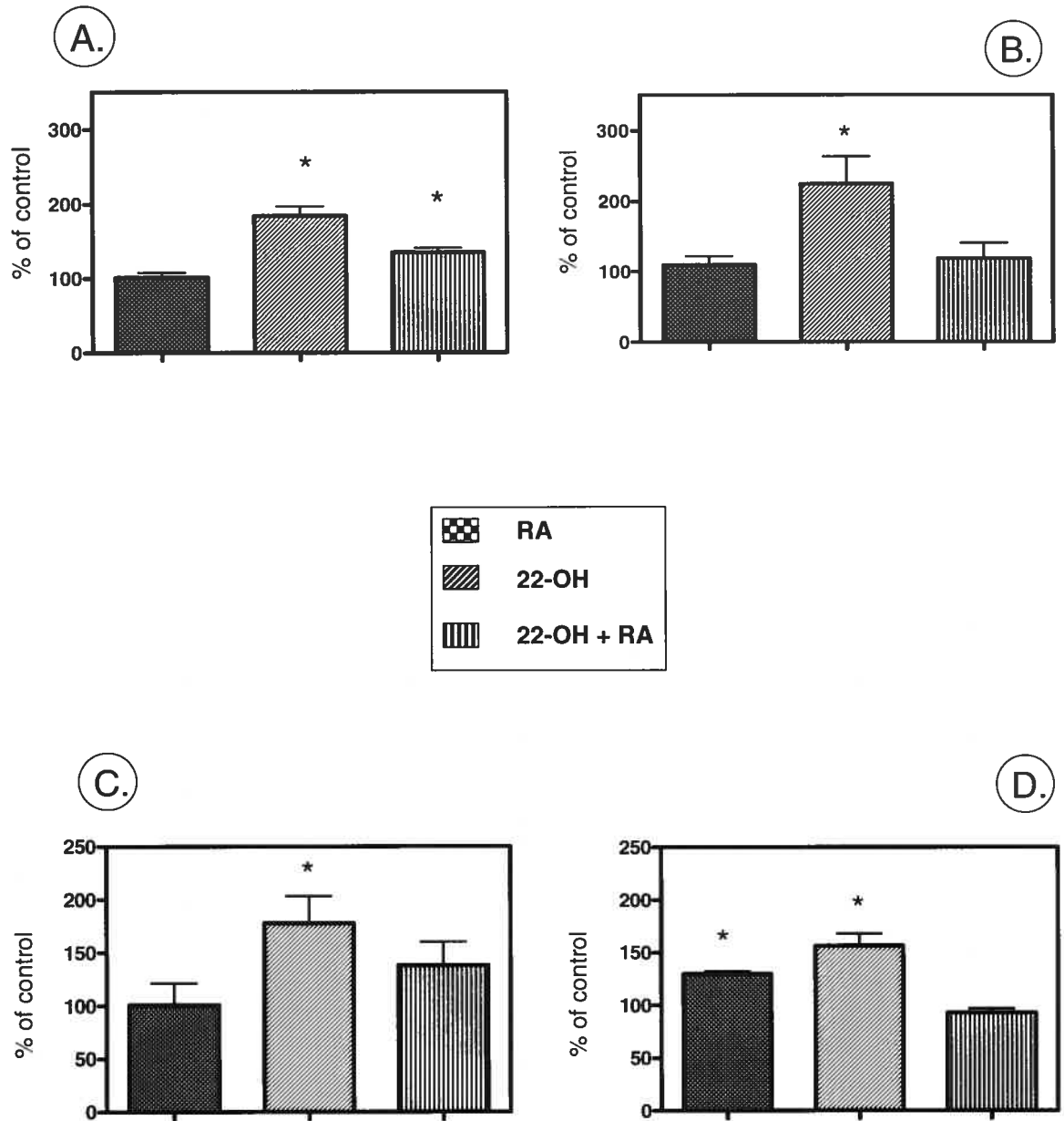
**Figure 3**

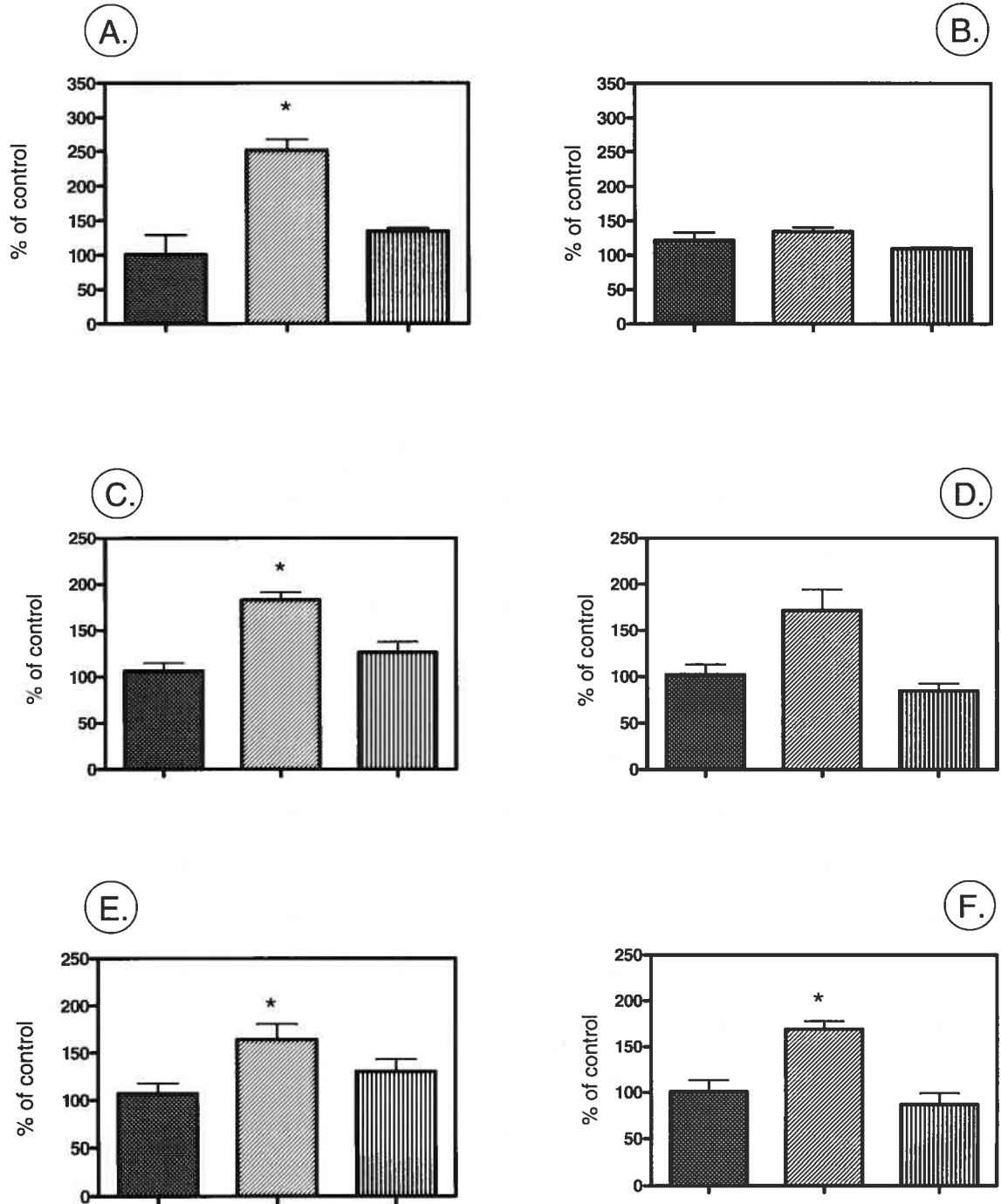
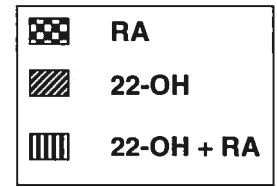
**Figure 4**

