



Université de Montréal

**Biogénèse des lipoprotéines de haute densité (HDL) :  
Implication du transporteur ABCA1**

Par

**Houssein Hajj Hassan**

Programme de biologie moléculaire  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
En vue de l'obtention du grade de  
*Philosophiæ Doctor* (Ph.D)  
En biologie moléculaire

Juillet 2011

© Houssein Hajj Hassan, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

**Biogénèse des lipoprotéines de haute densité (HDL) :  
Implication du transporteur ABCA1**

Présentée par  
**Houssein Hajj Hassan**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

.....*Dr Richard Bertrand*.....

Président-rapporteur

.....*Dr Jacques Genest*.....

Directeur de recherche

.....*Dr Jean-Philippe Gratton*.....

Co-directeur de recherche

.....*Dr Vincent Poitout*.....

Membre du jury

.....*Dr Ross Milne*.....

Examineur externe

.....*Dr Isabelle Royal*.....

Représentant du doyen de la Faculté de médecine

## Résumé

Les patients atteints de la maladie de Tangier présentent des niveaux très bas de lipoprotéines de haute densité (HDL), un facteur de risque pour le développement des maladies cardiovasculaires. *In vivo*, les HDL ont un effet protecteur important contre l'athérosclérose puisqu'elles effectuèrent le transport à rebours du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Or, la maladie de Tangier est causée par des mutations dans le gène du transporteur « ATP-binding cassette A1 » (ABCA1). Le modèle actuel stipule que ce transporteur assure la lipidation de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I), la composante protéique majeure des HDL, pour former des particules HDL naissantes discoïdales. Un défaut dans la lipidation de l'apoA-I par l'ABCA1 abolit la biogénèse des HDL. Nous avons voulu étudier les sites d'interaction de l'ABCA1 avec son ligand (l'apoA-I), les voies de biogénèse impliquées, et l'implication des pré- $\beta$ -HDL dans l'efflux du cholestérol par la voie de l'ABCA1. D'abord, nous avons utilisé un système de culture cellulaire (fibroblastes humaines et BHK-ABCA1-inductible) afin de déterminer les sites de liaison cellulaires de l'apoA-I, leurs localisations et l'implication de l'ABCA1. Nous avons trouvé que la majorité de l'apoA-I n'est pas associée à l'ABCA1 et, deux tiers de cet apoA-I, était à la membrane plasmique. Ensuite, Une étude plus détaillée examinait les voies de lipidation de l'apoA-I, soit au niveau de la membrane plasmique (MP), soit aux compartiments intracellulaires (CICs). Nous avons montré que la lipidation de l'apoA-I a lieu aux deux niveaux (MP et CICs) selon deux voies différentes cinétiquement. Finalement, nous avons montré que les pré- $\beta$ -HDL effluent aussi (efficacement que l'apoA-I) le cholestérol par la voie de l'ABCA1. Ces observations réunies démontrent que 1) la majorité de l'apoA-I s'est trouvé non-associée à l'ABCA1; 2) deux tiers de l'apoA-I s'associent a la membrane plasmique; 3) la lipidation de l'apoA-I se fait en partie à la membrane plasmique et, par la voie de retro-endocytose du complexe apoA-I/ABCA1.

Mots clés: cardiovasculaire, cholestérol, HDL, ABCA1, apolipoprotéine A-I.

## **Abstract**

Patients affected with Tangier disease show abnormal low levels of high density lipoproteins (HDL), a risk factor for the development of cardiovascular diseases. *In vivo*, HDL has an important protective effect against atherosclerosis since they accomplish the reverse cholesterol transport from peripheral tissues towards the liver. However, Tangier disease is caused by mutations in the gene of the transporter “ATP-binding cassette A1” (ABCA1). The current model believe that ABCA1 promotes the lipidation of apolipoprotein AI (apoA-I), the major protein component of HDLs, to form nascent discoid HDL particles. A defect in the lipidation of apoA-I by ABCA1 abolishes the biogenesis of HDL. We wanted to study interaction sites of ABCA1 with its ligand (the apoA-I), the implicated biogenesis’s pathways, and the implication of pre- $\beta$ -HDLs in the cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. Initially, we used a cell culture system (human skin fibroblasts and BHK-ABCA1) in order to determine the cellular sites of apoA-I binding and their localizations and the implication of ABCA1. We found that the majority of apoA-I was not associated with ABCA1 and, 2 thirds of this apoA-I bound to the plasma membrane. Then, a more detailed study examined the lipidation pathways of apoA-I either at plasma membrane (PM) level, or in the intracellular compartments (ICCs). We showed that the lipidation apoA-I occurs at the two levels (PM and ICCs) with two kinetically different pathways. Finally, we showed that the pre- $\beta$ -HDLs efflux (as efficiently as apoA-I) the cholesterol via the ABCA1 pathway. Taken together, these observations show that 1) the majority of apoA-I was found non-associated with ABCA1; 2) two thirds of apoA-I bind the plasma membrane; 3) the lipidation of the apoA-I occurs, in part at the plasma membrane and, in the other, by the retro-endocytosis pathway of the apoA-I/ABCA1 complexe.

Key words: cardiovascular, cholesterol, HDL, ABCA1, apolipoprotein A-I.

## **Table des matières**

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux et des figures	viii
Liste des abréviations	xii
Remerciement	xv
<b><u>Chapitre I : Introduction</u></b>	<b>1</b>
<b>A. Les connaissances actuelles</b>	<b>3</b>
I. Composition et métabolisme des lipoprotéines	3
I.1 Composition des lipoprotéines	3
I.2 Formation des chylomicrons	10
a) Synthèse	11
b) Dégradation	12
I.3 Lipoprotéines de très faible densité (VLDL)	13
a) Synthèse hépatique	13
b) Modification des VLDL circulantes	13
c) Apolipoprotéine B100	14
d) Biosynthèse du cholestérol	16
e) Formation du cholestérol estérifié	19
f) Les acides gras	19
g) La protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP)	19
I.4 Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)	20
I.5 Lipoprotéines de faible densité (LDL) et régulation périphérique	21

I.6 Lipoprotéines de haute densité (HDL)	22
I.6.1 Composition des HDL	22
a) Composition lipidique	22
b) Composition protéique	23
I.6.2 Caractéristiques physiques et chimiques des HDL	24
a) Densité	24
b) Taille et forme	24
c) Migration électrophorétique	25
d) Les pré $\beta$ -HDL	25
I.6.3 Métabolisme des HDL	27
a) Genèse des HDL	27
b) Catabolisme des HDL	28
I.6.4 Autres rôles des HDL	30
a) Rôle antioxydant	30
b) Rôle anti-inflammatoire	32
c) Rôle anti-apoptotique	35
d) Rôle anti-thrombotique	36
I.6.5 Les enzymes du métabolisme des HDL	36
a) Lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT)	37
b) Protéine de transfert du cholestéryl ester (CETP)	37
c) Protéine de Transfert des Phospholipides (PLTP)	38
d) Lipase hépatique (HL)	39
I.6.6 Récepteur vidangeur de type BI (SR-BI)	40
I.7 Apolipoprotéine A-I	41
I.7.1 Généralité	41
I.7.2 Les modèles structuraux de l'apoA-I	42
a) Modèle en super-hélice double des HDL naissantes	43
b) Modèle solar-flares des HDL discoïdales naissantes	44

II. La famille des ABC	47
II.1 Évolution et structure	47
II.2 Le transporteur « ATP-binding cassette A1 » (ABCA1)	51
II.2.1 Introduction	51
II.2.2 Régulation transcriptionnelle	53
II.2.3 Structure et régulation post-traductionnelle	57
a) Structure générale	57
b) Les domaines extracellulaires et intracellulaires	57
II.2.4 Déficience familiale en HDL et maladie de Tangier	60
II.3 Efflux du cholestérol et des phospholipides	60
II.4 Interaction ABCA1/apoA-I et voie d'endocytose	61
II.5 Autres ligands pour l'ABCA1	65
<b>B. Contribution de la thèse</b>	66
I. Le HCBS (High Capacity Binding Site)	66
II. La voie de retro-endocytose	68
III. Le pré $\beta$ -HDL	69
<b>C. Conclusion</b>	71
<b><u>Chapitre II : Énoncé du projet</u></b>	72
1. Introduction	72
2. Notre modèle d'étude	73
3. Questions posées	74
<b><u>Chapitre III : Article #1</u></b>	77
1. Contexte de travail	77



2. Article: « <i>Identification of an ABCA1-Dependent Phospholipid-Rich Plasma Membrane Apolipoprotein A-I Binding Site for Nascent HDL Formation: Implications for Current models of HDL Biogenesis</i> »	78
Abstract	79
Introduction	81
Materials and Methods	83
Results	88
Discussion	109
References	118
<b><u>Chapitre IV : Article #2</u></b>	123
1. Contexte de travail	123
2. Article: « <i>Quantitative Analysis of ABCA1-Dependent Compartmentalization and Trafficking of Apolipoprotein A-I: Implications For Determining Cellular Kinetics of Nascent HDL Biogenesis</i> »	124
Abstract	125
Introduction	127
Experimental procedures	129
Results	134
Discussion	155
References	164
<b><u>Chapitre V : Article #3</u></b>	170
1. Contexte de travail	170
2. Article: « <i>Structural Modification of Plasma HDL by Phospholipids Promotes Efficient ABCA1-mediated Cholesterol Release</i> »	171
Abstract	172
Introduction	174
Materials and Methods	176

Results	181
Discussion	196
References	202
<b><u>Chapitre VI : Discussion</u></b>	209
VI.1. Les sites de liaison cellulaire de l'apoA-1	209
VI.2. La voie de retro-endocytose de l'apoA-1 par l'ABCA1	212
VI.3. Le pré- $\beta$ -HDL	218
VI.4 Conclusions générales	220
<b>Bibliographie</b>	222

## Liste des tableaux et des figures

### Chapitre I

#### Liste des tableaux

Table 1 : Caractéristiques des différentes classes de lipoprotéines	6
Table 2 : Les protéines détectées dans les HDL et les HDL3	8
Table 3 : Transporteurs ABC connus	50

#### Liste des figures

Figure 1. A : Schéma de l'organisation générale d'une lipoprotéine	4
B : -Représentations des lipoprotéines et de leurs constituants	4
Figure 2. Aperçu global du métabolisme des lipoprotéines	9
Figure 3. Assemblage des VLDL	15
Figure 4. Le cycle du cholestérol	17
Figure 5. Étapes importantes dans la biosynthèse du cholestérol	18
Figure 6. Séparation des sous populations des HDL par électrophorèse en deux dimensions	27
Figure 7. Métabolisme des HDL	29
Figure 8. Modèle en super-hélice double des HDLs naissantes	45
Figure 9. Modèle <i>solar-flares</i> des HDLs discoïdales naissantes	46
Figure 10. Modèle actuel des transporteurs ABCA et ABCG	49
Figure 11. Projection en trois dimensions de la structure proposée du transporteur ABCB1 (Pgp)	51
Figure 12. Éléments de régulation des promoteurs d'ABCA1	56
Figure 13. Structure du transporteur ABCA1	58
Figure 14. Trois modèles de lipidation de l'apoA-I par l'ABCA1	63

## Chapitre III

### Liste des tableaux

Table.1: Binding parameters for interaction of lipid-free apoA-I and reconstituted HDL (rLpA-I) with ABCA1 and non-ABCA1 binding site (HCBS)	96
--	----

### Liste des figures

Figure 1: Lipid-free apoA-I binding to ABCA1 and non-ABCA1 binding sites determined by quantitative cross-linking and immunoprecipitation assay	91
Figure 2: ABCA1 expression promoted the formation of a non-ABCA1, apoA-I binding site	93
Figure 3: Effect of 22OH/9CRA and glyburide on the association of apoA-I to ABCA1 and non-ABCA1 binding site (HCBS)	95
Figure 4: Effect of apoA-I lipidation and deletion of the C-terminal domain of apoA-I on affinity binding to ABCA1 and non ABCA1 binding site (HCBS)	99
Figure 5: Distribution of apoA-I between plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICC) and effect of phospholipases treatment on the binding of apoA-I to the non-ABCA1 binding site (HCBS)	101
Figure 6: Localization of the HCBS to non-raft membrane domains	105
Figure 7: Disruption of the HCBS by PC-PLC treatment inhibited apoA-I-mediated cholesterol efflux and the formation of nascent apoA-I containing particles	108

## Chapitre IV

### Liste des tableaux

Table.1: Kinetics of apoA-I association and dissociation from the PM and ICCs in BHK cells and fibroblasts	140
--	-----

### Liste des figures

Figure 1: Development of a quantitative biotinylation assay to determine the distribution of apoA-I between the plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICCs)	136
Figure 2: ABCA1 expression promoted the association of apoA-I with the PM and ICCs	139
Figure 3: Effect of a C-terminal deletion of apoA-I and the lipidation of WT apoA-I on the compartmentalization of apoA-I between the PM and ICCs	142
Figure 4: Probucol (Prob) and cyclosporine A (CsA) inhibit the association of apoA-I with ICCs and promote the retention of ABCA1 at the PM	144
Figure 5: ApoA-I induces ABCA1 endocytosis	146-147
Figure 6: Kinetics of apoA-I dissociation from the PM and its re-secretion from ICCs.	151
Figure 7: Effect of phospholipases on the dissociation of apoA-I from the PM	154
Figure 8: A proposed two-compartment lipidation model for ABCA1-mediated nascent HDL genesis	162

## **Chapitre V**

### Liste des tableaux

Table.1: Levels of cholesterol, triglyceride and apolipoprotein in normolipidemic and ABCA1 deficiency subjects	185
---	-----

### Liste des figures

Figure 1: The effect of DMPC treatment on the relative concentrations of plasma apoA-I-containing HDL subpopulations	183
Figure 2: Ability of pre $\beta_1$ -LpA-I-like particles and native HDL <sub>3</sub> to interact with ABCA1	187

Figure 3: Concentration dependence of phospholipids and cholesterol efflux from J774 to DMPC-treated plasma	190
Figure 4: Effect of removal of plasma apoA-I-containing lipoproteins on DMPC-mediated [ <sup>3</sup> H] cholesterol efflux from cAMP-stimulated J774	193
Figure 5: The effect of preincubation of plasma from TD patients with DMPC-MLV on pre-β <sub>1</sub> -LpA-I level and [ <sup>3</sup> H] cholesterol efflux from cAMP-stimulated J774	194

### **Liste des abréviations utilisées dans cet ouvrage**

22OH : 22(R)-hydroxycholesterol

2D-PAGGE : two-dimensional polyacrylamide non-denaturing gradient gel electrophoresis

9CRA : 9-*cis* retinoic acid

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1

ACAT : acétyl:cholestérol acyltransférase

ACEH : acid cholesterol hydrolase

Apo : apolipoprotein

ATP: adenosine triphosphate

BSA : bovine serum albumin

BAC : bacterial artificial chromosome

BRET : bioluminescence resonance energy transfer

CAD: coronary artery disease

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CE : cholesteryl ester

CETP : cholesteryl ester transfer protein

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Chol : cholesterol

CIC: compartiment intracellulaire

DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine

DR : direct repeat

DSP : dithiobis(succinimidylpropionate)