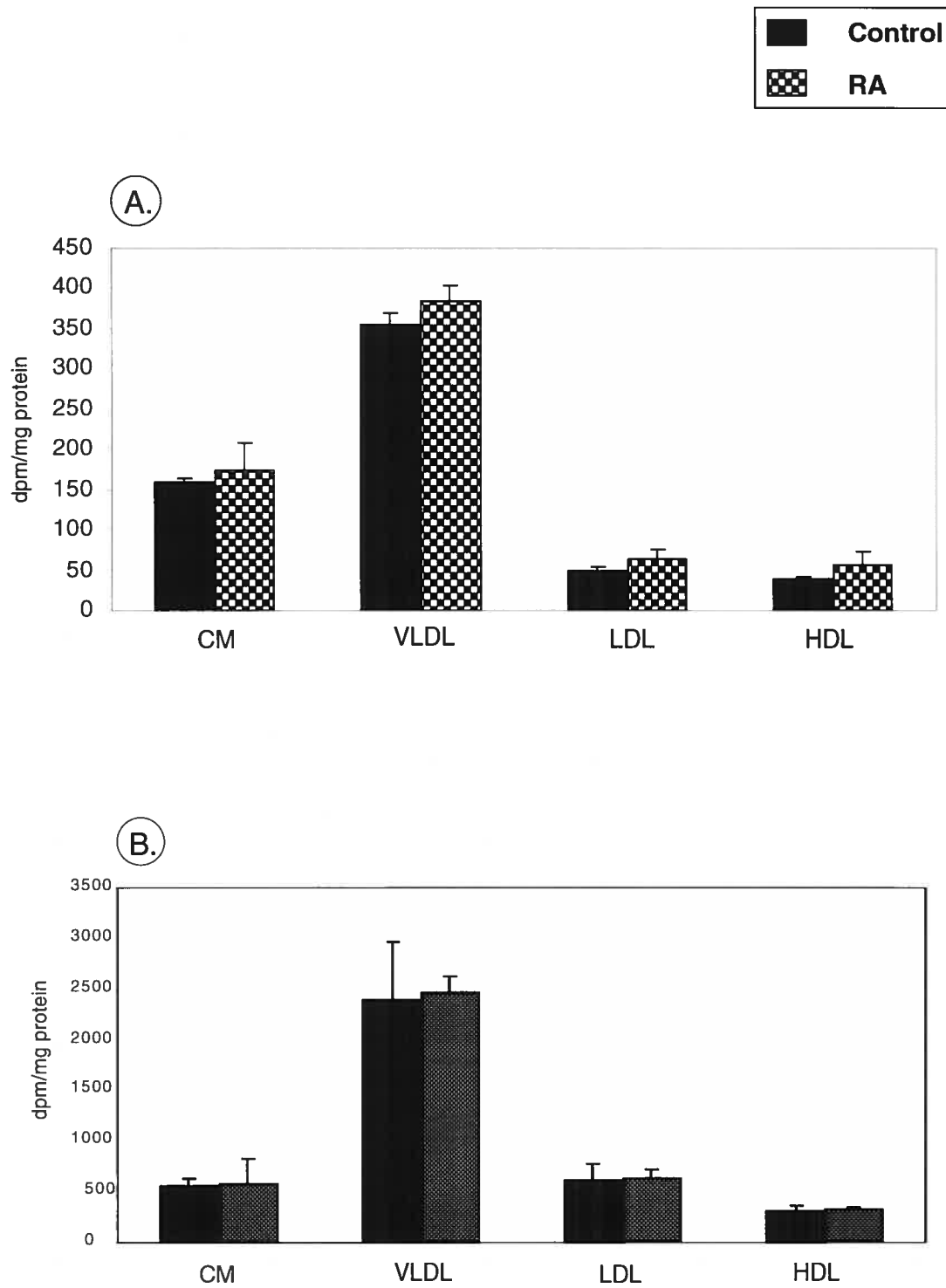


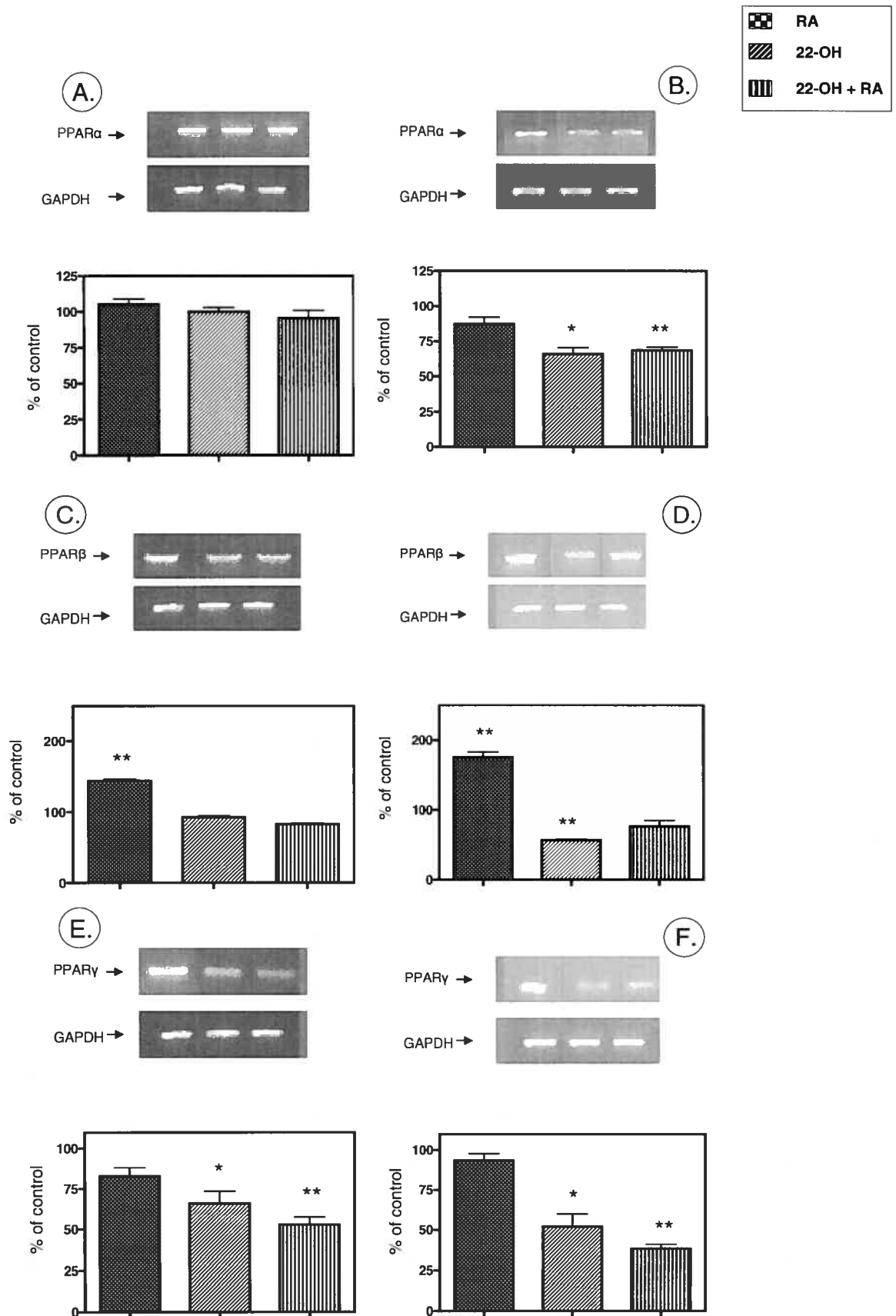
**Figure 5**

**Figure 6**

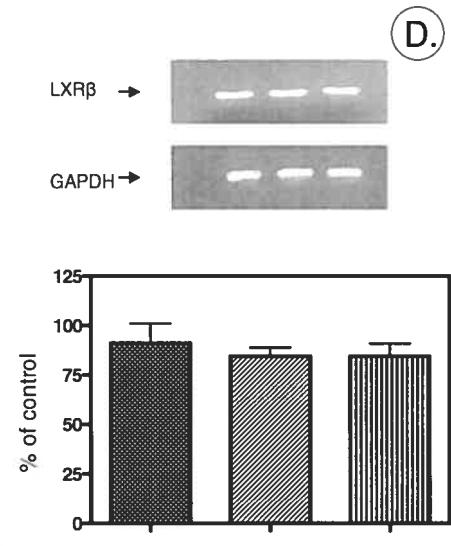
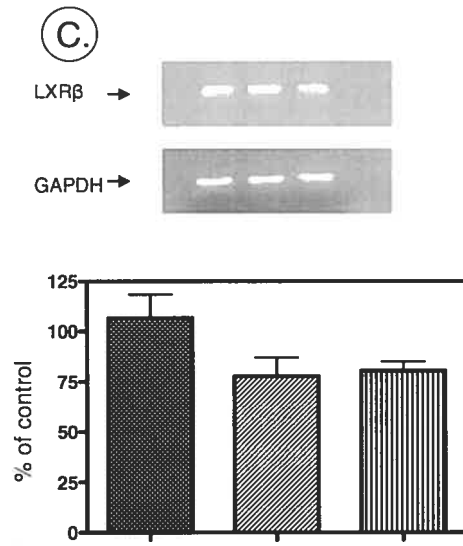
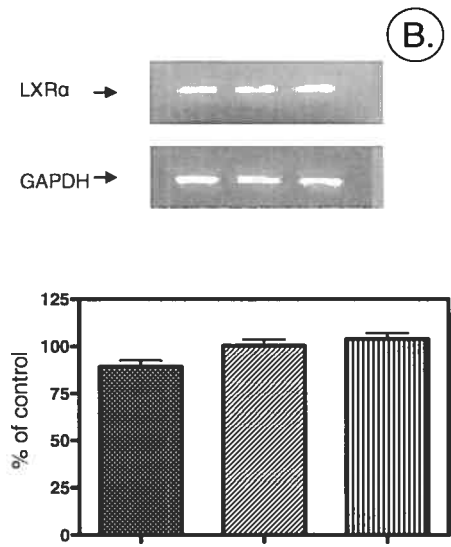
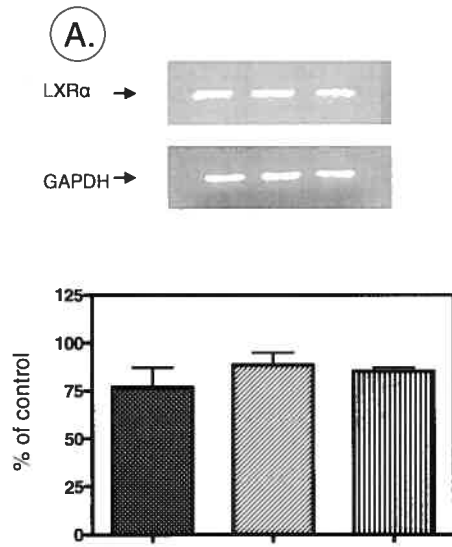
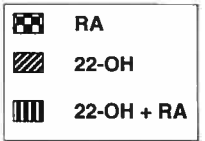
**Figure 7**

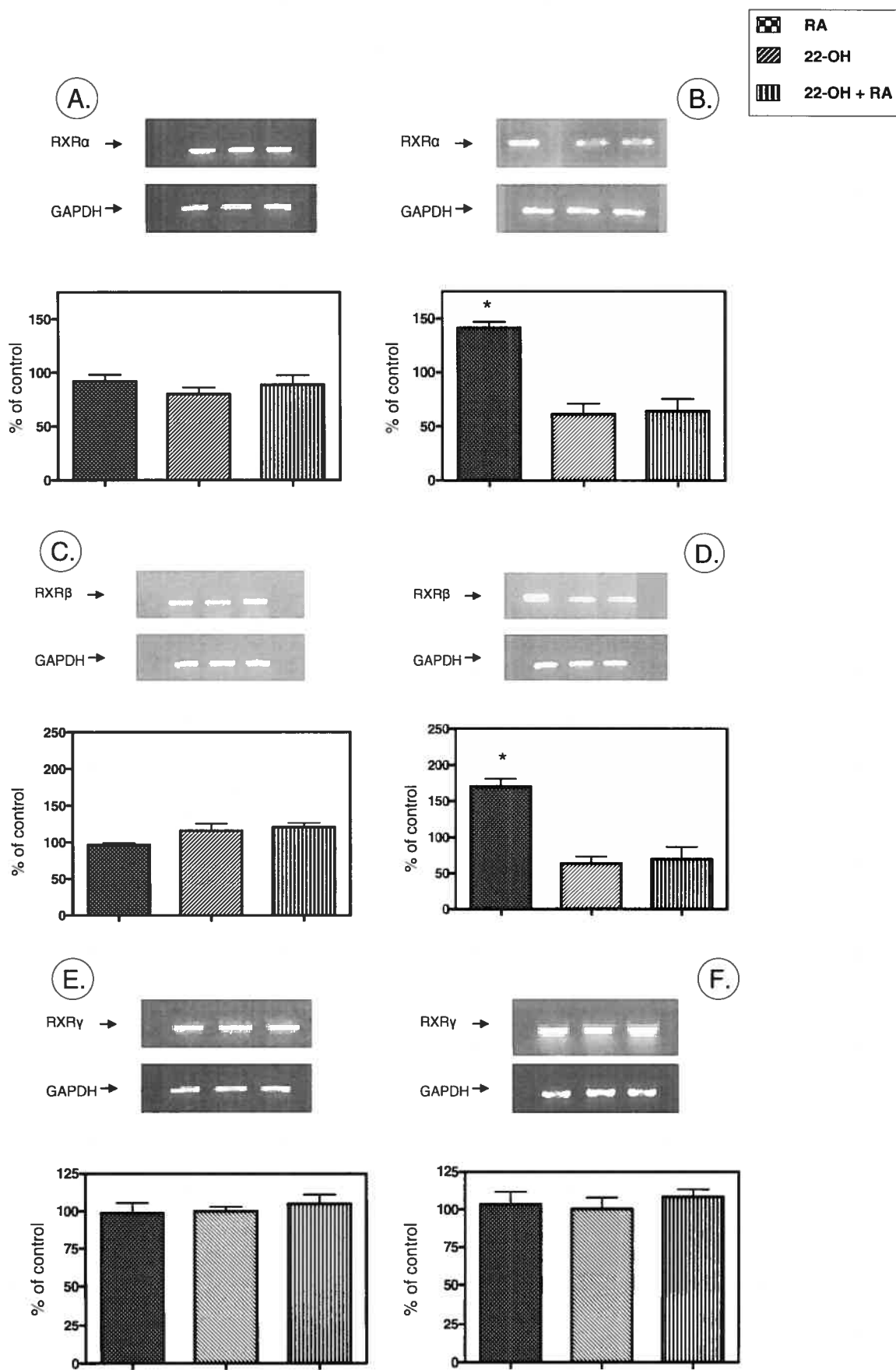
**Figure 8**

**Figure 9**

**Figure 10**

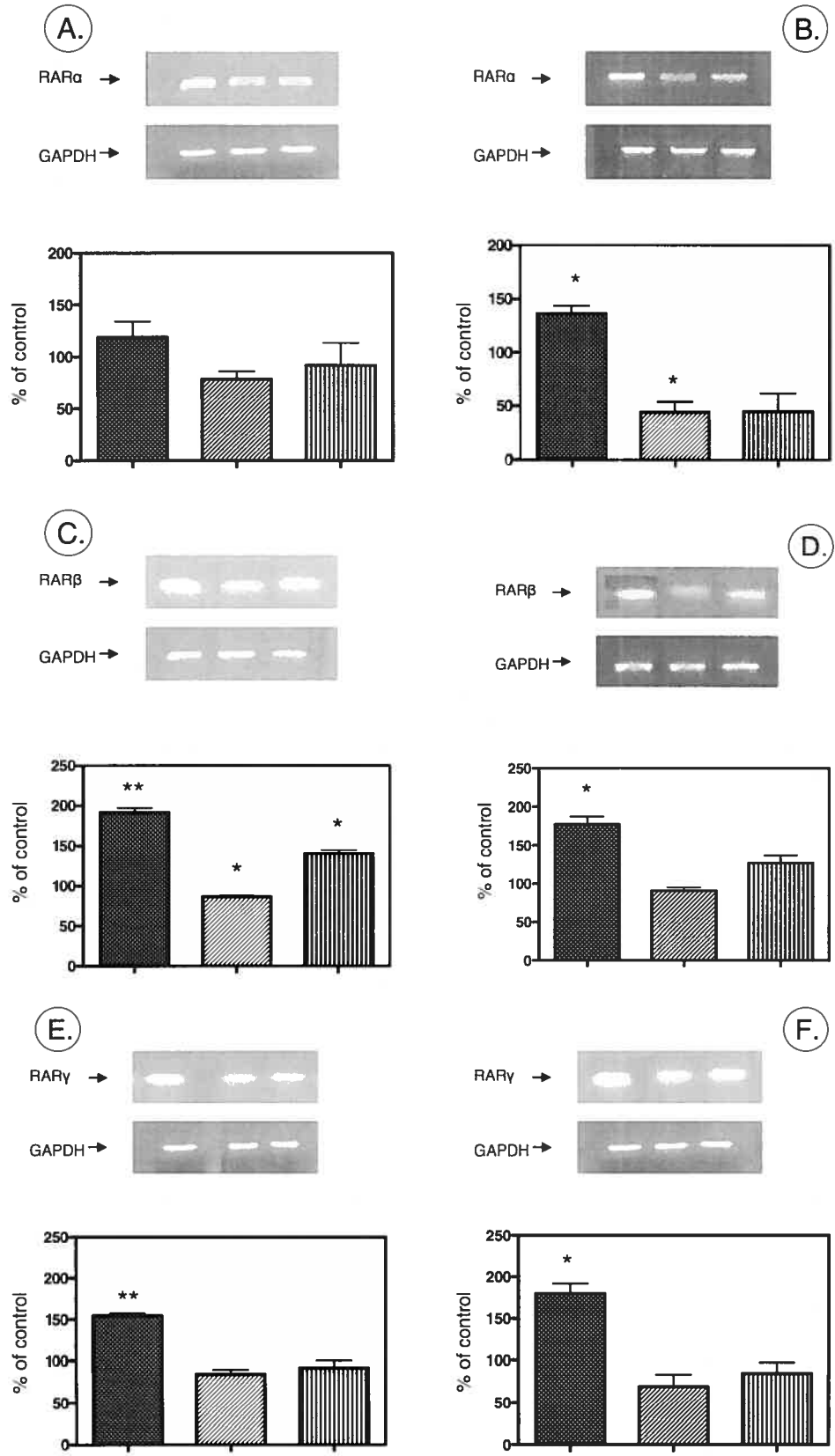
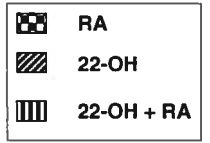
**Figure 11**



**Figure 12**



**Figure 13**



## DISCUSSION

L'AR est connu pour ses effets pléiotropiques lui donnant l'habileté de moduler l'expression de nombreux gènes. Nous avons effectué des études afin d'examiner son impact sur les cellules épithéliales intestinales dans le but de déterminer ses rôles régulateurs au niveau de la prolifération et de la différenciation cellulaire, sur le transport des lipides et du statut de certains facteurs de transcription.

Nos observations indiquent que l'AR agit comme un facteur de différenciation à 60% de confluence et à 0 jour post-confluence. Selon nos données, l'AR (1) diminue l'incorporation de thymidine; (2) module les cyclines D (des protéines régulatrices du cycle cellulaire) en réduisant l'expression de la cycline D1 (ce qui arrête la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire) et en augmentant l'expression de la cycline D3 (induisant ainsi la différenciation cellulaire); et (3) a tendance à augmenter la p38 MAPK, laquelle stimule le CDX2, une protéine centrale de la différenciation cellulaire. Malgré sa capacité à diminuer la prolifération cellulaire, l'AR est incapable de favoriser l'expression du gène de l'apo A-I au niveau intestinal, la synthèse protéique de l'apo A-I et la production des HDL. De plus, l'AR n'a pas d'effets sur l'estérification des TG, CE et PL, la production des CM, des VLDL et des LDL, et la biogenèse des apo A-IV, B-48, B-100 et E. Aussi, l'AR augmente l'expression des PPAR $\beta$ , RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  sans altérer l'expression de PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , et RXR $\gamma$ . Finalement, lorsqu'il est combiné avec le 22-OH, l'AR peut induire une augmentation de l'expression de l'apo A-I sans un impact majeur sur sa protéine.