DTNB : 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid

DTT : dithiothreitol

FBS : fetal bovine serum

FC : free cholesterol

FHD : familial HDL deficiency

FRET : fluorescence resonance energy transfer

GFP : green fluorescence protein  
HDL : high density lipoprotein; lipoprotéine de haute densité  
HDL-C : high density lipoprotein-cholesterol  
HL : hepatic lipase  
HMG-CoA : hydroxymethylglutaryl co-enzyme A  
HSF : human skin fibroblasts  
HSP : heat shock protein  
H-TGL : hepatic lipase  
ICC : intracellular compartments  
IDL : intermediate density lipoprotein; lipoprotéine de densité intermédiaire  
LCAT : lecithin:cholesterol acyltransferase  
LDL : low density lipoprotein; lipoprotéine de faible densité  
LDL-C : low density lipoprotein-cholesterol  
LDLR : LDL receptor  
LpA-I : nascent apoA-I-containing particle  
LPC : lysophosphatidylcholine  
LPDS : lipoprotein deficient serum  
LPL : lipoprotéine lipase  
LXR : liver X receptor  
MP: membrane plasmique  
MTP : microsomal triglyceride transfer protein  
NBF/NBD : nucleotide binding fold; nucleotide binding domain  
PC : phosphatidylcholine  
PC-PLC : phosphatidylcholine-specific phospholipase C  
PE : phosphatidylethanolamine  
PFO : perfluoro-octanoic acid  
PI : phosphatidylinositol  
PL : phospholipids  
PM : plasma membrane  
PMSF : phenylmethylsulfonide fluoride



POPC : palmitoyloleoylphosphatidylcholine

PPAR : peroxisome-proliferator activated receptor

PVDF : polyvinylidene fluoride

RCT : reverse cholesterol transport

r(LpA-I) : reconstituted HDL particles

RXR : retinoic X receptor

SDS-PAGGE: sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel  
electrophoresis

SM : sphingomyelin

SM-ase : sphingomyelinase

SR-BI : scavenger receptor class B type I

SRE : sterol response element

SREBP : SRE-binding protein

TAP : transporter associated with antigen protein

TD : Tangier disease

TG : triglycéride

TLC : thin layer chromatography

TM/TMD : transmembrane domain

UC : unesterified cholesterol

VLDL : very low density lipoprotein; lipoprotéine de très faible densité

## Remerciements

*En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ce formidable séjour au laboratoire.*

*Je tiens à remercier sincèrement Dr Jacques Genest, qui, en tant que directeur de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Mes meilleurs remerciements s'adressent au Dr Jean-Philippe Gratton pour sa codirection et ses précieux conseils.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Larbi Krimbou, associé de recherche dans le laboratoire du Dr Genest, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve et pour son énorme effort dans la supervision quotidienne et étroite.*

*J'exprime ma gratitude à tous les membres du laboratoire pour leur grande collaboration dans la réalisation de toutes les expériences.*

*Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.*

*Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma joyeuse et extraordinaire famille : ma femme Fatima Samhat et mes enfants Mayssa, Zeinab et Ali qui ont accepté avoir un mari et un père étudiant.*

*Merci à tous!!!*

## **Chapitre I**

### **Introduction**

L'athérosclérose est une pathologie majeure en santé publique. Dans le monde, et plus particulièrement dans les pays industrialisés, les deux premières causes de mortalité sont des complications de l'athérosclérose : les ischémies et les accidents vasculaires cérébraux. L'athérosclérose est définie par l'organisation mondiale de la santé comme «une association de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de dépôt calcaires avec remaniement de la media » [1].

Parmi les facteurs de risque de développement de maladies cardiovasculaires, le diabète, l'hypertension artérielle, l'obésité et le taux élevé de cholestérol représentent des paramètres métaboliques mesurables prédisposant au développement de la maladie [83]. L'étude de Framingham a démontré l'importance centrale des lipoprotéines sur le risque de développer la maladie cardiovasculaire [84]. Une forte corrélation entre le risque de développer la maladie et les lipoprotéines de faible densité (LDL) est montrée, tandis qu'une relation inverse a été observée avec les lipoprotéines de haute densité (HDL) [85].

Les lipides étant insolubles dans l'eau, leur transport dans un environnement aqueux comme le plasma sanguin est problématique. L'association de lipides non polaires, de lipides amphipathiques avec des protéines pour former des lipoprotéines miscibles dans l'eau permet de résoudre le problème du transport des graisses dans le sang [85].

Les lipoprotéines se divisent en cinq sous-classes majeures : les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les faibles lipoprotéines de faible densité (LDL), et les lipoprotéines de haute densité (HDL). ***La biogénèse des HDL par la voie d'ABCA1 représente la partie majeure à laquelle cette thèse est consacrée.***

La composition des lipoprotéines et la biogénèse de chaque sous-classe seront d'abord brièvement présentées. Ceci inclut la formation des particules HDL naissantes et la régulation de la molécule clé dans ce processus : l'*ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1). Les travaux pour élucider les voies de la biogénèse des HDL (au niveau cellulaire : extracellulaire versus intracellulaire) ainsi que le rôle des pré- $\beta$  HDL dans l'efflux du cholestérol seront présentés. Finalement, le travail va se clore sur une évaluation de la contribution à l'avancement des connaissances dans le cadre d'une discussion autocritique suggérant aussi de nouvelles avenues.

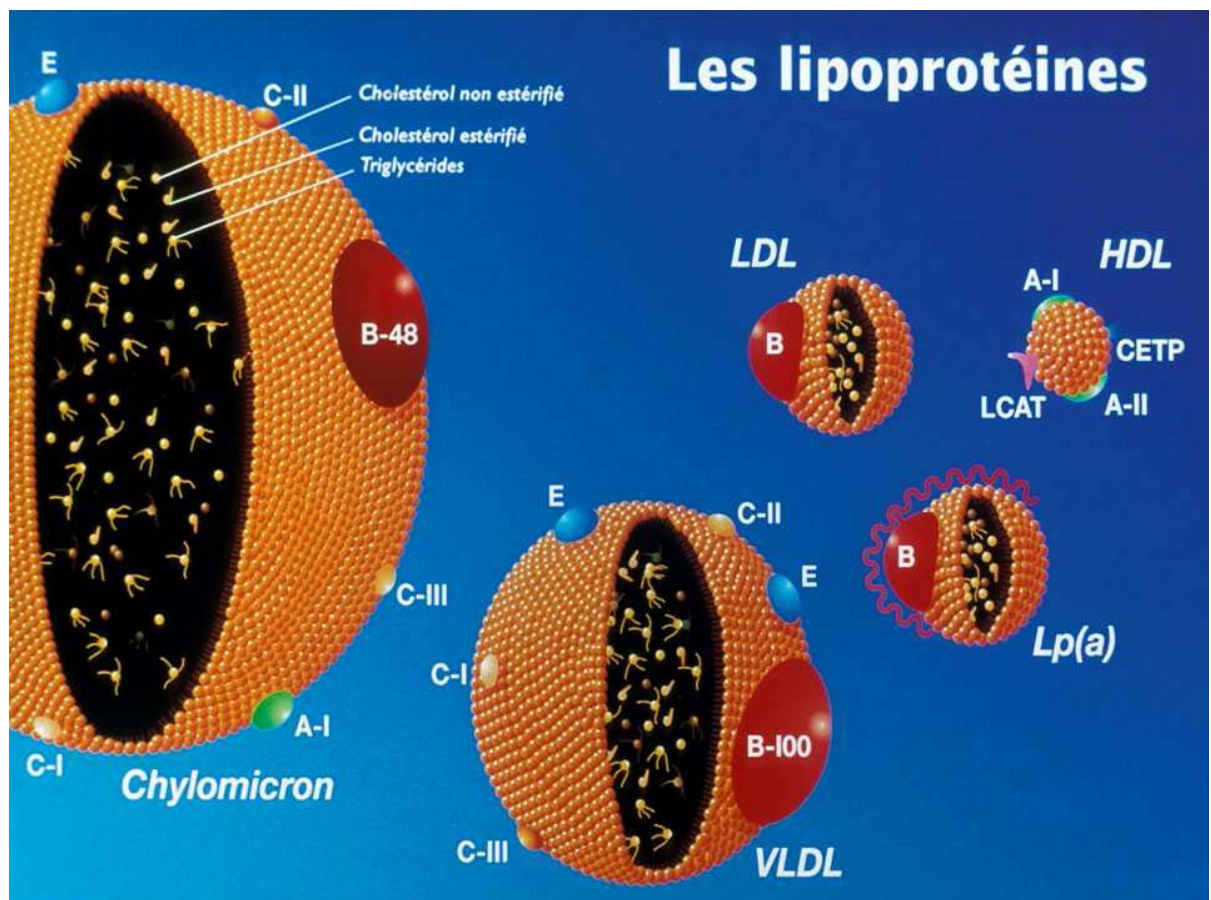
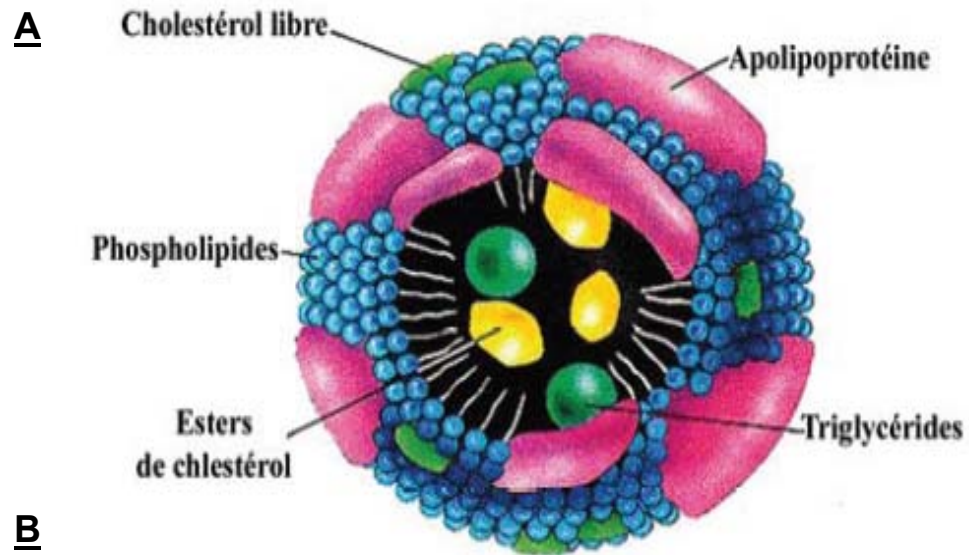
## **A- Les connaissances actuelles**

### **I. Composition et métabolisme des lipoprotéines**

#### **I.1 Composition des lipoprotéines**

Les principaux lipides transportés par les particules lipoprotéiques sont essentiellement les triacylglycérols et le cholestérol (libre ou/et estérifié). Ils proviennent soit de l'alimentation soit de la synthèse *de novo* dans l'organisme. Les lipides forment un cœur hydrophobe entouré de protéines (apolipoprotéines), phospholipides et de cholestérol, orientant leur partie polaire (hydrophile) vers la surface. Cette structure, rappelant celle des micelles, rend les lipoprotéines solubles dans le plasma. Les particules lipoprotéiques échangent en permanence entre elles leur contenu en triacylglycérols, cholestérols ou apoprotéines [86]. Les chylomicrons sont les particules les plus grosses en taille, les moins denses, les plus riches en lipides et les plus pauvres en apolipoprotéines. Les HDL sont, au contraire, les particules les plus denses et les plus petites en taille. Lorsqu'on va des chylomicrons aux HDL en passant successivement par les VLDL, IDL et LDL, leur taille et leur teneur en lipides diminuent alors que leur densité et leur proportion en apoprotéine augmentent. Les apoprotéines rencontrées dans les lipoprotéines fonctionnent comme des éléments de structuration ou même comme des effecteurs des lipoprotéines lipases [2]. Un schéma de la structure générale d'une lipoprotéine et une

représentation des différentes lipoprotéines et de leurs constituants sont montré à la figure 1.



**Figure 1. A-Schéma de l'organisation générale d'une lipoprotéine.** Les lipides neutres (triglycérides et ester de cholestérol) se retrouvent au centre de la particule. Les lipides possédant un moment dipolaire (cholestérol et phospholipides) ont face au milieu aqueux. Les apolipoprotéines sont des molécules amphiphiles s'accommodant dans la particule et servent de cofacteurs pour les enzymes plasmatiques ou de ligand pour l'interaction avec des récepteurs spécifiques. **B-Représentation des différentes lipoprotéines et de leurs constituants.** Les lipides, cholestérol et triglycérides, circulent dans le sang grâce à des transporteurs appelés lipoprotéines. Elles sont composées d'une couche externe hydrophile et d'un noyau central hydrophobe. Elles sont classées en fonction de leur taille et de leur densité (chylomicrons, VLDL, LDL, HDL). Différentes apoprotéines sont présentes à la surface des lipoprotéines et elles assurent une fonction de cohésion et une fonction métabolique car elles se fixent sur les récepteurs cellulaires ou sur les sites d'activation des enzymes du métabolisme des lipides [2].

La majeure constitution protéique des lipoprotéines est assurée par les apolipoprotéines (apo) qui sont des molécules amphiphiles. Leur composition en hélices alpha ou en feuillets bêta permet l'orientation des résidus chargés vers l'extérieur aqueux, tandis que les résidus hydrophobes sont orientés vers les lipides neutres (à l'intérieur). De cette façon, les interactions hydrophiles et hydrophobes sont renforcées. La nature amphiphile des apolipoprotéines les rend essentielles au transport plasmatique des corps gras, insolubles dans l'eau. Chacune de ces apolipoprotéines sert soit de cofacteur, soit de ligand pour un récepteur spécifique, permettant ainsi que chaque lipoprotéine assure le rôle qui lui est attribué [87].

Le contenu lipidique et protéique de la lipoprotéine détermine sa classe et sa fonction. Chaque classe de lipoprotéine, son lieu d'origine et sa composition sont détaillés à la table 1.

Lipoprotéines	Lipoprotéines de Basse Densité						HDL (Lipoprotéines de Haute Densité)			
	Chylomicrons	Remnants de chylomicron	VLDL	IDL	LDL	Lp(a)	HDL1	HDL2	HDL3	Pré-β-HDL
Densité (g.cm <sup>-3</sup> )	<0.95	<0.019	0.95-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.07	1.019-1.063	1.063-1.125	1.125-1.21	>1.21
Diamètre (nm)	90-1000	45-100	30-90	25-30	20-25	27-30	20-25	10-20	5-10	<5
Masse (kDa)	400000	400000-80000	10000-80000	5000-10000	2300	3600-4000	175-360			
Mobilité électrophorétique	origine		pré-β	pré-β lent	β	pré-β/β	α			pré-β
Sources	Intestin	Chylomicrons	Foie, intestin	VLDL	VLDL, IDL	Foie, LDL	Foie, intestin, VLDL, chylomicrons			
<b>COMPOSITION</b>										
Protéines (%)	1-2	6-8	7-10	11	21	29	32	33	57	70
Lipides totaux (%)	98-99	92-94	90-93	89	79	71	68	67	43	30
<b>COMPOSITION PROTEIQUES (% des protéines totales)</b>										
Apolipoprotéines majeures	A (10%): A1, A2, B48 (20%), C (66%): C1, C2, C3, D, E	A (10%): A1, A2, B48 (20%), C (66%): C1, C2, C3, D, E	A1 (10%), B100 (33%), C (50%): C1, C2, C3, E (5%)	B100 (33%), C (50%): C1, C2, C3, E (5%)	B100 (90%), C (5%), D, E	(a) (25-60%), B100 (40-75%)	A (15%): A1, A2, C (10%): C1, C2, C3, D (5%), E (70%)		A (75%): A1, A2, C (15%): C1, C2, C3, D (5%), E (5%)	
<b>COMPOSITION LIPIDIQUE (% des lipides totaux)</b>										
Triacylglycérol dans le noyau	88	80	56	29	13	14	2	16	13	0
Esters de cholestérol dans le noyau	3	4	15	34	48	48	34	31	29	0
Phospholipides en surface	8	11	20	26	28	22	53	43	46	83
Cholestérol libre en surface	1	4	8	9	10	10	11	10	6	17
Acides gras libres	0	1	1	1	1	6	0	0	6	0

Table 1. Caractéristiques des différentes classes de lipoprotéines [3], [4], [5]

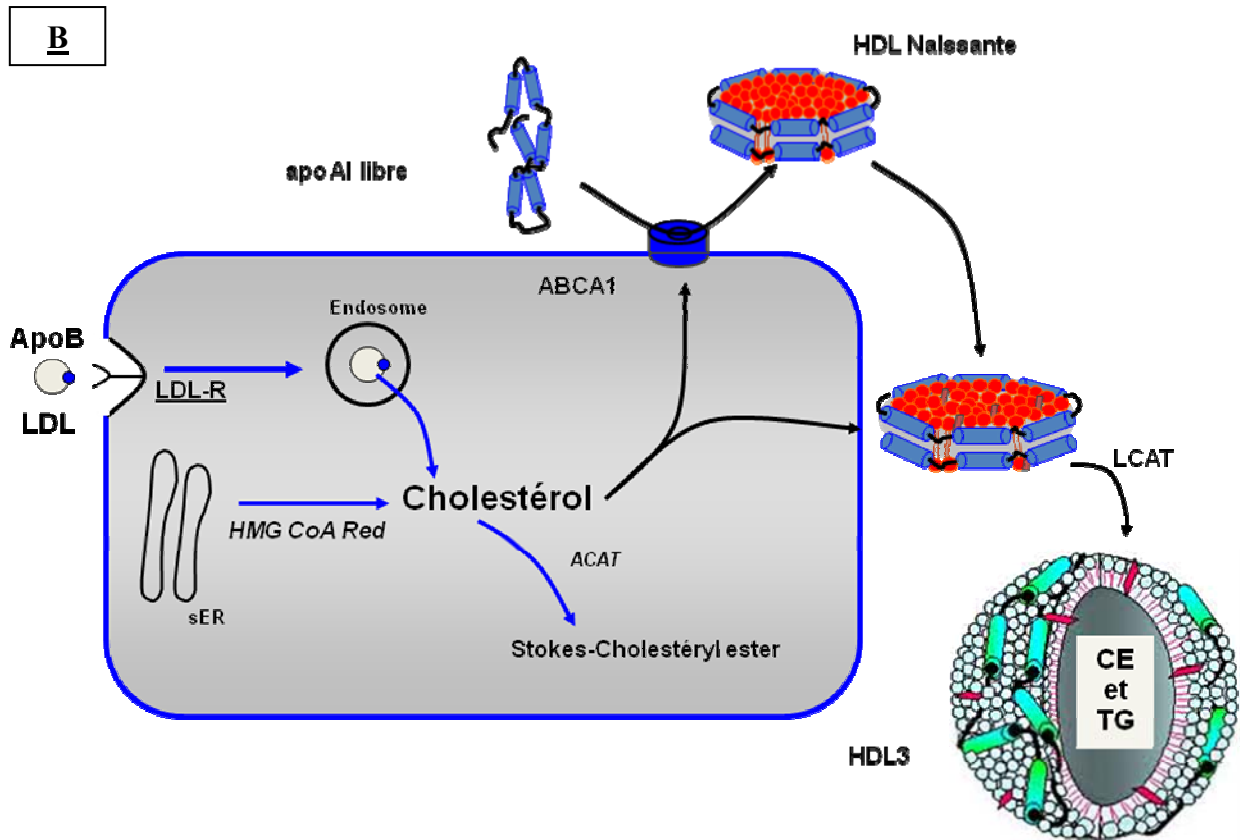
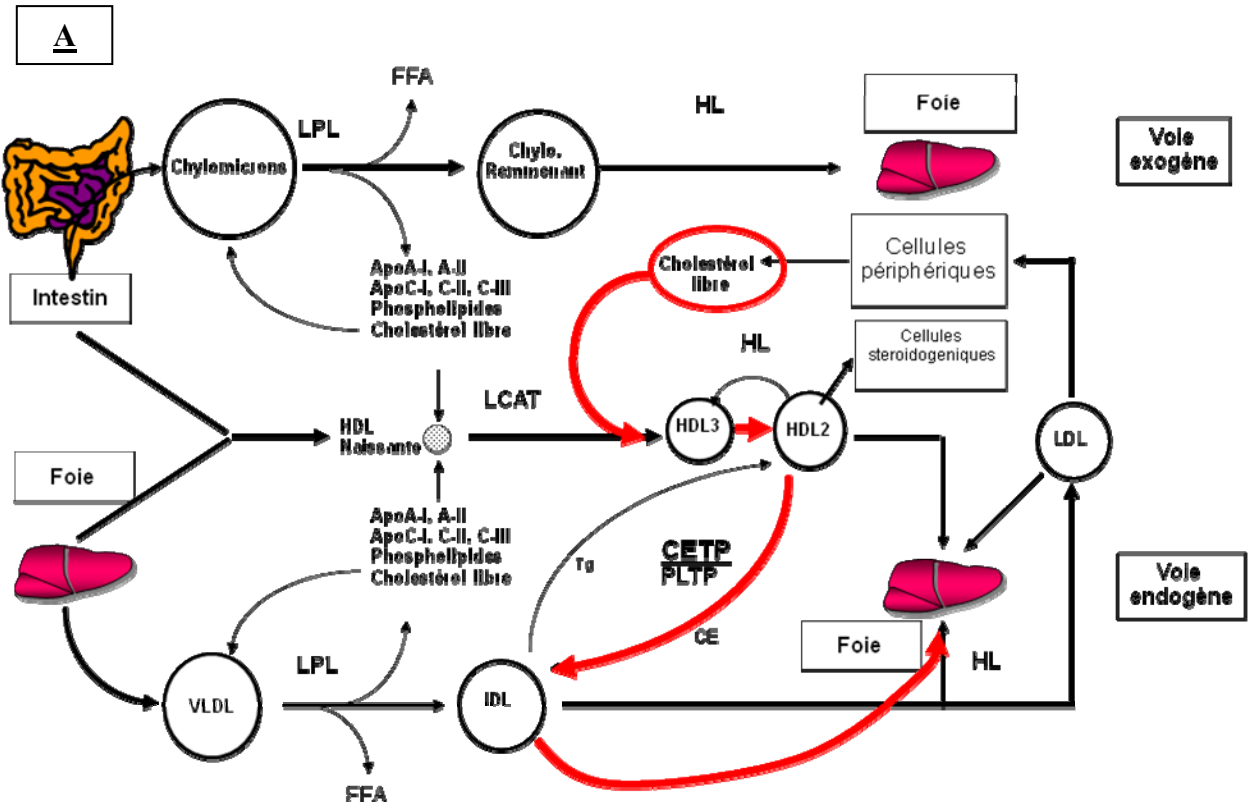


Des études analysant la composition des HDL, par des techniques de protéomique (*shotgun*), montrent une composition protéique inattendue [162]. Ils montrent un rôle anti-inflammatoire très intéressant et que, la composition protéique des HDL des sujets saints diffère de celle des sujets CAD. Il semble que ces derniers contiennent plus d'apoE. La table 2 représente la liste des protéines détectées dans les HDL et les HDL3 [162].

Trois voies métaboliques principales des niveaux de cholestérol sont généralement connues : la voie exogène, la voie endogène et le transport à rebours du cholestérol. Le cholestérol entre dans la circulation par l'alimentation par la voie exogène. Le cholestérol ingéré est micellisé par les acides biliaires et absorbé par l'intestin qui le secrète dans la circulation sous forme de chylomicrons vers le foie. La voie endogène représente le résultat du contrôle de la formation des VLDL/IDL/LDL par le foie qui contrôle aussi le transport à rebours du cholestérol (« *reverse cholesterol transport* ») par les HDL. Dans le plasma, toutes ces particules peuvent interagir et échanger une partie de leur contenu à l'aide des enzymes plasmatiques (en majorité des lipases). Un schéma donnant un aperçu général du métabolisme des lipoprotéines est montré à la figure 2.

Protein ID	Protein name <sup>B</sup>	Unique peptides <sup>A</sup>	
		HDL	HDL <sub>3</sub>
<b>Previously identified HDL-associated proteins<sup>B</sup></b>			
IPI00021841	apoA-I	1,013	847
IPI00021854	apoA-II	342	229
IPI00304273	apoA-IV	139	131
IPI00021842	apoE	180	158
IPI00021855	apoC-I	74	108
IPI00021856	apoC-II	101	90
IPI00021857	apoC-III	105	110
IPI00022731	apoC-IV	–	15
IPI00177869	apoL-I	63	44
IPI00030739	apoM	74	94
IPI00299435	apoF	40	36
IPI00006662	apoD	70	159
IPI00298828	apoH	82	5
IPI00291262	Clusterin (apoJ)	48	12
IPI00022331	Lecithin-cholesterol acyltransferase	61	38
IPI00006173	CETP	–	4
IPI00022733	Phospholipid transfer protein	28	5
IPI00022368	SAA	–	36
IPI00452748	SAA1	60	7
IPI00006146	SAA2	32	23
IPI00019399	SAA4	124	130
IPI00218732	PON 1	119	35
IPI00299778	PON3	31	–
IPI00164623	Complement component C3	18	14
IPI00020091	$\alpha$ -1-acid glycoprotein 2	–	4
IPI00022431	$\alpha$ -2-HS-glycoprotein	59	22
IPI00305457	$\alpha$ -1-antitrypsin	191	180
IPI00022895	$\alpha$ -1B-glycoprotein	17	17
IPI00021885	Fibrinogen ( $\alpha$ chain)	32	–
IPI00022463	Serotransferrin	10	–
IPI00296170	Haptoglobin-related protein	39	18
IPI00022432	Transthyretin	71	–
IPI00298853	Vitamin D-binding protein	65	–
IPI00022229	apoB-100	58	9
IPI00022434	Serum albumin	689	457
<b>Proteins identified in this study as HDL associated</b>			
IPI00418163	Complement component C4B	–	5
IPI00032258	Complement component C4A	40	13
IPI00022395	Complement component C9	30	–
IPI00298971	Vitronectin	42	18
IPI00029863	$\alpha$ -2-antiplasmin	–	4
IPI00022426	$\alpha$ -1-microglobulin/bikunin	21	–
IPI00218192	Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain H4	31	–
IPI00032220	Angiotensinogen	–	6
IPI00006114	Serpin peptidase inhibitor (clade F, member 1)	15	–
IPI00032328	Kininogen-1	15	–
IPI00022420	Plasma retinol-binding protein	19	–
IPI00337558	Preylcysteine oxidase	34	–
IPI00022488	Hemopexin	15	–

**Table 2. Les protéines détectées dans les HDL et les HDL3**



**Figure 2. Aperçu global du métabolisme des lipoprotéines.** Dans la voie exogène (A), l'intestin transfère les lipides de la diète micellisés par les acides biliaires dans la circulation sous forme de chylomicrons. Ces particules contiennent l'apoB48 et sont enrichies en triglycérides (TG) et en cholestérol estérifié (CE). Leur enveloppe contient aussi des phospholipides (PL) et du cholestérol libre (chol). Les triglycérides sont le substrat de la lipoprotéine lipase (LPL) qui en fait des résidus (*Remmenant*) captés par le foie via les récepteurs LDL et LRP. Dans la voie endogène (A), le foie produit lui aussi des particules riches en TG et en CE mais contenant l'apoB100 : les VLDL. La LPL, la PLTP (protéine de transfert des phospholipides) et la protéine de transfert du cholestéryl ester (CETP) modifient ces lipoprotéines pour en faire des IDL. Celles-ci sont subséquentement transformées en LDL, le cargo fournissant le cholestérol aux tissus périphériques (extra-hépatiques). Ces derniers (B) se débarrassent de l'excès de cholestérol par l'efflux via l'ABCA1 qui transfère des phospholipides et du cholestérol sur l'apoA-I pour former une particule pré- $\beta$  discoïdale. Ceci initie le processus de transport du cholestérol à rebours. Suivant la réaction de la lécithine: cholestérol acyle-transférase (LCAT), la particule de HDL naissante (pré- $\beta$ ) devient plus sphérique et enrichie en CE (HDL3). Le CE est échangé (transfert équimolaire) pour des TG par la protéine de transfert du cholestéryl ester (CETP) pour former les HDL2 matures qui sont captées au foie par le récepteur vidangeur de type B1 (SR-BI). Ceci permet de transférer sélectivement le CE vers le foie, tandis que la lipase hépatique (HL) hydrolyse les TG.

## **I.2 Formation des chylomicrons**

Les chylomicrons sont formés dans les cellules intestinales par l'assemblage des triacylgycérols, cholestérol libre ou estérifié et des apolipoprotéines spécifiques.

### *a) Synthèse*

Les chylomicrons contiennent plusieurs apoprotéines. L'Apolipoprotéine B-48 (apoB-48) est obtenue à partir de la traduction du gène apoB. Elle est ainsi désignée parce qu'elle contient 48% de la partie N-terminale de la protéine codée par le gène ApoB. On y rencontre aussi les apoprotéines A, C et E.

Les triacylglycérols sont d'origine alimentaire après absorption sous forme de 2 monoacylglycérols et d'acides gras libres. Ces derniers sont recombinaés en triacylglycérols dans le réticulum endoplasmique des cellules de la muqueuse intestinale, après activation des acides gras par l'acyle-CoA synthétase. Dans les mêmes cellules on trouve des séquences de réactions de trançylation permettant la ré-synthèse des phospholipides et des esters de cholestérol [88].

La synthèse des apolipoprotéines commence dans le réticulum endoplasmique rugueux. Pendant leur transfert vers l'appareil de Golgi, elles sont glycosylées et associées aux lipides ré-synthétisés grâce aux enzymes du réticulum endoplasmique lisse. Les particules résultantes sont empaquetées dans des vésicules sécrétoires, libérées dans le plasma par exocytose. Elles constituent les chylomicrons natifs ou naissants qui vont subir une maturation par l'adjonction d'autres apolipoprotéines. Les chylomicrons natifs excrétés ne contiennent que l'apolipoprotéine B-48 (ApoB-48).

Ils commencent leur maturation dès leur arrivée dans le plasma en recevant les apoprotéines E (ApoE) et C (ApoC). Le couple ApoB-48 et ApoE est indispensable pour la reconnaissance des chylomicrons par les récepteurs

hépatiques. Les apolipoprotéines C (incluant l'apoC-II) se comportent comme des activatrices de la lipoprotéine lipase qui hydrolyse les triglycérides des chylomicrons. La source de ces apolipoprotéines est les HDL circulantes [89].

#### *b) Dégradation*

Les chylomicrons sont transportés dans la circulation sanguine vers les tissus périphériques ou utilisateurs : tissu adipeux, muscles striés, muscle cardiaque, etc. A la surface des capillaires alimentant ces tissus, prédomine une lipoprotéine lipase, activée par l'apoC-II des lipoprotéines. Les triacylglycérols sont alors hydrolysés en acides gras et 2- monoacylglycérol qui sont absorbés par le tissu. Enfin le 2-monoacylglycérol est coupé en acide gras et glycérol sous l'action d'une lipase intracellulaire. Les acides gras sont récupérés par le tissu et le glycérol retourne par la voie sanguine au foie [88].