En tenant compte de nos travaux sur les cellules Caco-2, l'AR diminue la prolifération cellulaire et augmente la différenciation cellulaire en pré-confluence et à confluence. De nombreuses études in vivo et in vitro dans une variété de modèles expérimentaux ont également observé un rôle clé de l'AR dans le développement embryogénique, la prévention et le traitement de tumeurs, traduisant ainsi son implication dans la modulation de la prolifération et de la

différenciation cellulaire<sup>37, 235</sup>. Nos résultats sont en accord avec plusieurs rapports suggérant que l'AR est plus actif dans l'inhibition de la prolifération et l'induction de la différenciation dans des modèles cellulaires indifférenciés tels que « murine F9 teratocarcinoma cells, promioloctytic HL-60 cells, L-6 melanoma cells, neuroblastoma and embryonal stem cells P19 »<sup>236-238</sup>. Cependant, dans d'autres modèles, comme les kératinocytes<sup>270</sup>, les cellules embryonnaires pulmonaires<sup>239</sup>, et les hépatocytes de poulet<sup>240</sup>, l'AR favorise la prolifération. La différenciation cellulaire est arrêtée par l'AR dans les chondrocytes, les ostéocytes et les adipocytes<sup>238</sup>. L'ensemble de ces observations sur les effets opposés de l'AR peuvent s'expliquer par l'existence de plusieurs types de récepteurs nucléaires de l'AR régulés de façon tissu-spécifiques.

Dans les cellules eucaryotes en prolifération, la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire est contrôlée par l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Ceux-ci incluent les cyclines de type D, lesquelles regroupent les cyclines D1, D2 et D3. La fonction régulatrice des cyclines D est influencée par leurs interactions avec les Cdk (cyclin-dependent kinases) 2, 4 et 6<sup>240</sup>. Une expression anormale ou inopportune de ces cyclines a le potentiel de dérégler le cycle cellulaire, et c'est pourquoi elles sont considérées comme des gènes impliqués dans la promotion de la prolifération ou en tant qu'oncogènes<sup>241</sup>. Ainsi, la surexpression des cyclines de type D a été fréquemment rapportée dans une large variété de tumeurs<sup>242-245</sup>. Toutefois, ce ne sont pas toutes les cyclines D qui sont surexprimées dans la même tumeur et elles sont associées différemment à un mauvais pronostic<sup>246, 247</sup>.

Dans notre étude, l'incubation des Caco-2 avec l'AR a diminué la cycline D1 et a augmenté la cycline D3, résultant en un ratio significativement plus élevé à 60% confluence et 0 jour post-confluence. Ces données sont en accord avec les observations suggérant que la surexpression de la cycline D1, mais non la cycline D3, est liée à la carcinogenèse<sup>248</sup>. Actuellement, les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la cycline D3 et la diminution de la cycline D1 ne sont pas clairement définis.

La PI3K fait partie d'une famille d'enzymes impliqués dans la signalisation intracellulaire et formant des hétérodimères. Elle est composée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85  $\alpha$  or  $\beta$ ) contenant les domaines SH2 et SH3 et une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110  $\alpha$  or  $\beta$ )<sup>249, 250</sup> qui phosphoryle l'hydroxyl D3 sur l'inositol de la phosphatidylinositol. La PI3K est impliquée dans la régulation de processus cellulaires normaux comme la croissance cellulaire, trafic vésiculaire, la régulation du glucose via l'insuline et l'apoptose.

Récemment, la PI3K a été définie comme un régulateur important de la différenciation de certains types cellulaires, incluant la différenciation myogénique, intestinale et adipocytaire<sup>251</sup>. Cependant, la PI3K peut aussi avoir un effet négatif sur la différenciation cellulaire<sup>252, 253</sup>. Dans notre étude, la PI3K n'a pas été influencée par l'AR à 60% confluence et 0 jour post-confluence. D'un autre côté, la p38 MAPK est augmentée par l'AR, ce qui est en accord avec son important rôle dans le processus de différenciation cellulaire<sup>251</sup>. De façon cohérente avec le fait que le CDX2 a une fonction cruciale dans le réseau de différenciation cellulaire épithélial<sup>81</sup>, nous avons observé son augmentation par l'AR dans les cellules Caco-2 à 60% de confluence.

Présentement, les effets physiologiques de l'AR sur l'expression de l'apo A-I sont mal compris et résultent en des données complexes et contradictoires provenant d'études in vivo et in vitro. Au niveau du foie, où la majorité des études ont été effectuées, les rétinoïdes diminuent l'expression du gène de l'apo A-I chez le rat<sup>254, 255</sup>, mais en augmente l'expression dans les cellules HepG2 et les hépatocytes primaires en culture<sup>209, 256</sup>. D'autres investigations ont démontré que les rétinoïdes n'ont aucun effet sur la quantité de l'ARNm hépatique de l'apo A-I<sup>212</sup>. De façon similaire, des chercheurs ont observé que les rétinoïdes ont (i) un effet stimulant ou inhibiteur éphémère sur la transcription du gène de l'apo A-I intestinal ; et (ii) une absence de corrélation entre les taux d'ARNm intestinal de l'apo A-I et la sécrétion de l'apo A-I<sup>212, 256, 257</sup>. Nul doute que des études additionnelles sont requises afin de définir l'impact des rétinoïdes sur la synthèse de l'apo A-I et sa sécrétion au niveau intestinal. D'autres recherches sont également nécessaire pour évaluer si les rétinoïdes jouent un rôle dans la

formation des HDL compte tenu de leurs effets bénéfiques contre les maladies cardiovasculaires. Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant l'impact des rétinoïdes dans la production des HDL ou l'assemblage des autres types de lipoprotéines dans des tissus intestinaux humains. Ceci est particulièrement pertinent considérant les effets de l'acide rétinoïque observés dans les études cliniques. Chez l'humain, l'administration de rétinoïdes synthétiques, d'isotrétinoïne et étrétinate, dans le cadre de traitements dermatologiques entraîne une diminution des concentrations de HDL accompagnée d'une augmentation significative des triglycérides, du cholestérol total et des LDL-cholestérol<sup>258-260</sup>. Toutefois, il semble qu'une thérapie prolongée avec l'isotrétinoïne ne présente qu'un faible risque d'induire une hyperlipidémie ou des effets négatifs sur les HDL<sup>261-264</sup> comparativement à des patients traités avec un placebo. Toutes ces observations traduisent l'importance d'investigations supplémentaires, lesquelles pourraient apporter une crédibilité solide à l'utilisation des rétinoïdes pour la régulation de l'apo A-I et des HDL. Compte tenu de nos données, nous postulons que les isomères de l'AR n'influencent pas les niveaux intestinaux de l'apo A-I par la stimulation de son expression génique et protéique.

Les rétinoïdes exercent leurs activités biologiques et pharmacologiques majoritairement en modulant la transcription de gènes spécifiques. Les rétinoïdes sont des ligands pour des facteurs de transcription spécifiques appartenant à la famille des récepteurs nucléaires<sup>271</sup>.

Deux classes distinctes de récepteurs ont été identifiées: les RAR et les RXR, lesquels sont composés de trois sous-types différents: (i) RAR- $\alpha$ , RAR- $\beta$  et RAR- $\gamma$  lesquels lient l'AR All-trans avec une forte affinité ; et (ii) RXR- $\alpha$ , RXR- $\beta$  and RXR- $\gamma$  lesquels lient l'AR 9-cis avec une forte affinité et l'AR All-trans avec une faible affinité<sup>215, 265-268</sup>. Ces récepteurs lient les sites de l'ADN connus comme des éléments réponse de l'AR, dans la région promotrice de gènes, activant ou inhibant ainsi leur transcription<sup>266</sup>. Tel que rapporté précédemment<sup>213, 217, 269</sup>, l'élément réponse de l'AR (RARE) est présent sur la région régulatrice du gène de l'apo A-I, ce qui suggère que les niveaux plasmatiques des HDL et de l'apo A-I

pourraient être contrôlés par les rétinoïdes. La région RARE du promoteur de l'apo A-I humain se lie à la fois à l'homodimères RXR-RXR et à l'hétérodimère RAR-RXR, et est essentielle à l'activité du promoteur de l'apo A-I<sup>213, 215</sup>. Nos résultats proposent que l'AR augmente les isoformes de RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) suite à une incubation de 6 ou 24 heures. Cependant, l'AR ne stimule les RXR  $\alpha$  et  $\beta$  qu'après 24 heures d'incubation. Les LXR sont demeurés insensibles et le PPAR  $\beta$  a augmenté de façon significative. Malgré une activation et possiblement une hétérodimérisation de RAR et RXR, l'AR n'a pas un impact majeur sur l'ARNm de l'apo A-I et sa protéine. Ces observations démontrent la complexité de la régulation de l'apo A-I.

En résumé, nos travaux permettent d'établir le rôle de l'AR dans la différenciation cellulaire. Toutefois, il ne serait pas impliqué dans la régulation de la production de l'apo A-I et des HDL au niveau intestinal. Des études sont encore nécessaires pour définir les raisons expliquant la résistance du gène de l'apo A-I à répondre positivement au stimulus de l'AR malgré les boîtes régulatrices RAR et RXR sur son promoteur.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Dawson MI. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Des* 2000 February;6(3):311-25.
- (2) Borel P, Draï J, Faure H, Fayol V, Galabert C, Laromiguiere M, Le MG. [Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005 March;63(2):165-77.
- (3) Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 2000 June 15;348 Pt 3:481-95.
- (4) Lamb TD, Pugh EN, Jr. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res* 2004 May;23(3):307-80.
- (5) Luo T, Sakai Y, Wagner E, Drager UC. Retinoids, eye development, and maturation of visual function. *J Neurobiol* 2006 June;66(7):677-86.
- (6) Nagpal S, Chandraratna RA. Vitamin A and regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998 July;1(4):341-6.
- (7) Orfanos CE, Zouboulis CC, Mond-Roesler B, Geilen CC. Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs* 1997 March;53(3):358-88.
- (8) Underhill TM, Weston AD. Retinoids and their receptors in skeletal development. *Microsc Res Tech* 1998 October 15;43(2):137-55.
- (9) Ross AC, Stephensen CB. Vitamin A and retinoids in antiviral responses. *FASEB J* 1996 July;10(9):979-85.
- (10) Ross AC, Gardner EM. The function of vitamin A in cellular growth and differentiation, and its roles during pregnancy and lactation. *Adv Exp Med Biol* 1994;352:187-200.
- (11) Clagett-Dame M, DeLuca HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* 2002;22:347-81.