Les chylomicrons débarrassés de leurs triacylglycérols se rétrécissent et deviennent plus denses. Leur contenu en apoprotéines C (ApoC) est récupéré par les HDL. Les résidus ainsi obtenus sont appelés « reliquats » de chylomicrons. Ces derniers sont retirés de la circulation par le foie grâce aux récepteurs qui reconnaissent le couple ApoB-48 et ApoE qu'ils contiennent. Ils rentrent par endocytose et sont hydrolysés par les lysosomes pour libérer les acides aminés des apoprotéines, le cholestérol libre et des esters de cholestérol. Le cholestérol va avoir un effet régulateur sur la synthèse du cholestérol

endogène en réduisant le niveau de 3-Hydroxyle 3-méthylglutaryl-COA réductase et en se comportant comme un inhibiteur de cette enzyme [89].

### **I.3 Lipoprotéines de très faible densité (VLDL)**

#### *a) Synthèse hépatique*

Les lipoprotéines à très faible densité sont synthétisées dans le foie. Elles proviennent de l'assemblage de triacylglycérols, des différentes formes de cholestérol, de l'ApoB-100 et de l'ApoA-I. Comme les chylomicrons, leur fonction est d'apporter les triacylglycérols aux tissus périphériques. Pour remplir ce rôle il leur faut se combiner à la sortie du foie, dans le plasma, à l'ApoE nécessaire à leur reconnaissance par les récepteurs de ces tissus périphériques et à l'ApoC-II pour l'activation de la lipoprotéine lipase. Les deux apoE et C-II ont été fournis par les HDL circulantes [118 ,119].

#### *b) Modification des VLDL circulantes*

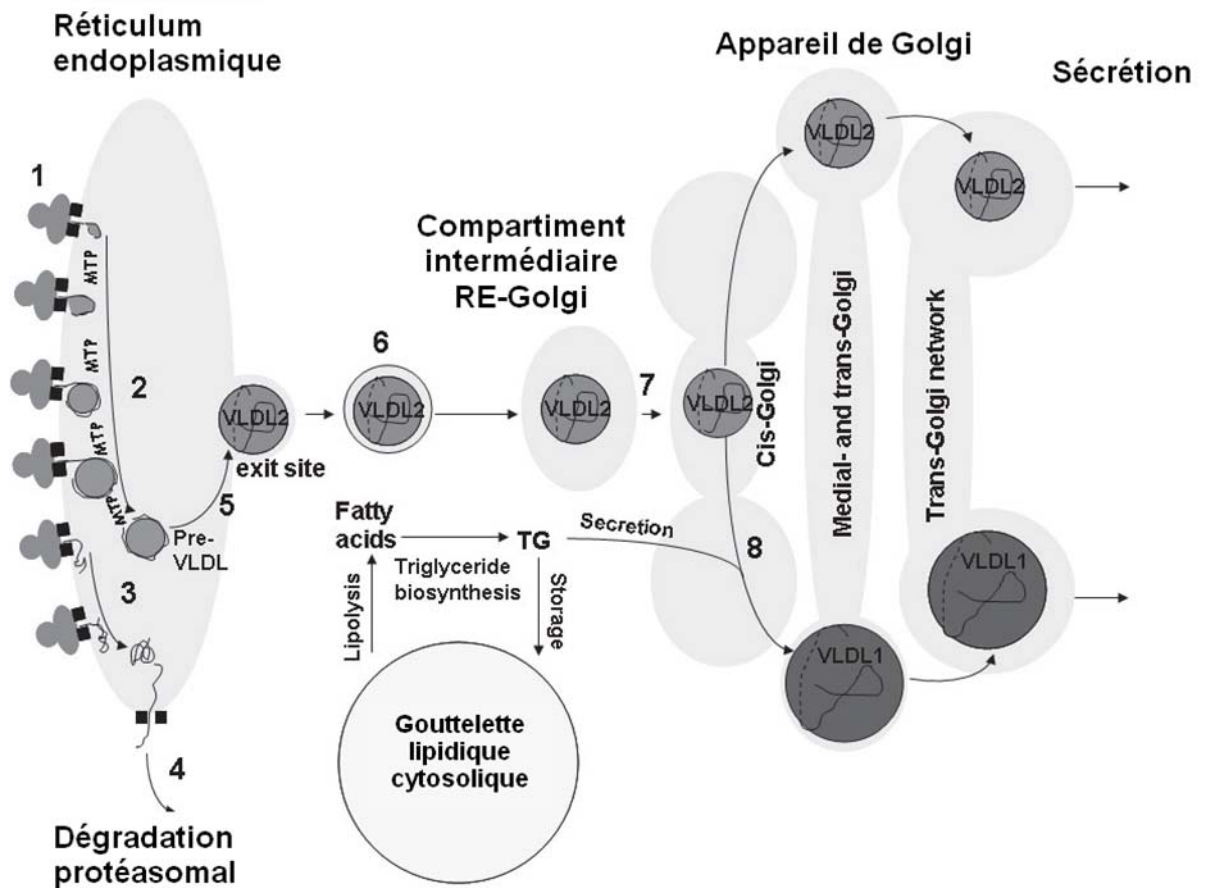
Au cours de leur séjour dans la circulation sanguine, les VLDL perdent au contact des tissus une partie de leurs triacylglycérols. Elles diminuent en taille mais deviennent plus denses. Les ApoC et ApoE retournent aux HDL. Un dernier inter-échange se produit entre les VLDL et les HDL. Les HDL récupèrent de façon concomitante des triacylglycérols et des phospholipides des VLDL alors que ces dernières s'enrichissent en esters de cholestérols provenant des

HDL. L'agent de transfert est la protéine de transfert des esters de cholestérol [118, 119].

*c) Apolipoprotéine B100*

L'apolipoprotéine B100 (apoB) est une protéine amphipatique de grande taille qui lie les lipides. Elle est synthétisée dans les hépatocytes et utilisée pour assembler et stabiliser les VLDL. Elle peut être issue à travers l'évolution d'autres protéines associées aux lipides comme la protéine microsomale de transfert des triglycérides ou la vitellogénine. Le repliement adéquat de l'apoB requiert l'aide de protéines chaperons lors de l'ajout de lipides simultanément à la traduction, de la formation de liaisons disulfure et de la glycosylation. Tout défaut dans l'accomplissement de ces processus résulte en un ciblage co-traductionnel de l'apoB mal repliée vers la voie de dégradation par le protéasome (figure 3) [168]. En fait, une grande partie de la régulation de la production d'apoB s'effectue par l'intermédiaire de la dégradation. L'apoB mal repliée après la traduction, par exemple à cause d'un stress oxydatif, peut être éliminée par autophagie [120].





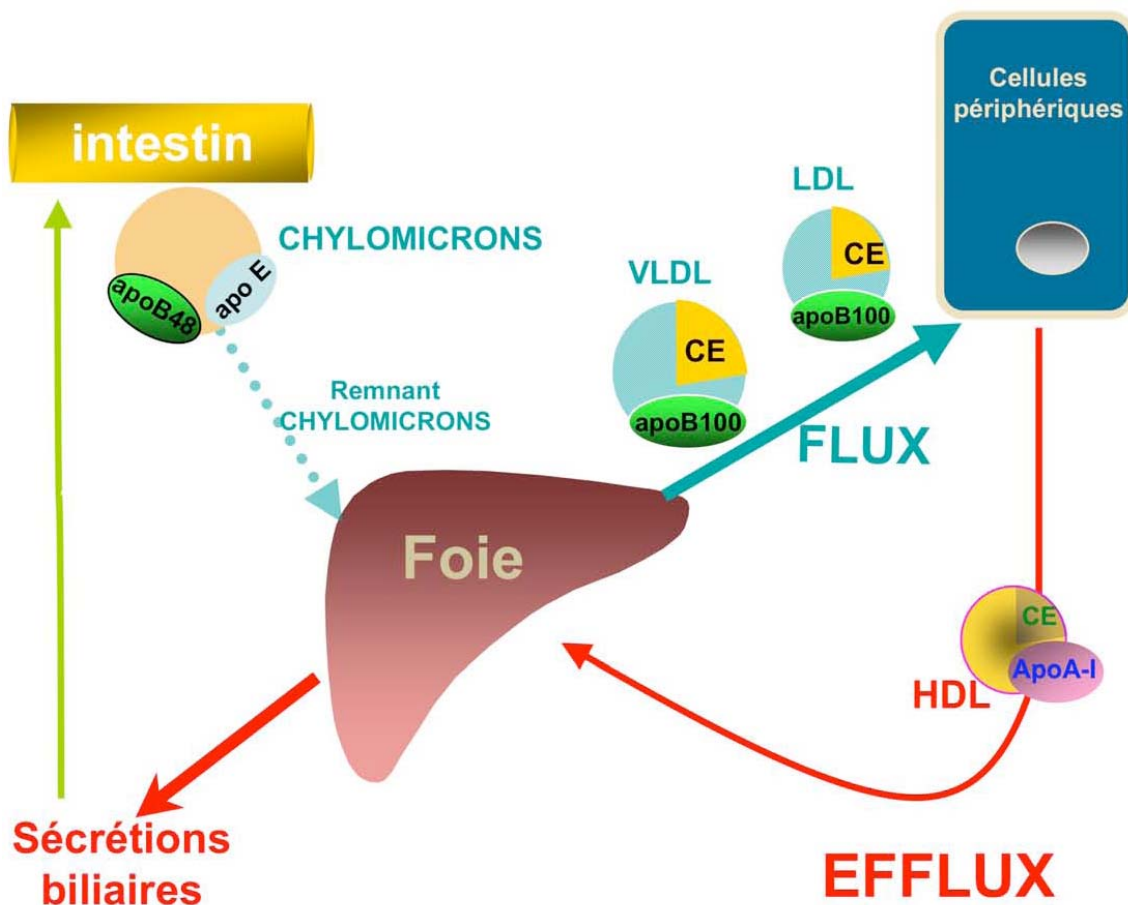
**Figure 3. L'assemblage des VLDL.** Au cours de sa biosynthèse, apoB100 (1) est transportée à la lumière du réticulum endoplasmique et elle est lipidée par MTP pour former une particule de pré-VLDL (2). Le Pré-VLDL est en outre lipidé pour former le VLDL2 (5). Par ailleurs, les pré-VLDL et les apoB100 mal repliés (3) peuvent être conservés et dégradé dans la cellule (4). Le VLDL2 est transféré à l'appareil de Golgi (6, 7) et est sécrétée ou encore lipidé pour former le VLDL1 (8). Les acides gras sont libérés à partir des gouttelettes de lipides cytosoliques et sont utilisés pour la formation des triglycérides, qui sont assemblés en VLDL (8) [168].

#### d) Biosynthèse du cholestérol

Le cholestérol existe, principalement, de manière stable sous deux formes : une forme libre et une forme estérifiée où la fonction hydroxyle est estérifiée par un acide gras. Le cholestérol libre est un constituant majeur des membranes cellulaires et intervient dans différentes voies de signalisation, alors que le cholestérol estérifié est davantage une forme de stockage pour la cellule.

Les cellules des mammifères possèdent toutes les enzymes nécessaires à la synthèse *de novo* du cholestérol. Le foie et l'intestin sont les lieux principaux de la synthèse du cholestérol mais les cellules périphériques, notamment les macrophages, synthétisent également une partie de leur cholestérol [121]. Le cycle du cholestérol est illustré dans la figure 4.

Le cholestérol est synthétisé dans le réticulum endoplasmique à partir d'acétate et *via* une série d'environ 30 réactions enzymatiques successives. Une étape importante en raison de son ciblage pharmacologique par les statines fait intervenir l'enzyme hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase qui génère du mévalonate. A partir du dernier, la cellule synthétise de l'isopentényl pyrophosphate puis du farnésyl pyrophosphate et enfin du squalène (figure 5). La première molécule de stérol produite dans cette voie de biosynthèse est le lanostérol, formé à partir du squalène par la squalène cyclase. Le lanostérol est ensuite converti en cholestérol lors d'un processus complexe de 19 étapes au cours desquelles les doubles liaisons sont réduites, leurs positions modifiées et les groupements méthyles supprimés [121].



**Figure 4. Le cycle du cholestérol.** Le foie est au centre de l'homéostasie du cholestérol. Il centralise le cholestérol d'origine alimentaire et assure la majorité de la synthèse endogène. Il dirige aussi sa distribution à l'organisme sécrétant des VLDL dans la circulation sanguine, mûries rapidement en LDL. L'équilibre en cholestérol des tissus est maintenu grâce à un transport retour assuré par les HDL, qui ramène le cholestérol des cellules périphériques vers le foie. Il sera alors excrété dans la bile soit sous forme libre soit sous forme d'acides biliaires après transformation, et ensuite déversé dans l'intestin.

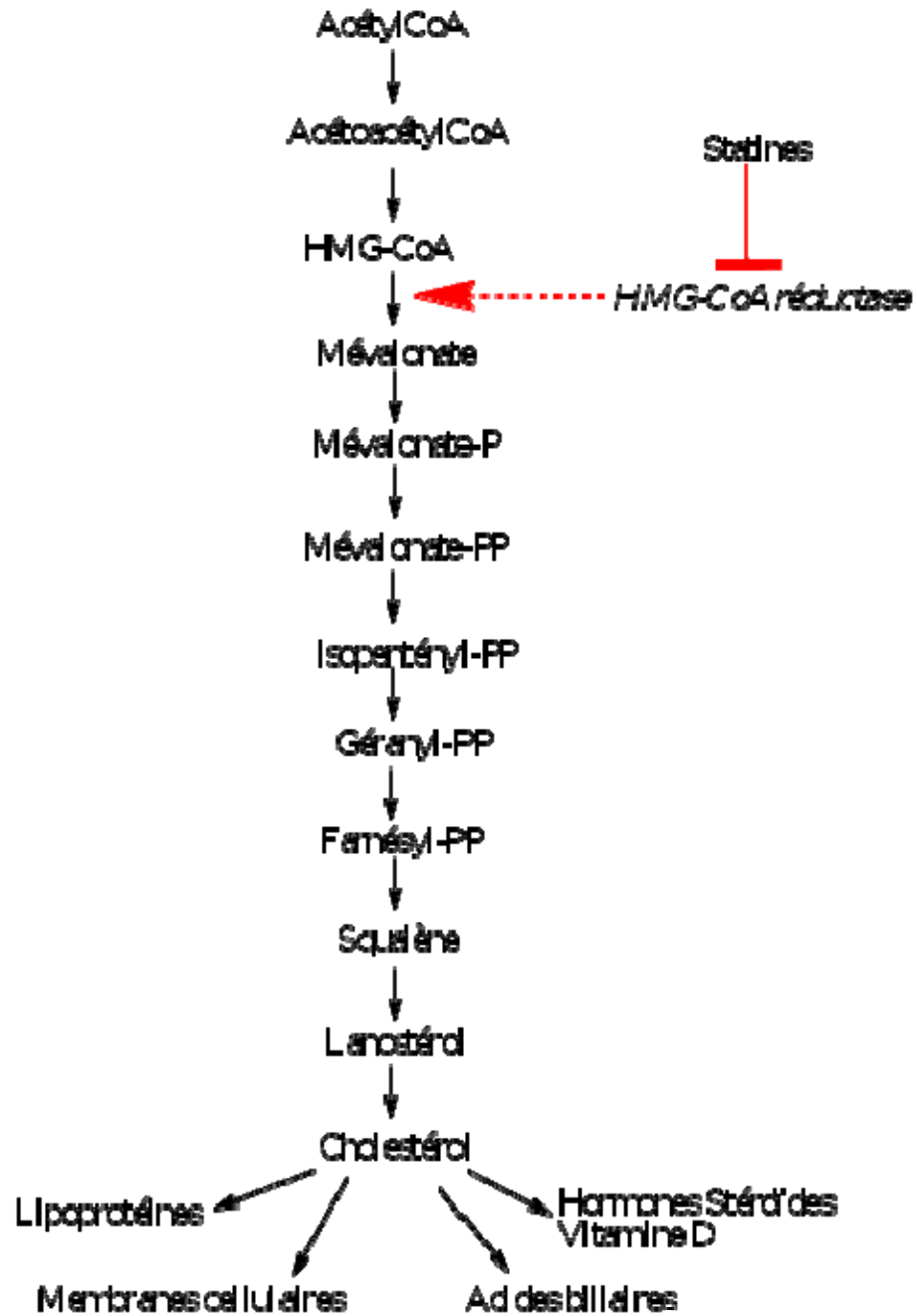


Figure 5. Étapes importantes dans la biosynthèse du cholestérol. D'après [121].

*e) Formation du cholestérol estérifié*

Dans la cellule, la fonction –OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras par l'action de l'ACAT (acyl-CoA : cholestérol acyltransférase). Chez les macrophages, cette enzyme est localisée dans le réticulum endoplasmique où elle catalyse l'estérification du cholestérol provenant de différentes origines. L'activité de l'ACAT est régulée de manière allostérique par le cholestérol, c'est à dire que son activité augmente en présence de grandes quantités de cholestérol libre. De plus, il a été montré que lorsque la quantité de cholestérol atteint un certain seuil, l'activité ACAT augmente dramatiquement et participe à l'évolution des macrophages en cellules spumeuses. Ainsi, l'ACAT produit des esters de cholestérol qui sont stockés dans des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques [94].

*f) Les acides gras*

Ils sont les précurseurs de phospholipides et de triglycérides essentiels à la production des VLDL. Leur nature influence l'emballage des VLDL. En présence d'acides gras polyinsaturés en position oméga-3 et en oméga-6, la quantité de VLDL sécrétés diminue [95] et l'emballage des VLDL est modifié, ce qui redirige les VLDL vers le lysosome pour dégradation [96].

*g) La protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP)*

La MTP est une protéine intracellulaire de transfert des lipides (préférentiellement esters de cholestérol et triglycérides) qui stabilise

l'apolipoprotéine B à un stade précoce lors de son entrée dans la lumière du réticulum endoplasmique. Chez les sujets souffrant d'abêtalipoprotéinémie, ainsi que chez les souris génétiquement modifiées MTP  $-/-$ , le déficit en MTP se caractérise par une malabsorption sévère des graisses, associée à l'absence quasi complète de chylomicrons et de VLDL plasmatiques. L'inhibition de la MTP par « knock-out » ou par inhibition pharmacologique diminue les interactions de l'apoB avec les lipides amphipatiques, augmentant les interactions avec l'HSP70 qui la dirige vers la dégradation protéosomique [120], [97].

#### **I.4 Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)**

Les IDL sont des lipoprotéines responsables du transport de molécules de cholestérol, libre ou estérifié, et de triglycérides, dans le sang. Ce sont des résidus de VLDL ayant perdu leur apolipoprotéine C. Par rapport à ceux-ci, ils possèdent 90% de triglycérides en moins et leur taille est beaucoup plus petite. 50% des IDL sont captés par les hépatocytes grâce aux récepteurs des LDL (récepteurs des apolipoprotéines apoB-100 et E). L'autre moitié devient des LDL, par perte de l'apoE. 70% de ces LDL retournent au foie, tandis que les 30% sont digérés dans les lysosomes cellulaires pour la distribution du cholestérol aux cellules périphériques. Ils peuvent se former à partir de VLDL dont ils constituent des résidus ayant perdu leur apolipoprotéine C [96].

### **I.5 Lipoprotéines de faible densité (LDL) et régulation périphérique**

Contrairement aux chylomicrons et aux VLDL, les LDL transportent principalement du cholestérol aux tissus. Les LDL sont constituées principalement d'une seule molécule d'Apolipoprotéine B qui prend une conformation en extension recouvrant au moins la moitié de la surface de la particule. Le cœur lipidique est riche en ester de cholestérol et contient la majorité du cholestérol circulant. Cette lipoprotéine résulte d'un traitement hépatique des remmenant, ou restes, de VLDL [101]. Ces lipoprotéines de basses densités transportent les lipides du foie aux tissus pour assurer leur approvisionnement. Les cellules des tissus captent le cholestérol exogène par l'endocytose des particules de LDL. La particule de LDL est d'abord séquestrée par un récepteur au LDL (LDLR) qui se lie à l'apoB-100. Ces récepteurs s'agglomèrent dans des puits tapissés de clathrine destinés à l'endocytose. Après invagination, les puits vont former des vésicules qui vont fusionner avec des lysosomes. Les LDL vont être ainsi dégradées en acides aminés, cholestérol et acides gras disponibles pour la cellule (figure 4) [98], [99].

La structure des lipoprotéines associées à l'apoB est essentiellement déterminée par cette dernière. Des travaux de calorimétrie et de diffraction de rayon X ainsi que des études en microscopie électronique ont permis d'indiquer que l'Apo B est située en surface d'une particule de lipoprotéine sphéroïdale et qu'elle en recouvre la moitié. L'Apo B formerait une sorte de poche ouverte contenant les lipides. [122]. Le cholestérol réparti dans les reliquats des

Chylomicrons, les LDL et les HDL renseignent sur le niveau du cholestérol dans l'organisme. Ses effets sont multiples :

- Il inhibe l'activité de la 3-hydroxy 3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase, point de départ de la synthèse de novo du cholestérol.
- Si le cholestérol n'est pas utilisé et s'accumule, il active une acyltransférase (ACAT). Les esters de cholestérol, ainsi formés, sont stockés dans les cellules.
- L'excès du cholestérol inhibe aussi la transcription des gènes des récepteurs des LDL, réduisant ainsi leur nombre et la capture des LDL et donc l'approvisionnement des cellules en cholestérol [118].

## **I.6 Lipoprotéines de haute densité (HDL)**

Le rôle principal des HDL est le transport à rebours du cholestérol de la périphérie (le macrophage par exemple) vers le foie. Toutefois, les HDL possèdent plusieurs autres fonctions biologiques tout aussi importantes: transport du cholestérol vers les surrénales (synthèse des hormones), rôle anti-inflammatoire, rôle antioxydant, rôle anti-thrombotique, rôle dans la stabilisation de la fonction endothéliale et rôle anti-apoptotique. [8], [15].

### **I.6.1 Composition des HDL**

#### *a) Composition lipidique*

Les HDL sont des lipoprotéines riches en phospholipides (~25% du poids) et en cholestérol estérifié (~20% du poids). Ce sont les lipoprotéines qui possèdent la



proportion la plus faible en triglycérides (~5% du poids) et la plus élevée de protéines (~50% du poids) [7].

#### *b) Composition protéique*

Aucune apolipoprotéine n'est propre aux HDL. Ainsi, l'apoA-I se retrouve principalement au niveau des HDL mais aussi de manière mineure au niveau des chylomicrons. Les apoA-I (70%) et A-II (20%) sont les composantes protéiques majeures des HDL et constituent environ 90% de la masse protéique des HDL [7]. Les apoA-I et A-II jouent tous deux un rôle important dans la structure des HDL mais ont aussi d'autres fonctions essentielles telle que l'activation de la LCAT (apoA-I) et de la lipase hépatique (apoA-II). Il existe deux principaux types de particules de HDL selon leur contenu en apolipoprotéines: celles qui contiennent l'apoA-I mais pas l'apoA-II (LpA-I) et celles qui contiennent ces deux apolipoprotéines (LpA-I : A-II). Les LpA-I représentent environ un tiers des HDL tandis que les LpA-I : A-II représentent les deux tiers restants. La concentration de LpA-I semblerait être un meilleur indicateur de protection cardiovasculaire que la concentration de LpA-I : A-II [8].

L'apoE, l'apoA-IV et l'apoC sont des composantes mineures des HDL. Elles proviennent de la dégradation des lipoprotéines riches en triglycérides. Les HDL vont également transporter d'autres protéines telles que l'apoJ, l'apoM, la CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein), la LCAT (Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase), la PLTP (Phospholipid Transfer Protein) et la paraoxonase [9].

### I.6.2 Caractéristiques physiques et chimiques des HDL

Les HDL sont un groupe très hétérogène de lipoprotéines qui peuvent être subdivisées en sous-populations. Il existe plusieurs méthodes de classification des HDL, soit par leur composition en apolipoprotéines, leur densité, leur taille et leur forme ou par leur migration électrophorétique.

#### *a) Densité*

Les HDL sont les lipoprotéines ayant la plus haute densité à cause de leur faible concentration en triglycérides et leur haute concentration en apolipoprotéines. Dans le plasma de sujets normo lipidiques, les HDL flottent à une densité entre 1.063 – 1.210 g/ml lors d'une ultracentrifugation sur gradient de densité. Les HDL peuvent être davantage subdivisées en HDL2 (densité de 1,063 – 1,125 g/ml) et en HDL3 (densité de 1,125 – 1,21 g/ml) [6]. La concentration de HDL2 serait un meilleur indicateur de risque cardiovasculaire que la concentration de HDL3.

#### *b) Taille et forme*

Les HDL sont les plus petites lipoprotéines et ont un diamètre de 50-100 Å. Elles sont subdivisées en : HDL2b (100 Å), HDL2a (90 Å), HDL3a (85 Å), HDL3b (80 Å) et HDL3c (75 Å). Les HDL naissantes ont la forme de particules discoïdales arrangées en bicouche de phospholipides et de cholestérol non estérifié, encerclées par l'apoA-I. Les HDL matures sont de forme sphérique classique [8].

### *c) Migration électrophorétique*

Lors de la séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur un gel d'agarose, les HDL sphériques vont migrer en position  $\alpha$  à cause de leur charge et les HDL immatures discoïdales vont migrer en position pré- $\beta$ . Certains HDL riches en apoE vont migrer en position  $\gamma$  avec les gammaglobulines. Une séparation plus fine des HDL peut être effectuée par électrophorèse en deux dimensions.

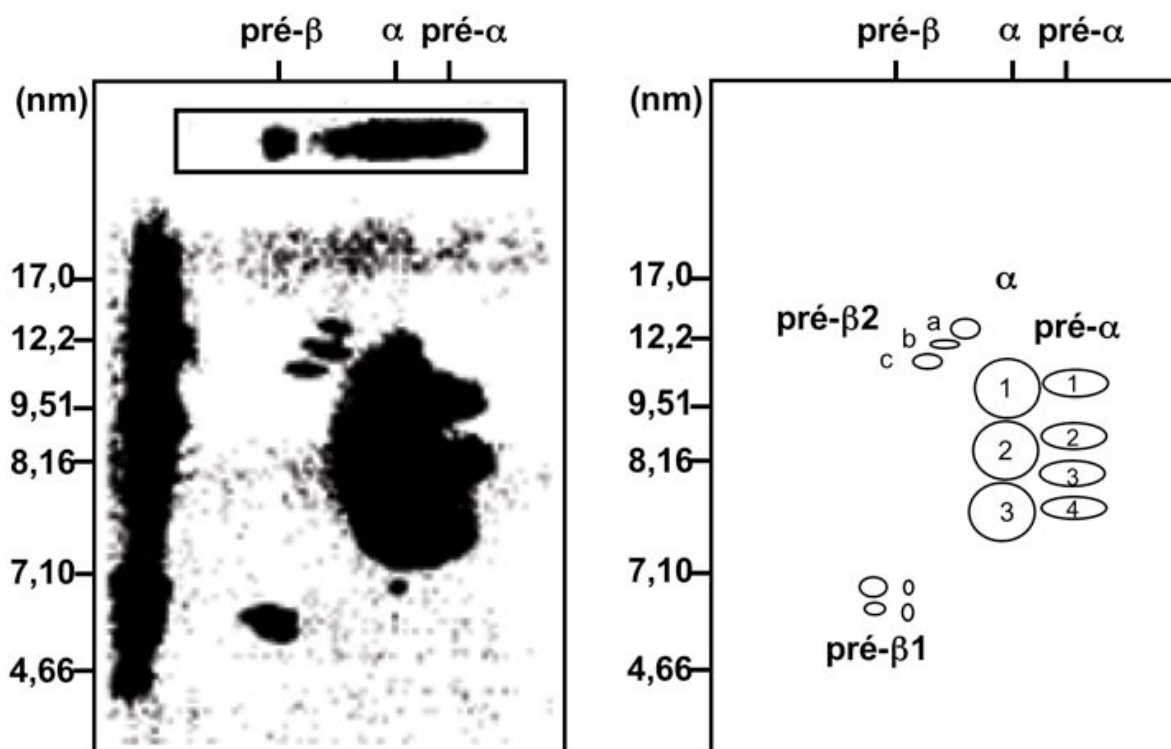
Brièvement, une première séparation électro-phorétique est effectuée sur un gel d'agarose (séparation selon la charge) suivie d'une seconde migration par électrophorèse sur un gel de gradient de polyacrylamide non dénaturant (séparation selon la taille, figure 6) [10].

Les HDL pré  $\beta$  peuvent être séparées en pré  $\beta$ -1 et pré  $\beta$ -2 selon leur taille. Les pré- $\beta$ -1 sont des HDL discoïdales retrouvées chez les patients atteints de déficit familial de la LCAT. Les HDL  $\alpha$  sphériques sont divisées en quatre classes selon leur taille. Les HDL  $\alpha$ -1 sont des HDL sphériques retrouvées chez les patients atteints de déficit familial de la LCAT [14].

### *d) Les pré $\beta$ -HDL*

Les premières études par Fielding et collègues [172], [173] ont documenté qu'une sous-classe mineure des HDL humaines, qui migre en position pré- $\beta$  sur des gels d'agarose, peut éliminer le cholestérol libre des fibroblastes en culture plus rapidement que les HDL qui migrent en position  $\alpha$ , qui constituent la partie majeure des HDL plasmatiques [158]. Ces études suggèrent un rôle principal pour ces particules dans le déplacement initial du cholestérol. Ceci est conforme

avec l'hypothèse selon laquelle l'apoA-I libre ou pauvre en lipide interagit avec un site sur la membrane cellulaire, enlève des lipides cellulaires, et génère des particules naissantes de pré- $\beta$ -HDL [159]. Plus tard, les particules de pré- $\beta$ -HDL deviennent matures, sphériques, et aillent une migration en position  $\alpha$  sur un gel d'agarose par l'action de la LCAT, qui convertit le cholestérol libre en ester de cholestérol. D'ailleurs, ce concept est soutenu par des études démontrant que les particules pré- $\beta$ -HDL agissent en tant que premier accepteur de cholestérol cellulaire, le transfèrent dans des séries de particules pré- $\beta$  plus grandes, et finalement vers des particules en migration  $\alpha$  [173, 160]. Cependant, notre laboratoire a montré que la formation des pré- $\beta$ -HDL ne dépend pas de l'ABCA1 et elle est tissu-spécifique [161].