- (12) Chung SS, Wolgemuth DJ. Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2004;105(2-4):189-202.
- (13) Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Jr., Lott IT, . Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 1985 October 3;313(14):837-41.
- (14) Morriss GM. Morphogenesis of the malformations induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A. *J Anat* 1972 November;113(Pt 2):241-50.
- (15) Inomata T, Kiuchi A, Yoshida T, Hisamatsu S, Takizawa A, Kashiwazaki N, Akahori F, Ninomiya H. Hypervitaminosis A resulting in DNA aberration in fetal transgenic mice (Muta Mouse). *Mutat Res* 2005 September 5;586(1):58-67.
- (16) Harrison EH, Hussain MM. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 2001 May;131(5):1405-8.
- (17) Reboul E, Abou L, Mikail C, Ghiringhelli O, Andre M, Portugal H, Jourdheuil-Rahmani D, Amiot MJ, Lairon D, Borel P. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J* 2005 April 15;387(Pt 2):455-61.
- (18) Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, Margotat A, Lagrost L, Collet X, Borel P. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem* 2006 February 24;281(8):4739-45.
- (19) GOODMAN DS, HUANG HS. BIOSYNTHESIS OF VITAMIN A WITH RAT INTESTINAL ENZYMES. *Science* 1965 August 20;149:879-80.
- (20) Napoli JL. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutr Rev* 2000 August;58(8):230-6.
- (21) Ross AC. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J* 1993 February 1;7(2):317-27.



- (22) Ong DE. A novel retinol-binding protein from rat. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* 1984 February 10;259(3):1476-82.
- (23) Levin MS, Davis AE. Retinoic acid increases cellular retinol binding protein II mRNA and retinol uptake in the human intestinal Caco-2 cell line. *J Nutr* 1997 January;127(1):13-7.
- (24) Mochizuki K, Suruga K, Kitagawa M, Takase S, Goda T. Modulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-dependent genes through disproportional expression of two subtypes in the small intestine. *Arch Biochem Biophys* 2001 May 1;389(1):41-8.
- (25) Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 2006 June;66(7):606-30.
- (26) Nayak N, Harrison EH, Hussain MM. Retinyl ester secretion by intestinal cells: a specific and regulated process dependent on assembly and secretion of chylomicrons. *J Lipid Res* 2001 February;42(2):272-80.
- (27) Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science* 1990 October 19;250(4979):399-404.
- (28) Bellovino D, Apreda M, Gragnoli S, Massimi M, Gaetani S. Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. *Mol Aspects Med* 2003 December;24(6):411-20.
- (29) Zanotti G, Berni R. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm* 2004;69:271-95.
- (30) Duester G. Alcohol dehydrogenase as a critical mediator of retinoic acid synthesis from vitamin A in the mouse embryo. *J Nutr* 1998 February;128(2 Suppl):459S-62S.
- (31) Vaglenova J, Martinez SE, Porte S, Duester G, Farres J, Pares X. Expression, localization and potential physiological significance of alcohol dehydrogenase in the gastrointestinal tract. *Eur J Biochem* 2003 June;270(12):2652-62.

- (32) Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 2000 July;267(14):4315-24.
- (33) Donovan M, Olofsson B, Gustafson AL, Dencker L, Eriksson U. The cellular retinoic acid binding proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995 June;53(1-6):459-65.
- (34) Chatellard-Gruaz D, Randolph RK, Hagens G, Saurat JH, Siegenthaler G. Differentiation of human epidermal keratinocytes is accompanied by increased expression of CRABP-II and increased cellular concentration of retinoic acids: retention of newly synthesized retinoic acids by CRABP-II. *J Lipid Res* 1998 July;39(7):1421-9.
- (35) Bucco RA, Zheng WL, Wardlaw SA, Davis JT, Sierra-Rivera E, Osteen KG, Melner MH, Kakkad BP, Ong DE. Regulation and localization of cellular retinol-binding protein, retinol-binding protein, cellular retinoic acid-binding protein (CRABP), and CRABP II in the uterus of the pseudopregnant rat. *Endocrinology* 1996 July;137(7):3111-22.
- (36) Zheng WL, Bucco RA, Sierra-Rievera E, Osteen KG, Melner MH, Ong DE. Synthesis of retinoic acid by rat ovarian cells that express cellular retinoic acid-binding protein-II. *Biol Reprod* 1999 January;60(1):110-4.
- (37) Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996 July;10(9):940-54.
- (38) Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004;24:201-21.
- (39) Grondona JM, Kastner P, Gansmuller A, Decimo D, Chambon P, Mark M. Retinal dysplasia and degeneration in RARbeta2/RARgamma2 compound mutant mice. *Development* 1996 July;122(7):2173-88.
- (40) Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A, Chambon P. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I).

Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 1994 October;120(10):2723-48.

- (41) Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 1994 October;120(10):2749-71.
- (42) Gruber PJ, Kubalak SW, Pexieder T, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *J Clin Invest* 1996 September 15;98(6):1332-43.
- (43) Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994 May 1;8(9):1007-18.
- (44) Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect* 1999 February;107 Suppl 1:5-24.
- (45) Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA, Buttyan R. Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994 October;128(2):169-81.
- (46) Pagano M. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J* 1997 November;11(13):1067-75.
- (47) Guo J, Sheng G, Warner BW. Epidermal growth factor-induced rapid retinoblastoma phosphorylation at Ser780 and Ser795 is mediated by ERK1/2 in small intestine epithelial cells. *J Biol Chem* 2005 October 28;280(43):35992-8.
- (48) Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998 August 1;12(15):2245-62.

- (49) Kazanov D, Shapira I, Pick M, Kolker O, Liberman E, Deutsch V, Strier L, Dvory-Sobol H, Kunik T, Arber N. Oncogenic transformation of normal enterocytes by overexpression of cyclin D1. *Dig Dis Sci* 2003 July;48(7):1251-61.
- (50) Yang C, Trent S, Ionescu-Tiba V, Lan L, Shioda T, Sgroi D, Schmidt EV. Identification of cyclin D1- and estrogen-regulated genes contributing to breast carcinogenesis and progression. *Cancer Res* 2006 December 15;66(24):11649-58.
- (51) Chung DC. Cyclin D1 in human neuroendocrine: tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2004 April;1014:209-17.
- (52) Yang R, Bie W, Haegebarth A, Tyner AL. Differential regulation of D-type cyclins in the mouse intestine. *Cell Cycle* 2006 January;5(2):180-3.
- (53) Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, Chaganti RS. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* 1997 March;8(3):293-9.
- (54) Yu J, Miehlike S, Ebert MP, Szokodi D, Wehvnignh B, Malfertheiner P, Ehninger G, Bayerdoerffer E. Expression of cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives. *Chin Med J (Engl )* 2002 May;115(5):710-5.
- (55) Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene* 1998 August 27;17(8):1027-37.
- (56) Rojas P, Cadenas MB, Lin PC, Benavides F, Conti CJ, Rodriguez-Puebla ML. Cyclin D2 and cyclin D3 play opposite roles in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 2007 March 15;26(12):1723-30.
- (57) Despouy G, Bastie JN, Deshaies S, Balitrand N, Mazharian A, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L. Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J Biol Chem* 2003 February 21;278(8):6355-62.

- (58) Nikiforov MA, Popov N, Kotenko I, Henriksson M, Cole MD. The Mad and Myc basic domains are functionally equivalent. *J Biol Chem* 2003 March 28;278(13):11094-9.
- (59) Mateyak MK, Obaya AJ, Sedivy JM. c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol Cell Biol* 1999 July;19(7):4672-83.
- (60) Chin L, Schreiber-Agus N, Pellicer I, Chen K, Lee HW, Dudast M, Cordon-Cardo C, DePinho RA. Contrasting roles for Myc and Mad proteins in cellular growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 August 29;92(18):8488-92.
- (61) Cultraro CM, Bino T, Segal S. Function of the c-Myc antagonist Mad1 during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Mol Cell Biol* 1997 May;17(5):2353-9.
- (62) Queva C, Hurlin PJ, Foley KP, Eisenman RN. Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Oncogene* 1998 February 26;16(8):967-77.
- (63) Kuemmerle JF, Zhou H, Bowers JG. IGF-I stimulates human intestinal smooth muscle cell growth by regulation of G1 phase cell cycle proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 March;286(3):G412-G419.
- (64) Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, Le B, X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000 December;11(4):295-302.
- (65) Guo J, Sheng G, Warner BW. Epidermal growth factor-induced rapid retinoblastoma phosphorylation at Ser780 and Ser795 is mediated by ERK1/2 in small intestine epithelial cells. *J Biol Chem* 2005 October 28;280(43):35992-8.
- (66) Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997 April;9(2):180-6.