**Figure 6. Séparation des sous populations des HDL par électrophorèse en deux dimensions.** Panneau de gauche : la partie supérieure montre la 1ère migration en gel d'agarose. Le reste de l'image est un résultat obtenu après électrophorèse, immunobuvardage et détection de l'apoA-I. Panneau de droite : représentation schématique basée sur l'intégration des différentes aires [10].

### 1.6.3 Métabolisme des HDL

#### *a) Genèse des HDL*

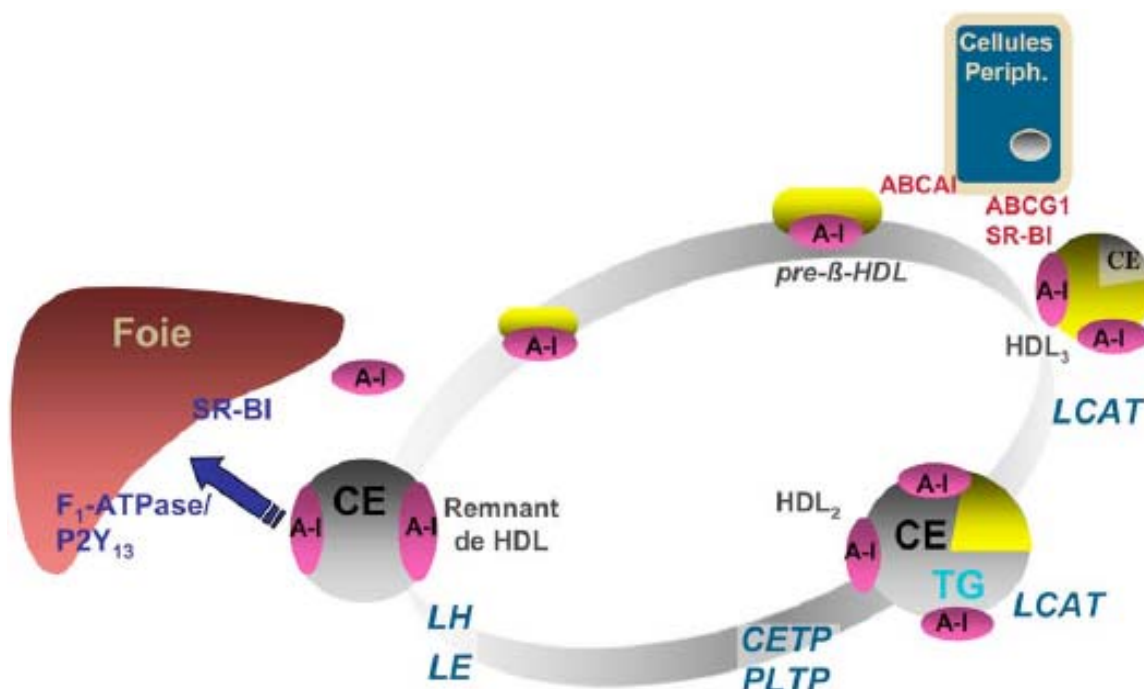
Les HDL jouent un rôle essentiel dans le transport du cholestérol de la périphérie vers le foie. Les HDL débutent leur vie sous forme de particules d'apoA-I produites par le foie et l'intestin. L'apoA-I provient aussi de la dégradation des chylomicrons lorsqu'ils sont soumis à l'action de la lipase lipoprotéique. L'apoA-I est une protéine amphipatique qui circule dans le plasma associée à des phospholipides, et possède une grande affinité pour le

cholestérol [11]. Sous l'action de l'ABCA1 (ATP-binding cassette A1), le cholestérol libre présent au niveau des tissus sera transféré sur l'apoA-I pour donner naissance à des pré- $\beta$  HDL immatures de forme discoïdale qui contiennent deux molécules d'apoA A-I. Le cholestérol libre de ces HDL va être estérifié via l'action de la LCAT plasmatique. Le cholestérol libre, qui est une molécule polaire, va se localiser à la surface des HDL pré- $\beta$ . Lorsqu'il devient estérifié, l'ester de cholestérol non-polaire va migrer vers l'intérieur des HDL pré- $\beta$  pour former le cœur hydrophobe de ces particules qui deviennent alors des HDL  $\alpha$  sphériques. Les HDL vont capter d'autres constituants provenant de la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides [12]. Les chylomicrons vont relâcher des phospholipides, des triglycérides, les apolipoprotéines A-I, A-IV et C qui seront captées par les HDL. Les VLDL vont donner des phospholipides, des triglycérides, les apolipoprotéines C et E aux HDL. Les HDL  $\alpha$  vont également capter du cholestérol libre de la périphérie via l'action de SRB1 (Scavenger Receptor type B1) et de l'ABCG1 (ATP-binding cassette G1). De nouveau la LCAT jouera un rôle essentiel dans l'estérification du cholestérol et la croissance du noyau hydrophobe des HDL. Ces grosses HDL vont lier une autre molécule d'apoA-I pour un total de 3 molécules d'apoA-I par particule de HDL [35]. La figure 7 récapitule les principales étapes du métabolisme des HDL.

#### *b) Catabolisme des HDL*

Il existe deux voies pour le retour du cholestérol des HDL vers le foie : la voie médiée par la CETP (Cholesterol Ester Transfert Protein) et la voie directe.

Grâce à l'action de la CETP, le cholestérol estérifié des HDL2 sera transporté vers les lipoprotéines contenant l'apoB en échange de triglycérides pour donner naissance aux HDL3 (particules appauvries en cholestérol). Le cholestérol ainsi transféré aux VLDL pourra retourner vers le foie via le LDL-R, le LRP ou le VLDL-R. Cette voie représente environ 90% du cholestérol estérifié transporté vers le foie. De plus, les HDL enrichies en triglycérides seront la cible de la lipase hépatique qui va hydrolyser les triglycérides et diminuer la taille des HDL et enrichir leur noyau en ester de cholestérol. Le cholestérol estérifié des HDL peut aussi être transporté directement vers le foie via l'action du SRB1. Chez les humains, cette voie ne représente que 10% du cholestérol estérifié transporté vers le foie [13].



**Figure 7. Métabolisme des HDL.** Les pré-β-HDL formées d'une apoA-I faiblement lipidée vont acquérir du cholestérol libre au contact des tissus périphériques pour devenir une HDL<sub>3</sub> puis HDL<sub>2</sub> sous l'action de l'enzyme d'estérification du cholestérol :

la LCAT. Dans la circulation, sous l'action combinée de la CETP et de la PLTP, la HDL2 va devenir une HDL2 enrichie en TG qui va être hydrolysée par la LH pour donner une HDL2 résiduelle captée par le foie et une apoA-I faiblement lipidée [13].

#### I.6.4 Autres rôles des HDL

Les HDL possèdent plusieurs caractéristiques leur permettant de jouer de nombreux rôles à différents niveaux. Nous allons décrire brièvement les rôles connus.

##### *a) Rôle antioxydant*

Si le cholestérol, à travers les lipoprotéines de faible densité (LDL), a un rôle principal dans l'athérosclérose, nous savons depuis les premiers travaux de Brown et Goldstein qu'il faut modifier les LDL pour les rendre athérogènes. La modification la plus probable est l'oxydation et de nombreuses études témoignent de l'effet pathophysiologique des LDL oxydées (LDLox) ainsi que l'association des LDLox avec la plaque athéromateuse. L'hypothèse du stress oxydatif, élaborée par Steinberg [149], attribue un rôle capital aux LDLox dans le processus de l'athérosclérose, d'où l'importance des mécanismes qui empêchent leur apparition ou qui limitent leurs conséquences pathologiques. Différentes études ont montré que les HDL possèdent une capacité antioxydante vis-à-vis des LDL [150]. Elles peuvent empêcher l'oxydation des LDL, ou réduire le taux de lipides oxydés associés aux LDL. Cette action s'accompagne d'une diminution des effets pathologiques liés au processus de l'athérosclérose, tel l'accumulation des LDL par les macrophages (qui précède



le développement des cellules spumeuses), l'activation des monocytes ou encore les effets cytotoxiques des LDLox contre les cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses [151], [152].

L'effet antioxydant des HDL ne se limite pas à une seule voie. Trois mécanismes ont été évoqués. L'un propose la séquestration des cations (le fer, le cuivre) par les protéines (ferritine, céruloplasmine) associées aux HDL. Les cations sont bien connus pour leur capacité de stimuler l'oxydation des lipides, surtout les lipides polyinsaturés. Une deuxième voie concerne l'évacuation des lipides oxydés des LDL vers les HDL. En effet, si l'on mesure les lipides oxydés associés aux différentes sous-classes de lipoprotéines dans le sang, on trouve les taux les plus élevés associés aux HDL. Le transfert de lipides entre les différentes lipoprotéines est un processus bien décrit, et l'on a démontré que les lipides oxydés sont transférés entre les LDL et les HDL de la même façon que les lipides non oxydés. Cette activité en elle-même ne détruit certes pas les lipides oxydés, mais leur effet toxique est moins marqué dans les HDL par rapport aux LDL. De plus, il existe au niveau des HDL la possibilité de neutraliser les lipides oxydés par un troisième mécanisme protecteur, une activité antioxydante enzymatique [163], [165].

Certaines enzymes associées aux HDL sont capables de prévenir l'oxydation des LDL. Les deux enzymes les mieux étudiées sont la paraoxonase et le PAF acétylhydrolase (*platelet activating factor acetylhydrolase*). Les études de la paraoxonase sont plus avancées. Plusieurs laboratoires ont démontré par des investigations in vitro que la paraoxonase empêche l'oxydation des LDL et

prévient l'action pathologique des LDLox sur les monocytes. La paraoxonase est également capable d'empêcher l'oxydation des HDL. Les souris qui n'expriment pas l'enzyme sont plus susceptibles au développement des lésions athéromateuses et leurs lipoprotéines sont plus faciles à oxyder. Finalement, un lien entre l'enzyme et la maladie coronarienne humaine a été établi car des études ont démontré que la paraoxonase est un facteur de risque génétique indépendant de maladie coronarienne chez l'homme [152].

Certains lipoxygénase (LO-5, LO-12, LO-15) jouent un rôle important dans l'athérosclérose. Ils oxydent des composantes des LDL, ce qui aboutit à une accumulation des LDLox dans les macrophages et la formation des plaques athérosclérotiques [163].

D'autres études ont montré différents effets des LO sur les HDL et l'ABCA1. Une étude montre que l'absence de l'expression des LO diminue l'athérosclérose [164]. Un autre groupe a montré que les modifications des HDL par les LO abolissent l'efflux de cholestérol par le SR-B1 et l'ABCA1 dans les macrophages [165].

#### *b) Rôle anti-inflammatoire*

L'hypothèse d'un rôle pathologique primaire des LDLox a grandement contribué à faire évoluer notre conception de l'athérosclérose qui est de plus en plus assimilée à une réaction inflammatoire. Ceci a toute son importance car les LDLox sont des modulateurs puissants de la réponse inflammatoire [153,154]. Elles sont capables de modifier l'expression de différents gènes impliqués dans

l'inflammation, avec des conséquences variées, mais surtout pro-inflammatoires. La migration de cellules, tels les monocytes ou les cellules musculaires lisses, dans l'intima des vaisseaux sanguins est une des phases importantes de l'athérosclérose. Ces cellules sont fortement représentées dans la plaque athéromateuse. Or, les LDLox stimulent la production par les tissus de la paroi de molécules chimiotactiques qui attirent de telles cellules. Les LDLox sont également toxiques pour ces cellules et cela peut aussi contribuer à leur accumulation dans l'intima. Finalement, plusieurs études ont démontré que les LDLox augmentent l'expression de molécules d'adhésion (*P-selectin*, *vascular cell adhesion molecule-1*, *intercellular adhesion molecule-1*). Ces molécules fonctionnent pour ancrer des cellules (monocytes, cellules musculaires lisses) dans les tissus, ce qui peut également contribuer au développement des lésions athéromateuses. D'autres protéines, des métalloprotéases, contribuent à ce processus en facilitant le remodelage des parois vasculaires. Les LDLox exercent ici également des effets pathologiques en augmentant l'expression de certaines de ces enzymes. Ceci a des conséquences non seulement pour le développement de la plaque, mais pourrait aussi la déstabiliser, précipitant sa rupture et favorisant la formation de thrombus, ce qui est considéré comme la phase aiguë de la maladie coronarienne [155].

Ainsi, le fait que les HDL puissent prévenir ou limiter l'oxydation des LDL, constitue déjà un rôle anti-inflammatoire, même indirect. Mais les HDL peuvent influencer favorablement la réponse anti-inflammatoire par des voies plus directes. L'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales,

induite par les cytokines, est inhibée par les HDL seules, une voie qui n'implique pas les LDLox. Cet effet a été localisé au niveau du promoteur du gène (pour le «E-selectin»). Plusieurs groupes ont montré que les HDL inhibent l'expression de molécules d'adhésion cellulaire dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) in vitro. Les HDL natives et HDL reconstitués (HDLr) contenant uniquement de l'apoA-I et la phosphatidylcholine inhibent l'expression (induite par les cytokines) des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine dans les cellules HUVECs d'une manière concentration-dépendante [169]. L'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion est associée à une réduction des niveaux d'ARNm de ces protéines. Les HDL isolée du plasma de différents sujets humains varient dans leur activité inhibitrice. La raison de la variation est incertaine. Il est bien connu que la fraction HDL dans le plasma humain est hétérogène, consistant en un certain nombre de sous-populations discrètes qui varient en taille, densité et la composition en lipides et apolipoprotéines. Il a été signalé que l'activité inhibitrice de la sous-fraction HDL3 (dans lequel les particules sont plus petites et plus denses) est supérieure à celle des HDL2 (dans laquelle les particules sont plus grosses et moins denses). En utilisant des HDLr, il semble que la capacité des HDL d'inhiber l'expression induite de VCAM-1 dans les cellules endothéliales n'est affectée par les variations dans la taille des particules, ni dans la composition des apolipoprotéines, d'esters de cholestérol et de triglycérides. En contraste, en changeant la composition des phospholipides dans les HDLr, des effets majeurs sur leur activité inhibitrice sont détectés.

L'expression d'autres gènes, telle la cyclo-oxygénase-2 (Cox-2) peut aussi être modulée suggérant que les HDL induisent un état que l'on peut qualifier comme anti-inflammatoire [169].

### *c) Rôle anti-apoptotique*

La mort cellulaire est l'une des caractéristiques du développement de la plaque athéromateuse. Les LDLox sont impliquées dans ce processus. Elles peuvent activer des voies apoptotiques, impliquant par exemple le récepteur CD36 ou encore la protéine membranaire Fas. Par leur capacité, donc, d'empêcher l'oxydation des LDL, les HDL pourraient offrir une certaine mesure de cytoprotection. D'autres études ont mis à jour un rôle anti-cytolytique des HDL qui est indépendant de leur capacité de prévenir l'oxydation des LDL [170]. Ainsi, les effets cytotoxiques des LDLox sur les cellules endothéliales ont été diminués par la pré-incubation des cellules avec les HDL. Cette action était principalement due à la protéine structurelle des HDL, l'apoA-I. Les HDL/apoA-I semblent renforcer la capacité des cellules à résister aux effets toxiques des LDLox, peut-être par le blocage des signaux intracellulaires pathogènes. D'autres études, plus anciennes, avaient déjà révélé une action protectrice des HDL liée cette fois à l'activité du complément. En effet, les HDL empêchent la lyse cellulaire induite par la phase finale de l'activation du complément (*membrane attack complex*) [170].

#### *d) Rôle anti-thrombotique*

L'agrégation des plaquettes est l'un des facteurs de risque pour la maladie coronarienne, surtout pour la phase aiguë. Les HDL sont capables d'inhiber l'agrégation des plaquettes. Bien que le mécanisme ne soit pas encore complètement éclairé, il semble impliquer d'une part la liaison des HDL aux plaquettes et, d'autre part, l'augmentation des taux d'oxyde nitrique (NO) qui est également un inhibiteur de l'agrégation. Le NO a une deuxième action vasculaire bénéfique car il est aussi un vasodilatateur puissant. Dans ce contexte, un rôle pathologique pour les LDLox est également à envisager. Plusieurs études ont montré qu'elles agissent sur les cellules endothéliales pour diminuer la sécrétion de NO et augmenter la sécrétion de l'endothéline. Cette dernière est un puissant vasoconstricteur, ce qui contribue à un état pro-thrombotique. Si la capacité des HDL d'empêcher l'agrégation des plaquettes a été clairement démontrée in vitro, l'importance physiologique d'une telle activité reste à démontrer [171].

#### 1.6.5 Les enzymes du métabolisme des HDL

De nombreuses enzymes sont impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines. La plupart d'entre elles sont regroupées dans deux grandes catégories, les protéines de transfert des lipides [21] et les lipases [22].

Ce groupe contient des enzymes impliquées dans la synthèse ou le transfert des esters de cholestérol [23] comme la LCAT, la CETP ou dans le transfert des phospholipides comme la PLTP [24]. La HL joue ainsi un rôle important [22].

*a) Lécithine Cholestérol Acyle-transférase (LCAT)*

La LCAT convertit le cholestérol en ester de cholestérol dans le plasma, à la surface des lipoprotéines. La LCAT est essentiellement produite par le foie mais aussi par le cerveau et les testicules. Les sites actifs de l'enzyme contiennent la séquence Gly-X-Ser-X-Gly. La LCAT agit préférentiellement en surface des HDL mais aussi sur les LDL. Elle est activée par les apoA-1, A-2, A-4 et C-1.

La LCAT, qui est une phospholipase, transfère un groupe acyle d'un acide gras préférentiellement de la position sn-2 de la lécithine vers le groupe 3-hydroxyle du cholestérol produisant ainsi ester de cholestérol et lyso-lécithine [25]. Une forte estérification du cholestérol promeut le transport reverse du cholestérol, l'activité LCAT est donc antiathérogénique [17] et promeut le transport reverse [26]. La LCAT est peu régulée par les processus qui contrôlent sa synthèse et sa sécrétion. La LCAT a son activité régulée par la concentration, la composition, la distribution de ses substrats de lipoprotéines [27].

*b) Protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP)*

La CETP est une glycoprotéine plasmatique. La CETP est riche en hélice  $\alpha$  lui permettant de se lier aux lipides [20]. Elle est produite par le tissu adipeux et les muscles. La CETP, comme son nom l'indique, assure le transfert des esters de

cholestérol et des triglycérides entre lipoprotéines [28]. Le rôle de CETP dans le métabolisme des lipoprotéines a été élucidé grâce à des mutations et des déficiences chez l'humain [29]. Ces études ont montré qu'une diminution de l'activité CETP menait à une augmentation des HDL, une baisse des particules athérogènes et une diminution des risques d'athérosclérose [30]. Les apoC-1, C-3, F peuvent inhiber la CETP [16], [31], les apoA-1, A-2, A-4 l'activer [18]. La CETP aurait un rôle pro-athérogène.

Récemment, le très prometteur Torcetrapib, inhibiteur de la CETP, a augmenté de 61% les niveaux de HDL tout en réduisant les niveaux de LDL de 17% dans une étude réalisée chez l'humain [102]. Cependant, le Torcetrapib a montré une augmentation de mortalité en causant une hypertension artérielle. Plus récemment, des études montrent que l'Anacetrapib et le Dalcatrapib augmentent les niveaux de HDL sans causer une hypertension artérielle [166], [167]. Le Dalcatrapib module l'activité de la CETP en maintenant une formation efficace des pré- $\beta$ -HDL ce qui augmente le transport du cholestérol à rebours [167]. Bien que les inhibiteurs de la CETP ouvrent une nouvelle voie de traitement possible afin d'améliorer la fonction vasculaire, plusieurs études sont encore requises afin d'établir les bénéfices de leur utilisation sur la santé humaine.

### *c) Protéine de Transfert des Phospholipides (PLTP)*

La PLTP est essentiellement exprimée par le foie et le tissu adipeux. Le gène de la PLTP est sous le contrôle des facteurs de transcription FXR et PPAR. La



PLTP joue un rôle important dans le métabolisme lipidique. Elle assure le transfert des phospholipides entre les lipoprotéines riches en triglycérides et les HDL durant la lipolyse par la LPL. Ces phospholipides sont présents en surface des fragments provenant des Chylomicrons et des VLDL durant la lipolyse et sont d'importants précurseurs des HDL plasmatiques. La PLTP remodèle aussi les HDL [32]. L'interaction entre PLTP et HDL entraîne la formation de pré- $\beta$  HDL et de particules HDL larges type HDL 2 par un processus qui implique la fusion des particules HDL [23]. Ces pré- $\beta$  HDL servent d'accepteurs au cholestérol provenant des cellules périphériques. La PLTP a donc une activité antiathérogénique [33]. La PLTP est activée par les apoA-1 et E et est aussi impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des VLDL [19].

#### *d) La Lipase Hépatique (HL)*

La lipase hépatique est une enzyme lipolytique essentiellement synthétisée par le foie et localisée à la surface des capillaires hépatiques, liée à leur surface par les protéoglycanes d'héparine sulfate [34]. L'activité de la HL est régulée par le statut hormonal et la concentration cellulaire en cholestérol. La HL catalyse l'hydrolyse des tricycles-glycérides et des phospholipides présents dans les lipoprotéines remodelant ainsi VLDL, LDL et HDL [35], [36]. Les apoA-1, A-2, C-1, C-2, C-3, E, inhibent l'activité de la HL [37]. La HL participe aussi à l'assimilation hépatique des lipoprotéines et participe à l'assimilation des esters de cholestérol des HDL par SRB1, lui conférant une action dans l'athérogénèse [38], [39].

### I.6.6 Récepteur vidangeur de type BI (SR-BI)

Il appartient à la famille des protéines CD36, lesquelles se caractérisent par une structure secondaire formée par deux courts domaines intracellulaires (N- et C-terminaux), deux domaines hydrophobes ancrés dans la membrane plasmique, et une grande boucle extracellulaire fortement glycosylée. Le SR-BI lie plusieurs ligands comme les LDL, les HDL, les VLDL, les LDL modifiées et les apoprotéines [103]. Il lie aussi l'apoA-I. Ce récepteur est exprimé fortement au niveau du foie et des tissus stéroïdogéniques (surrénales, ovaires et testicules) [103]; il est aussi présent au niveau d'autres types cellulaires, comme les macrophages de la plaque athéromateuse [104], sans toutefois y médier l'efflux de cholestérol [105].

Au niveau fonctionnel, le SR-BI est classiquement connu pour sa participation au flux bidirectionnel de lipides. Pour cela, son domaine extracellulaire serait primordial car il formerait un canal hydrophobe qui faciliterait le flux des lipides vers ou de la membrane cellulaire [106]. Les souris « knock-out » en SR-BI développent l'athérosclérose [107]. Le SR-BI pourrait antagoniser l'action de l'ABCA1 dans les cellules exprimant les deux récepteurs en permettant l'influx de cholestérol provenant des particules dissociées d'ABCA1 [108].

## **I.7 Apolipoprotéine A-I**

### **I.7.1 Généralité**

La protéine apoA1 est produite principalement par le foie et l'intestin. Elle est principalement associée aux HDL et régule la distribution des tailles de ces particules [40], elle est aussi associée au chylomicrons. L'apoA1 est une protéine de 28.3 KDa et sa concentration plasmatique est de 1–1.5 g/l. L'apoA1 représente 70 % des protéines des HDL [41]. La séquence primaire de l'apoA1 présente 243 acides aminés contenant dix répétitions en tandem conservées dans la famille des apolipoprotéines. Certaines de ces répétitions sont impliquées dans la formation d'hélice  $\alpha$  de 11 ou 22 résidus séparés par une proline, ces structures sont très présentes dans les apolipoprotéines et permettent la liaison aux lipides. L'organisation structurale de l'apoA1 consiste en 10 hélices  $\alpha$  formant un fer à cheval [42].

L'apoA1 active la LCAT qui catalyse l'estérification du cholestérol associé au HDL. Cette activation dépend fortement de l'état de conformation de l'apoA1 [43]. Cette protéine active aussi la CETP et la PLTP et l'efflux cellulaire du cholestérol [44]. L'apoA1 interagit avec différents récepteurs tels que SRB1 [45] ou ABCA1 [46] pour effectuer des échanges lipidiques entre lipoprotéines et tissus. L'apoA1, sur les HDL, a un effet antiathérogénique et protecteur contre les maladies cardiaques.

Il existe des variantes naturelles de l'apoA1 dus à une mutation ponctuelle dans une hélice  $\alpha$ , ces mutants sont l'apoA1 Paris et l'apoA1 Milano et elles sont

associées à des déficiences en HDL dues à un déficit de maturation des HDL provoqué par une mauvaise activation de la LCAT [47], [48]. Dans les populations, environ 10 % de l'apoA1 circulante est de l'apoA1 Paris. Cependant ces variants sont associés à un bon effet antiathérogénique [49], cet effet est dû aux capacités d'inhibition de la peroxydation des phospholipides que possèdent les apoA1 Paris et Milano [50].

Plus d'une douzaine de mutations du gène *apoA-I* ont été décrites. Le déficit complet d'apoA-I conduit à un niveau de HDL très bas ainsi que des xanthomes cutanés et une augmentation du risque cardiovasculaire chez certains patients [51]. La mutation apoA-I Milano est une mutation qui se traduit par l'ajout d'un groupement cystéine qui va permettre la dimérisation de l'apoA-I avec l'apoA-II. Cliniquement cette mutation va entraîner une réduction importante du C-HDL et semble être associée à un risque cardiovasculaire très faible et à une longévité accrue [52].

### 1.7.2 Les modèles structuraux de l'apoA-I

Basés sur des observations au microscope électronique, des études ont suggéré que deux molécules d'apoA-I s'organisaient sous forme de piquets de clôture (*picket fence*) autour d'une bicouche de phospholipides [111], [112].

Des données de cristallographie et de diffraction des rayons X ont proposé un modèle intéressant d'une structure en double ceinture (« double belt »). L'apoA-I y serait arrangé sous forme de deux torsades antiparallèles. Cette structure

thermodynamiquement favorable respecte les dimensions empiriques d'une particule discoïdale reconstituée.

Toutefois, il a été rapporté que des particules discoïdales comportant 3 molécules d'apoA-I existent, alors que le modèle de la double ceinture peut difficilement accommoder une troisième molécule d'apoA-I [111], [112].

Un troisième modèle a ainsi été proposé, celui de l'épingle à cheveux. Deux molécules d'apoA-I s'organiseraient dans une orientation tête-à-tête, ou dans une orientation tête-à-queue. Dans ce modèle, chaque apoA-I serait repliée sur elle-même, adoptant une structure en épingle à cheveux [111].

*a) Modèle en super-hélice double des HDL naissantes [156]*

Une étude récente a appliqué la technique SANS (*Small Angle Neutron Scattering*) sur les HDL naissantes pour obtenir la structure et la conformation de l'apoA-I *versus* le lipide. Remarquablement, ils ont observé que l'apoA-I possède une forme hélicoïdale ouverte qui est enroulé autour d'un ellipsoïde central de lipide. Dans cette étude, les données de SANS avec un nouveau modèle informatique, le modèle de la double super-hélice, suggèrent un arrangement structural inattendu de protéine et de lipides dans les HDL naissantes : une double super-hélice antiparallèle enroulé autour d'un ellipsoïde de lipide (figure 8).

*b) Modèle solar-flares des HDL discoïdales naissantes [157]*

En utilisant la spectrométrie de masse à échange d'hydrogène-deutérium, le modèle de cette étude indique deux molécules d'apoA-I disposées dans une structure de double-ceinture antiparallèles, avec des résidus 159-180 de chaque apoA-I formant une boucle exposée saillante. Cette boucle, y compris Tyr166, une cible préférée pour des modifications d'oxydation site-spécifique dans l'athérome, interagit directement avec la LCAT et elle l'active (figure 9).

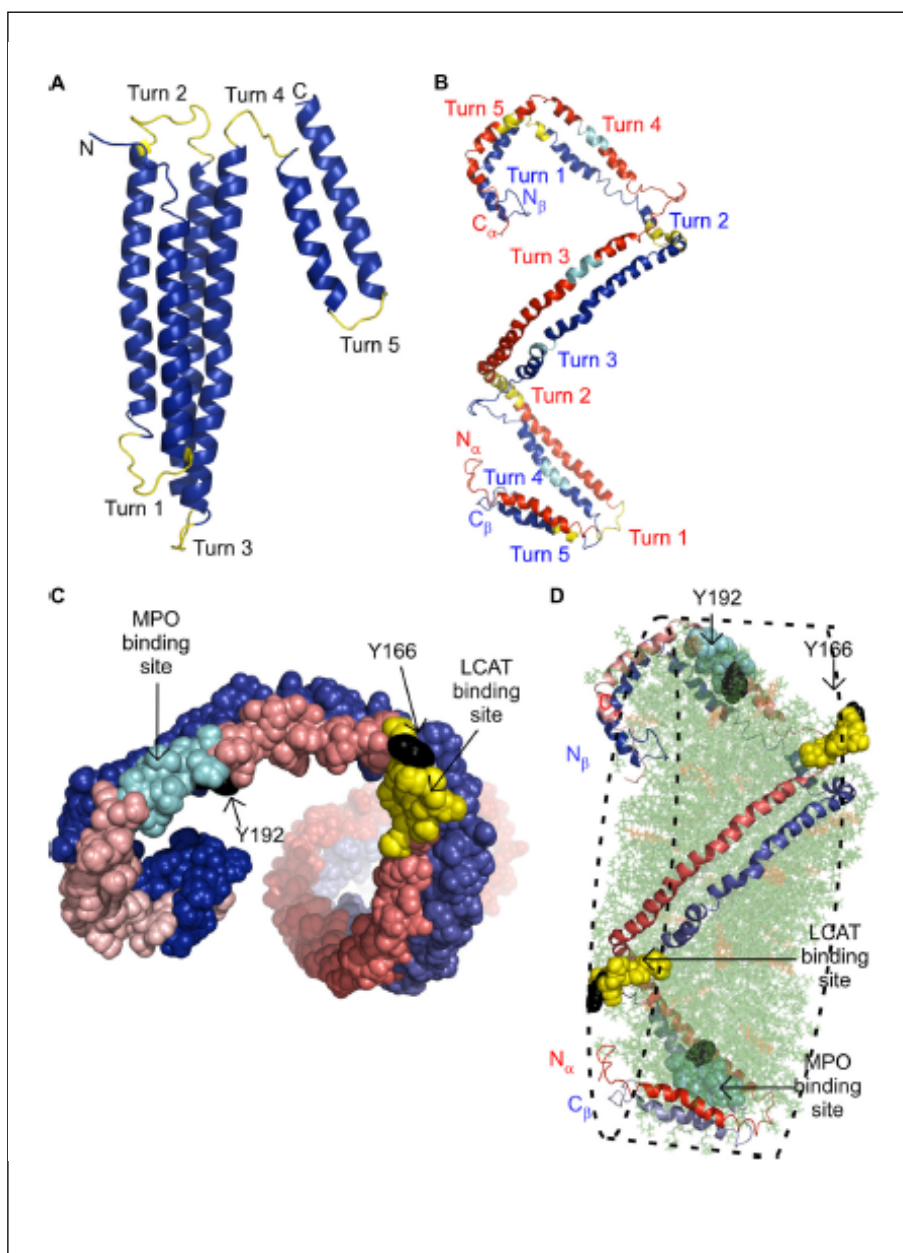


Figure 8. Modèle en super-hélice double des HDL naissantes [156].