- (67) Kuemmerle JF, Zhou H, Bowers JG. IGF-I stimulates human intestinal smooth muscle cell growth by regulation of G1 phase cell cycle proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 March;286(3):G412-G419.
- (68) Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade. *Kidney Int* 1999 October;56(4):1258-61.
- (69) Sheng H, Shao J, Townsend CM, Jr., Evers BM. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. *Gut* 2003 October;52(10):1472-8.
- (70) Kuemmerle JF. IGF-I elicits growth of human intestinal smooth muscle cells by activation of PI3K, PDK-1, and p70S6 kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 March;284(3):G411-G422.
- (71) Van Beers EH, Al RH, Rings EH, Einerhand AW, Dekker J, Buller HA. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. *Biochem J* 1995 June 15;308 ( Pt 3):769-75.
- (72) Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 1999 March 15;4:D286-D298.
- (73) Pinto D, Clevers H. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* 2005 March;97(3):185-96.
- (74) Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 June;280(6):C1540-C1554.
- (75) Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002 March 8;277(10):8226-34.

- (76) Weber GF, Menko AS. Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary for lens fiber cell differentiation and survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 October;47(10):4490-9.
- (77) Xie Z, Bikle DD. The recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to the E-cadherin-catenin complex at the plasma membrane is required for calcium-induced phospholipase C-gamma1 activation and human keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 2007 March 23;282(12):8695-703.
- (78) Li X, Leu S, Cheong A, Zhang H, Baibakov B, Shih C, Birnbaum MJ, Donowitz M. Akt2, phosphatidylinositol 3-kinase, and PTEN are in lipid rafts of intestinal cells: role in absorption and differentiation. *Gastroenterology* 2004 January;126(1):122-35.
- (79) Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000 October 13;103(2):239-52.
- (80) Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 1999 September;277(3 Pt 1):G631-G641.
- (81) Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* 2001 June 15;276(24):21885-94.
- (82) Zetser A, Gredinger E, Bengal E. p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem* 1999 February 19;274(8):5193-200.
- (83) Bhat NR, Zhang P, Mohanty SB. p38 MAP kinase regulation of oligodendrocyte differentiation with CREB as a potential target. *Neurochem Res* 2007 February;32(2):293-302.
- (84) Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 2000 June;25(6):257-60.

- (85) Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005 January;15(1):11-8.
- (86) James R, Erler T, Kazenwadel J. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 1994 May 27;269(21):15229-37.
- (87) Mutoh H, Satoh K, Kita H, Sakamoto H, Hayakawa H, Yamamoto H, Isoda N, Tamada K, Ido K, Sugano K. *Cdx2* specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine. *Int J Dev Biol* 2005;49(7):867-71.
- (88) Escaffit F, Pare F, Gauthier R, Rivard N, Boudreau F, Beaulieu JF. *Cdx2* modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 March 31;342(1):66-72.
- (89) Goossens S, van RF. Cadherin-mediated cell-cell adhesion in the testis. *Front Biosci* 2005 January 1;10:398-419.
- (90) Marie PJ. Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* 2002 March;190(3):297-305.
- (91) Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Gunzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J* 2005 March 23;24(6):1146-56.
- (92) Saito T, Masuda N, Miyazaki T, Kanoh K, Suzuki H, Shimura T, Asao T, Kuwano H. Expression of EphA2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis. *Oncol Rep* 2004 March;11(3):605-11.
- (93) Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 1999 July 2;274(27):19347-51.



- (94) Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, Rivard N. Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2004 April;199(1):32-9.
- (95) del Rincon SV, Rousseau C, Samanta R, Miller WH, Jr. Retinoic acid-induced growth arrest of MCF-7 cells involves the selective regulation of the IRS-1/PI 3-kinase/AKT pathway. *Oncogene* 2003 May 29;22(22):3353-60.
- (96) Hammond LA, Brown G, Keedwell RG, Durham J, Chandraratna RA. The prospects of retinoids in the treatment of prostate cancer. *Anticancer Drugs* 2002 September;13(8):781-90.
- (97) Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002 January;41(1):41-55.
- (98) Mernitz H, Smith DE, Zhu AX, Wang XD. 9-cis-Retinoic acid inhibition of lung carcinogenesis in the A/J mouse model is accompanied by increased expression of RAR-beta but no change in cyclooxygenase-2. *Cancer Lett* 2006 November 28;244(1):101-8.
- (99) Stewart LV, Thomas ML. Retinoids differentially regulate the proliferation of colon cancer cell lines. *Exp Cell Res* 1997 June 15;233(2):321-9.
- (100) Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 1998 November;115(5):1049-55.
- (101) Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S, Matsuzawa Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1999 January;90(1):75-80.
- (102) Singh RR, Gururaj AE, Vadlamudi RK, Kumar R. 9-cis-retinoic acid up-regulates expression of transcriptional coregulator PELP1, a novel coactivator of the retinoid X receptor alpha pathway. *J Biol Chem* 2006 June 2;281(22):15394-404.

- (103) Kitamura S, Miyazaki Y, Hiraoka S, Nagasawa Y, Toyota M, Takakura R, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. PPARgamma agonists inhibit cell growth and suppress the expression of cyclin D1 and EGF-like growth factors in ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Int J Cancer* 2001 November 1;94(3):335-42.
- (104) Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986 September;68(9):1035-40.
- (105) Reisher SR, Hughes TE, Ordovas JM, Schaefer EJ, Feinstein SI. Increased expression of apolipoprotein genes accompanies differentiation in the intestinal cell line Caco-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 June 15;90(12):5757-61.
- (106) Hughes TE, Sasak WV, Ordovas JM, Forte TM, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. A novel cell line (Caco-2) for the study of intestinal lipoprotein synthesis. *J Biol Chem* 1987 March 15;262(8):3762-7.
- (107) Levy E, Marcel YL, Milne RW, Grey VL, Roy CC. Absence of intestinal synthesis of apolipoprotein B-48 in two cases of abetalipoproteinemia. *Gastroenterology* 1987 November;93(5):1119-26.
- (108) Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr* 2000;20:663-97.
- (109) Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 2002 May 10;277(19):16470-7.
- (110) Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta* 1996 May 20;1300(3):151-70.

- (111) Gibbons GF. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J* 1990 May 15;268(1):1-13.
- (112) Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004 October;84(4):1381-478.
- (113) Packard CJ. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2006 August;17(4):412-7.
- (114) Curtiss LK, Valenta DT, Hime NJ, Rye KA. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 January;26(1):12-9.
- (115) von EA, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005 March;8(2):147-52.
- (116) Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol* 2005 November 15;46(10):1792-8.
- (117) Young CE, Karas RH, Kuvin JT. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev* 2004 March;12(2):107-19.
- (118) Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003 October;170(2):191-203.
- (119) Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999 December;147(2):213-25.
- (120) Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004 October 15;95(8):764-72.
- (121) Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 2006 April;84(4):276-94.

- (122) Toth PP. High-density lipoprotein as a therapeutic target: clinical evidence and treatment strategies. *Am J Cardiol* 2005 November 7;96(9A):50K-8K.
- (123) Assmann G, Gotto AM, Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004 June 15;109(23 Suppl 1):III8-14.
- (124) Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM* 2005 December;98(12):845-56.
- (125) Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ. LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2002 July;43(7):1054-64.
- (126) de Grooth GJ, Klerkx AH, Stroes ES, Stalenhoef AF, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004 November;45(11):1967-74.
- (127) Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1972 February 25;46(4):1493-8.
- (128) Reardon CA, Kan HY, Cabana V, Blachowicz L, Lukens JR, Wu Q, Liadaki K, Getz GS, Zannis VI. In vivo studies of HDL assembly and metabolism using adenovirus-mediated transfer of ApoA-I mutants in ApoA-I-deficient mice. *Biochemistry* 2001 November 13;40(45):13670-80.
- (129) Krieger M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 1999;68:523-58.
- (130) Temel RE, Walzem RL, Banka CL, Williams DL. Apolipoprotein A-I is necessary for the in vivo formation of high density lipoprotein competent for scavenger receptor BI-mediated cholesteryl ester-selective uptake. *J Biol Chem* 2002 July 19;277(29):26565-72.
- (131) de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Jonas A, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res* 2001 February;42(2):309-13.

- (132) Erl W, Weber PC, Weber C. Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands. *Atherosclerosis* 1998 February;136(2):297-303.
- (133) Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol* 2002 June;13(3):285-8.
- (134) Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 November;15(11):1987-94.
- (135) Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem* 1999 November 12;274(46):33143-7.
- (136) Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 2004 March;21(3):210-21.
- (137) Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, Gamble JR, Rye KA, Barter PJ, Vadas MA, Xia P. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation* 2004 May 4;109(17):2116-22.
- (138) Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 January;25(1):29-38.
- (139) Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson AD, Van Lenten BJ, Vora D, Fogelman AM. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 April;21(4):481-8.
- (140) Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 2006 October 1;41(7):1031-40.

- (141) Klerkx AH, El HK, van der Steeg WA, Boekholdt SM, Stroes ES, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 April;26(4):706-15.
- (142) Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000 September;41(9):1481-94.
- (143) Hayek T, Oiknine J, Dankner G, Brook JG, Aviram M. HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995 October;33(10):721-5.
- (144) Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000 September;41(9):1495-508.
- (145) Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004 November 1;37(9):1304-16.
- (146) Tomas M, Latorre G, Senti M, Marrugat J. [The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis]. *Rev Esp Cardiol* 2004 June;57(6):557-69.
- (147) Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005 January 15;38(2):153-63.
- (148) Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000 June 9;275(23):17527-35.

- (149) Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001 November 30;276(48):44444-9.
- (150) Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 April;21(4):542-7.
- (151) Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000 October 27;275(43):33435-42.
- (152) Evangelou AM. Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994 January;50(1):1-28.
- (153) Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001 October;15(12):2073-84.
- (154) De GB, Stengel D, Landeloos M, Lox M, Le GL, Collen D, Holvoet P, Ninio E. Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 October;20(10):E68-E75.
- (155) Vohl MC, Neville TA, Kumarathasan R, Braschi S, Sparks DL. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry* 1999 May 11;38(19):5976-81.
- (156) Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 February 1;23(2):160-7.

- (157) Zhang B, Fan P, Shimoji E, Xu H, Takeuchi K, Bian C, Saku K. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by JTT-705 increases apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein and favorably affects the function and enzyme composition of high-density lipoprotein in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 October;24(10):1910-5.
- (158) Huang Z, Inazu A, Nohara A, Higashikata T, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein inhibitor (JTT-705) and the development of atherosclerosis in rabbits with severe hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2002 December;103(6):587-94.
- (159) Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003 December 2;108(22):2751-6.
- (160) Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995 December;96(6):2758-67.
- (161) Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004 August;114(4):529-41.
- (162) Ferretti G, Bacchetti T, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 2006 January;184(1):1-7.
- (163) Nicholls SJ, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005 August;15(6):212-9.



- (164) Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fogelman AM. Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006 September;2(9):504-11.
- (165) O'Connell BJ, Genest J, Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001 October 16;104(16):1978-83.
- (166) Kauser K, da C, V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 May;278(5):H1679-H1685.
- (167) Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994 May;14(5):753-9.
- (168) Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001 July;7(7):853-7.
- (169) Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996 January 26;271(5248):518-20.
- (170) Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 2003 March 14;278(11):9142-9.
- (171) Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 October 1;23(10):1724-31.
- (172) Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1982 June 25;257(12):6653-5.

- (173) Blann AD, Dobrotova M, Kubisz P, McCollum CN. von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1995 August;74(2):626-30.
- (174) Ren S, Shen GX. Impact of antioxidants and HDL on glycated LDL-induced generation of fibrinolytic regulators from vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 June;20(6):1688-93.
- (175) Freudenberg MA, Galanos C. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int Rev Immunol* 1990;6(4):207-21.
- (176) Van Amersfoort ES, van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003 July;16(3):379-414.
- (177) Veszy CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* 2000 May;68(5):2410-7.
- (178) Yu B, Wright SD. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem* 1996 February 23;271(8):4100-5.
- (179) Levels JH, Marquart JA, Abraham PR, van den Ende AE, Molhuizen HO, van Deventer SJ, Meijers JC. Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. *Infect Immun* 2005 April;73(4):2321-6.
- (180) Chen J, Mehta JL, Haider N, Zhang X, Narula J, Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ Res* 2004 February 20;94(3):370-6.
- (181) Okura Y, Brink M, Itabe H, Scheidegger KJ, Kalangos A, Delafontaine P. Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000 November 28;102(22):2680-6.

- (182) Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 October;17(10):2158-66.
- (183) Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 June 16;272(3):872-6.
- (184) Noor R, Shuaib U, Wang CX, Todd K, Ghani U, Schwindt B, Shuaib A. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis* 2006 July 31.
- (185) Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von EA, Seedorf U, Assmann G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 2001 September 14;276(37):34480-5.
- (186) Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schulz R, Heusch G, Haude M, von Wnuck LK, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* 2006 September 26;114(13):1403-9.
- (187) Nofer JR, van der GM, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck LK, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004 February;113(4):569-81.
- (188) Schaefer EJ, Heaton WH, Wetzel MG, Brewer HB, Jr. Plasma apolipoprotein A-1 absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1982 January;2(1):16-26.
- (189) Miller JC, Barth RK, Shaw PH, Elliott RW, Hastie ND. Identification of a cDNA clone for mouse apoprotein A-1 (apo A-1) and its use in characterization of apo A-1

- mRNA expression in liver and small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 March;80(6):1511-5.
- (190) Srivastava RA, Srivastava N. High density lipoprotein, apolipoprotein A-I, and coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 2000 June;209(1-2):131-44.
- (191) Ghiselli G, Gotto AM, Jr., Tanenbaum S, Sherrill BC. Proapolipoprotein A-I conversion kinetics in vivo in human and in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 February;82(3):874-8.
- (192) Law SW, Brewer HB, Jr. Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human apolipoprotein A-I mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 January;81(1):66-70.
- (193) Moore RE, Navab M, Millar JS, Zimetti F, Hama S, Rothblat GH, Rader DJ. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation. *Circ Res* 2005 October 14;97(8):763-71.
- (194) Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991 September 19;353(6341):265-7.
- (195) Hargrove GM, Junco A, Wong NC. Hormonal regulation of apolipoprotein AI. *J Mol Endocrinol* 1999 April;22(2):103-11.
- (196) Mooradian AD, Haas MJ, Wong NC. The effect of select nutrients on serum high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels. *Endocr Rev* 2006 February;27(1):2-16.
- (197) Ettinger WH, Klinefelter HF, Kwiterovitch PO. Effect of short-term, low-dose corticosteroids on plasma lipoprotein lipids. *Atherosclerosis* 1987 February;63(2-3):167-72.

- (198) Taylor AH, Raymond J, Dionne JM, Romney J, Chan J, Lawless DE, Wanke IE, Wong NC. Glucocorticoid increases rat apolipoprotein A-I promoter activity. *J Lipid Res* 1996 October;37(10):2232-43.
- (199) Varma VK, Smith TK, Sorci-Thomas M, Ettinger WH, Jr. Dexamethasone increases apolipoprotein A-I concentrations in medium and apolipoprotein A-I mRNA abundance from Hep G2 cells. *Metabolism* 1992 October;41(10):1075-80.
- (200) Harnish DC, Malik S, Karathanasis SK. Activation of apolipoprotein AI gene transcription by the liver-enriched factor HNF-3. *J Biol Chem* 1994 November 11;269(45):28220-6.
- (201) Harnish DC, Malik S, Kilbourne E, Costa R, Karathanasis SK. Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4. *J Biol Chem* 1996 June 7;271(23):13621-8.
- (202) Davidson MH, Maki KC, Marx P, Maki AC, Cyrowski MS, Nanavati N, Arce JC. Effects of continuous estrogen and estrogen-progestin replacement regimens on cardiovascular risk markers in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 2000 November 27;160(21):3315-25.
- (203) Lamon-Fava S, Postfai B, Diffenderfer M, DeLuca C, O'Connor J, Jr., Welty FK, Dolnikowski GG, Barrett PH, Schaefer EJ. Role of the estrogen and progestin in hormonal replacement therapy on apolipoprotein A-I kinetics in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 February;26(2):385-91.
- (204) Lamon-Fava S, Ordovas JM, Schaefer EJ. Estrogen increases apolipoprotein (apo) A-I secretion in hep G2 cells by modulating transcription of the apo A-I gene promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 December;19(12):2960-5.
- (205) Zhang X, Jiao JJ, Bhavnani BR, Tam SP. Regulation of human apolipoprotein A-I gene expression by equine estrogens. *J Lipid Res* 2001 November;42(11):1789-800.
- (206) Staels B, van TA, Andreu T, Auwerx J. Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. *Arterioscler Thromb* 1992 March;12(3):286-94.

- (207) Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 1998 October 2;273(40):25713-20.
- (208) Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem* 1994 December 9;269(49):31012-8.
- (209) Kaptein A, de Wit EC, Princen HM. Retinoids stimulate ApoA-I synthesis by induction of gene transcription in primary hepatocyte cultures from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Arterioscler Thromb* 1993 October;13(10):1505-14.
- (210) Zolfaghari R, Ross AC. Effect of vitamin A deficiency and retinoic acid repletion on intestinal and hepatic apolipoprotein A-I mRNA levels of adult rats. *J Lipid Res* 1994 November;35(11):1985-92.
- (211) Berthou L, Langouet S, Grude P, Deneffe P, Branellec D, Guillouzo A. Negative regulation of Apo A-I gene expression by retinoic acid in rat hepatocytes maintained in a coculture system. *Biochim Biophys Acta* 1998 April 22;1391(3):329-36.
- (212) Nagasaki A, Kikuchi T, Kurata K, Masushige S, Hasegawa T, Kato S. Vitamin A regulates the expression of apolipoprotein AI and CIII genes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 December 30;205(3):1510-7.
- (213) Rottman JN, Widom RL, Nadal-Ginard B, Mahdavi V, Karathanasis SK. A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol Cell Biol* 1991 July;11(7):3814-20.
- (214) Tzamelis I, Zannis VI. Binding specificity and modulation of the ApoA-I promoter activity by homo- and heterodimers of nuclear receptors. *J Biol Chem* 1996 April 5;271(14):8402-15.

- (215) Zhang XK, Lehmann J, Hoffmann B, Dawson MI, Cameron J, Graupner G, Hermann T, Tran P, Pfahl M. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 1992 August 13;358(6387):587-91.
- (216) Kaptein A, Neele DM, Twisk J, Hendriks HF, Kooistra T, Princen HM. Mechanism of the slow induction of apolipoprotein A-I synthesis by retinoids in cynomolgus hepatocytes: involvement of retinoic acid and retinoid X receptors. *J Lipid Res* 1997 November;38(11):2273-80.
- (217) Widom RL, Rhee M, Karathanasis SK. Repression by ARP-1 sensitizes apolipoprotein AI gene responsiveness to RXR alpha and retinoic acid. *Mol Cell Biol* 1992 August;12(8):3380-9.
- (218) Srivastava RA, Srivastava N, Averna M. Dietary cholic acid lowers plasma levels of mouse and human apolipoprotein A-I primarily via a transcriptional mechanism. *Eur J Biochem* 2000 July;267(13):4272-80.
- (219) Ladias JA, Karathanasis SK. Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* 1991 February 1;251(4993):561-5.
- (220) Srivastava RA. Saturated fatty acid, but not cholesterol, regulates apolipoprotein AI gene expression by posttranscriptional mechanism. *Biochem Mol Biol Int* 1994 September;34(2):393-402.
- (221) Schwab DA, Rea TJ, Hanselman JC, Bisgaier CL, Krause BR, Pape ME. Elevated hepatic apolipoprotein A-I transcription is associated with diet-induced hyperalphalipoproteinemia in rabbits. *Life Sci* 2000 March 24;66(18):1683-94.
- (222) Hayek T, Ito Y, Azrolan N, Verdery RB, alto-Setala K, Walsh A, Breslow JL. Dietary fat increases high density lipoprotein (HDL) levels both by increasing the transport rates and decreasing the fractional catabolic rates of HDL cholesterol ester and apolipoprotein (Apo) A-I. Presentation of a new animal model and mechanistic studies in human Apo A-I transgenic and control mice. *J Clin Invest* 1993 April;91(4):1665-71.

- (223) O'Brien T, Katz K, Hodge D, Nguyen TT, Kottke BA, Hay ID. The effect of the treatment of hypothyroidism and hyperthyroidism on plasma lipids and apolipoproteins AI, AII and E. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997 January;46(1):17-20.
- (224) Abrams JJ, Grundy SM. Cholesterol metabolism in hypothyroidism and hyperthyroidism in man. *J Lipid Res* 1981 February;22(2):323-38.
- (225) Strobl W, Gorder NL, Lin-Lee YC, Gotto AM, Jr., Patsch W. Role of thyroid hormones in apolipoprotein A-I gene expression in rat liver. *J Clin Invest* 1990 March;85(3):659-67.
- (226) Murao K, Bassyouni H, Taylor AH, Wanke IE, Wong NC. Hepatocyte nuclear factor 4 inhibits the activity of site A from the rat apolipoprotein AI gene. *Biochemistry* 1997 January 14;36(2):301-6.
- (227) De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 1991 November;5(14):2924-33.
- (228) Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996 July;10(9):940-54.
- (229) Amos B, Lotan D, Lotan R. Increased fucosylation of high-molecular-weight glycoproteins accompanies retinoic-acid-induced differentiation of F-9 embryonal carcinoma cells. *Int J Cancer* 1990 July 15;46(1):86-94.
- (230) Galvin-Parton PA, Watkins DC, Malbon CC. Retinoic acid modulation of transmembrane signaling. Analysis in F9 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1990 October 15;265(29):17771-9.
- (231) Morre DM. Intracellular actions of vitamin A. *Int Rev Cytol* 1992;135:1-38.
- (232) Sporn MB, Roberts AB, Goodman Ds. *The retinoids vols 1 and 2*. Orlando: Academic Press; 1984.
- (233) Schuger L, Varani J, Mitra R, Jr., Gilbride K. Retinoic acid stimulates mouse lung development by a mechanism involving epithelial-mesenchymal interaction and



- regulation of epidermal growth factor receptors. *Dev Biol* 1993 October;159(2):462-73.
- (234) Terenzi F, Falasca L, Marino M, Mele R, Velardi G, Conti DL. Modulation of proliferative activity and amino acid transport in chick embryo hepatocytes by EGF and retinoic acid. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 1997 September;43(6):861-71.
- (235) De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 1991 November;5(14):2924-33.
- (236) Amos B, Lotan D, Lotan R. Increased fucosylation of high-molecular-weight glycoproteins accompanies retinoic-acid-induced differentiation of F-9 embryonal carcinoma cells. *Int J Cancer* 1990 July 15;46(1):86-94.
- (237) Galvin-Parton PA, Watkins DC, Malbon CC. Retinoic acid modulation of transmembrane signaling. Analysis in F9 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1990 October 15;265(29):17771-9.
- (238) Morre DM. Intracellular actions of vitamin A. *Int Rev Cytol* 1992;135:1-38.
- (239) Schuger L, Varani J, Mitra R, Jr., Gilbride K. Retinoic acid stimulates mouse lung development by a mechanism involving epithelial-mesenchymal interaction and regulation of epidermal growth factor receptors. *Dev Biol* 1993 October;159(2):462-73.
- (240) Terenzi F, Falasca L, Marino M, Mele R, Velardi G, Conti DL. Modulation of proliferative activity and amino acid transport in chick embryo hepatocytes by EGF and retinoic acid. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 1997 September;43(6):861-71.
- (241) Bartkova J, Lukas J, Bartek J. Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res* 1997;3:211-20.
- (242) Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2001 May;194(1):35-42.

- (243) Ito Y, Takeda T, Wakasa K, Tsujimoto M, Matsuura N. Expression and possible role of cyclin D3 in human pancreatic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2001 March;21(2A):1043-8.
- (244) Ebert MP, Hernberg S, Fei G, Sokolowski A, Schulz HU, Lippert H, Malfertheiner P. Induction and expression of cyclin D3 in human pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001 July;127(7):449-54.
- (245) Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 2000 September;6(9):3614-20.
- (246) Yasogawa Y, Takano Y, Okayasu I, Kakita A. The 5D4 antibody (anti-cyclin D1/D2) related antigen: cytoplasmic staining is correlated to the progression of gastric cancer. *Pathol Int* 1998 September;48(9):717-22.
- (247) Takano Y, Kato Y, Masuda M, Ohshima Y, Okayasu I. Cyclin D2, but not cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol* 1999 October;189(2):194-200.
- (248) Mermelshtein A, Gerson A, Walfisch S, Delgado B, Shechter-Maor G, Delgado J, Fich A, Gheber L. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. *Br J Cancer* 2005 August 8;93(3):338-45.
- (249) King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tsihchlis PN, Brugge JS. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* 1997 August;17(8):4406-18.
- (250) Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 1996 April;8(2):153-8.
- (251) Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 2000 June;25(6):257-60.

- (252) Ptasznik A, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez A, Hayek A. Phosphatidylinositol 3-kinase is a negative regulator of cellular differentiation. *J Cell Biol* 1997 June 2;137(5):1127-36.
- (253) Busca R, Bertolotto C, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem* 1996 December 13;271(50):31824-30.
- (254) Zolfaghari R, Ross AC. Effect of vitamin A deficiency and retinoic acid repletion on intestinal and hepatic apolipoprotein A-I mRNA levels of adult rats. *J Lipid Res* 1994 November;35(11):1985-92.
- (255) Berthou L, Staels B, Saldicco I, Berthelot K, Casey J, Fruchart JC, Deneffe P, Branellec D. Opposite in vitro and in vivo regulation of hepatic apolipoprotein A-I gene expression by retinoic acid. Absence of effects on apolipoprotein A-II gene expression. *Arterioscler Thromb* 1994 October;14(10):1657-64.
- (256) Giller T, Hennes U, Kempen HJ. Regulation of human apolipoprotein A-I expression in Caco-2 and HepG2 cells by all-trans and 9-cis retinoic acids. *J Lipid Res* 1995 May;36(5):1021-8.
- (257) Wagner RD, Krul ES, Moberly JB, Alpers DH, Schonfeld G. Apolipoprotein expression and cellular differentiation in Caco-2 intestinal cells. *Am J Physiol* 1992 August;263(2 Pt 1):E374-E382.
- (258) Melnik BC, Bros U, Plewig G. Evaluation of the atherogenic risk of isotretinoin-induced and etretinate-induced alterations of lipoprotein cholesterol metabolism. *J Invest Dermatol* 1987 March;88(3 Suppl):39s-43s.
- (259) O'Leary TJ, Simo IE, Kanigsberg N, Walker J, Goodall JC, Ooi TC. Changes in serum lipoproteins and high-density lipoprotein composition during isotretinoin therapy. *Clin Invest Med* 1987 July;10(4):355-60.
- (260) Zech LA, Gross EG, Peck GL, Brewer HB. Changes in plasma cholesterol and triglyceride levels after treatment with oral isotretinoin. A prospective study. *Arch Dermatol* 1983 December;119(12):987-93.

- (261) Alvarez RD, Conner MG, Weiss H, Klug PM, Niwas S, Manne U, Bacus J, Kagan V, Sexton KC, Grubbs CJ, Eltoum IE, Grizzle WE. The efficacy of 9-cis-retinoic acid (aliretinoin) as a chemopreventive agent for cervical dysplasia: results of a randomized double-blind clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 February;12(2):114-9.
- (262) Baxter KF, Ling TC, Barth JH, Cunliffe WJ. Retrospective survey of serum lipids in patients receiving more than three courses of isotretinoin. *J Dermatolog Treat* 2003 December;14(4):216-8.
- (263) Redlich CA, Chung JS, Cullen MR, Blaner WS, Van Bennekum AM, Berglund L. Effect of long-term beta-carotene and vitamin A on serum cholesterol and triglyceride levels among participants in the Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET). *Atherosclerosis* 1999 August;145(2):425-32.
- (264) Singhal S, Gupta R, Goyle A. Comparison of antioxidant efficacy of vitamin E, vitamin C, vitamin A and fruits in coronary heart disease: a controlled trial. *J Assoc Physicians India* 2001 March;49:327-31.
- (265) Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992 January 24;68(2):397-406.
- (266) Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 1992 October;17(10):427-33.
- (267) Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, . 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 1992 January 23;355(6358):359-61.
- (268) Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992 March;6(3):329-44.

- (269) Crowe DL, Chandraratna RA. A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Res* 2004;6(5):R546-R555.
- (270) Sporn, MB, Roberts, AB and Goodman, DS. The retinoids vols 1 and 2, Academic Press, Orlando, 1984.
- (271) Mangelsdorf, DJ, Umesono, K, and Evans, RM. The retinoid receptors. In Sporn, MB, Roberts, AB, and Godman, DS, editors. The retinoids: Biology, Chemistry and Medicine, Raven Press, New York, 1999.