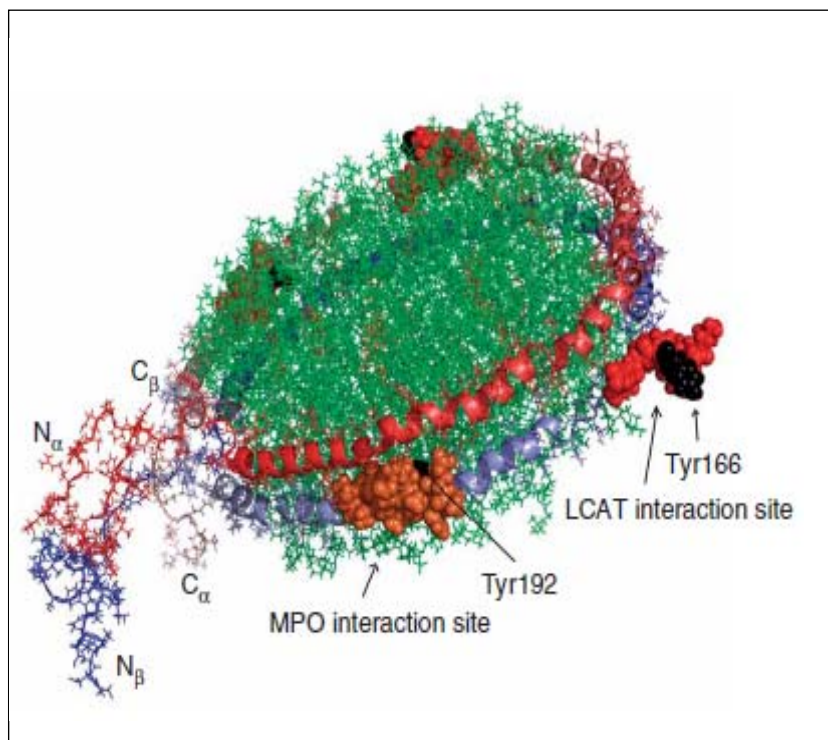


Figure 9. Modèle *solar-flares* des HDL discoïdales naissantes [157].



## **II. La famille des ABC**

### **II.1 Évolution et structure**

Les protéines ABC comprennent une vaste famille de transporteurs impliqués dans la translocation des molécules de diverse nature (ions, sucres, vitamines, lipides et protéines) à travers les membranes en utilisant l'hydrolyse d'ATP comme source d'énergie. Elles constituent une des plus grandes familles de protéines qui se sont conservées au cours de l'évolution des espèces [53].

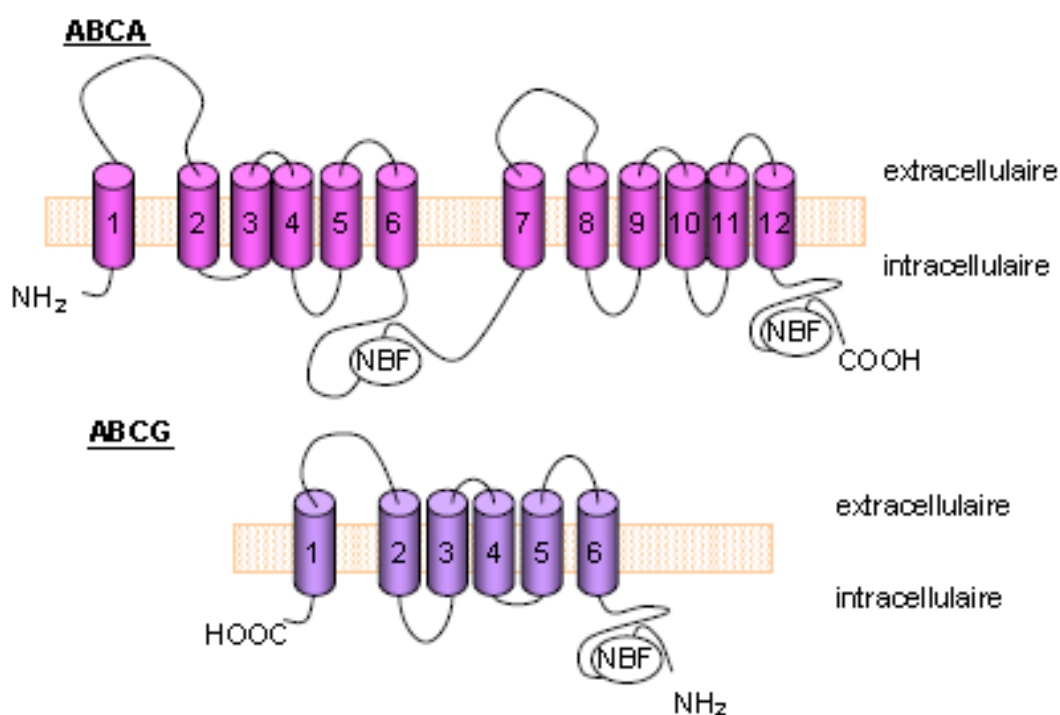
Le génome humain comporte 48 transporteurs ABC différents, groupés en 7 sous-classes s'étendant de l'ABCA jusqu'à ABCG. Les protéines membres de cette famille sont de grosses protéines transmembranaires qui transportent une multitude de substrats à travers les membranes extracellulaires et intracellulaires, incluant des sucres, des acides aminés, des peptides, des protéines, des lipides, des médicaments et autres métabolites hydrophobes. Ils sont essentiels au bon fonctionnement de plusieurs processus cellulaires et une mutation ou altération de ces gènes peut entraîner différentes pathologies génétiques, telles que la fibrose kystique, l'anémie et des désordres du transport des lipides. Ces transporteurs utilisent tous l'ATP pour générer l'énergie dont ils ont besoin et ils sont classifiés justement en se basant sur la séquence et l'organisation du domaine de liaison de l'ATP [53].

La structure des protéines ABC comporte deux domaines intracellulaires, qui contiennent les sites de liaison pour l'ATP appelés NBF (*Nucleotide Binding Folds*), et deux domaines transmembranaires (TMD) à six hélices- $\alpha$  chacun, formant un canal dans les membranes (figure 10).

Les transporteurs ABC sont classés sur la base de leur structure protéique en transporteurs complets (2 TMD et 2 NBF) et en hémi-transporteurs (1 TMD et 1 NBF), ces derniers pouvant s'associer en homo ou hétérodimères pour former un transporteur fonctionnel. Des analyses phylogénétiques ont divisé la superfamille des ABC transporteurs en 7 sous-familles nommées ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF et ABCG, dont des membres d'ABCA et d'ABCG participent à l'homéostasie des stérols [63]. Une liste des transporteurs ABC décrits chez l'humain ainsi que des maladies auxquelles ils sont associés est présentée à la table 3.

Pour ce qui est de la structure quaternaire, les hémi-transporteurs forment soit des homos soit des hétérodimères. C'est le cas des ABCG5/ABCG8 impliqués dans le transport des stérols et des transporteurs ABCB2/ABCB3 (TAP1/TAP2) impliqués dans le transport de peptides pour la reconnaissance immunitaire. Quelques cas d'homodimérisation de transporteurs complets ont aussi été rapportés. Ainsi, sur la base d'observations au microscope électronique en cryodécapage, Eskandari et collègues ont proposé que le transporteur ABCC7 (CFTR) impliqué dans la fibrose kystique forme un homodimère [118].

Par ailleurs, en utilisant des immunoprécipitations suivies de gels non-dénaturants, il a été possible de suggérer que l'hémi-transporteur ABCG2 formait non seulement un homodimère, mais aussi un homotétramère [120]. Finalement, notre groupe a démontré que la tétramérisation de l'ABCA1 constitue l'unité fonctionnelle minimale permettant la liaison du ligand, l'apoA-I [121].

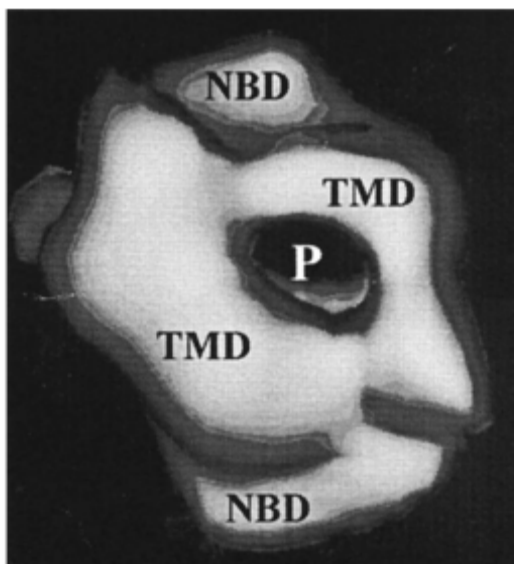


**Figure 10. Modèle actuel des transporteurs ABCA et ABCG.** NBF : site de liaison de l'ATP (*Nucleotide Binding Folding*). Notez que les transporteurs ABCG sont inversés dans leur séquence par rapport aux transporteurs ABCA. D'après [63].

Symbole	Alias	Expression	Fonction	Maladie associée
ABCA1	ABC1	Ubiquitaire	Efflux PL, chol, PS, IL-1 $\beta$	Tangier/FHD
ABCA2	ABC2	Cerveau	Résistance aux drogues	
ABCA3	ABC3	Poumon		
ABCA4	ABCR	Yeux, photorécepteurs	Efflux de rétinoïdes	Stagart
ABCA5		Muscle, cœur, testicules		
ABCA6		Foie		
ABCA7		Rate, thymus	Efflux de phospholipides?	
ABCA8		Ovaires		
ABCA9		Cœur		
ABCA10		Muscle, cœur		
ABCA12		Estomac		
ABCA13		Faible dans tous les tissus		
ABCB1	PGY1,MDR	Surrénales, rein, cerveau	Résistance aux drogues	
ABCB2*	TAP1	Toutes cellules	Transport peptidique	Infections virales
ABCB3*	TAP2	Toutes cellules	Transport peptidique	Infections virales
ABCB4	PGY3	Foie	Transp. Phosphatidylcholin	Cholestase hépatique
ABCB5		Ubiquitaire		Anémie sideroblast.
ABCB6*	MTABC3	Mitochondrie	Transport du fer	
ABCB7*	ABC7	Mitochondrie	Transport du fer/soufre	
ABCB8*	MABC1	Mitochondrie		
ABCB9*		Cœur, cerveau		
ABCB10*	MTABC2	Mitochondrie		
ABCB11	SPGP, MDR3	Foie	Acides biliaires	Cholestase hépatique
ABCC1	MRP1	Poumons, testicules	Résistance aux drogues	
ABCC2	MRP2	Foie	Efflux d'anions organiques	Dubin-Johnson
ABCC3	MRP3	Poumons, intestins, foie	Résistance aux drogues	
ABCC4	MRP4	Prostate	Transport des nucléosides	
ABCC5	MRP5	Ubiquitaire	Transport des nucléosides	
ABCC6	MRP6	Rein, foie		
ABCC7	CFTR	Tissus exocrines	Canal transport ion chlorure	Fibrose kystique
ABCC8	SUR	Pancréas	Récepteur de sulfonylurée	Hypoglycémie famil.
ABCC9	SUR2	Cœur, muscle		
ABCC10	MRP7	Faible dans tous les tissus		
ABCC11		Faible dans tous les tissus		
ABCC12		Faible dans tous les tissus		
ABCD1*	ALD	Peroxisomes	Ac. gras à longues chaînes	Adrénoleucodystrophie
ABCD2*	ALDL1, ALDR	Peroxisomes	Ac. gras à longues chaînes	
ABCD3*	PXMP1, PMP70	Peroxisomes	Ac. gras à longues chaînes	Zellweger
ABCD4*	PMP69, P70R	Peroxisomes	Ac. gras à longues chaînes	
ABCE1*	OABP, RNS4I	Ovaires, testicules, rate	Récepteur oligoadénylate	
ABCF1*	ABC50	Ubiquitaire		
ABCF2*		Ubiquitaire		
ABCF3*		Ubiquitaire		
ABCG1*	ABC8, white	Ubiquitaire	Efflux du cholestérol?	
ABCG2*	ABCP, MXR	Placenta, intestin	Toxines, résistance drogues	
ABCG4*	White 2	Foie	Efflux de cholestérol?	
ABCG5*	White 3	Foie, intestin	Transport des stérols	Sitostérolémie
ABCG8*		Foie, intestin	Transport des stérols	Sitostérolémie

\* = hémitransporteur

**Table 3. Transporteurs ABC connus**



**Figure 11. Projection en trois dimensions de la structure proposée du transporteur ABCB1 (Pgp).** Les domaines transmembranaires (TMD) s'organisent pour former un pore (P) dans la membrane, tandis que les domaines de liaison aux nucléotides (NBD) sont cytosoliques [118].

## **II.2 Le transporteur « ATP-binding cassette A1 » (ABCA1)**

### **II.2.1 Introduction**

La sous-famille ABCA est formée par 12 transporteurs complets, dont l'ABCA1 qui est impliqué dans l'homéostasie des lipides et qui a été identifié à l'origine de la maladie de Tangier, une pathologie autosomale co-dominante caractérisée par l'accumulation de cellules spumeuses dans des tissus périphériques, des niveaux plasmatiques extrêmement bas de HDL et d'apoA-I et un risque de maladie cardiovasculaire élevé [64].

Le gène d'ABCA1 est situé dans le chromosome 9q chez l'homme et présente 150 kb distribués en 49 exons qui codent pour une protéine de 2261 acides aminés (250 KDa) [64]. La transcription du gène est induite par les oxystérols (27-, 22(R)- et 22(S)-hydroxystérols) et l'acide rétinoïque à travers l'activation des récepteurs nucléaires orphelins LXR et RXR. Une activation indirecte est effectuée par les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  qui induisent l'expression de LXR $\alpha$ , et par l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) [147]. En revanche, les cytokines et les facteurs de croissance inhibent l'expression d'ABCA1, mettant en évidence la nécessité de cellules quiescentes pour l'efflux *via* l'ABCA1 [65].

En outre, l'apoA-I exerce des régulations post-traductionnelles qui stabilisent la protéine d'ABCA1 et inhibent sa dégradation [61], [66]. L'ABCA1 est exprimé à la surface de différents types cellulaires, principalement les macrophages, où il participe à l'efflux de PL et CL vers des accepteurs extracellulaires. L'efflux de lipides *via* l'ABCA1 est directement corrélé aux concentrations plasmatiques d'apoA-I et inversement à celles de PL, de cholestérol-HDL [62]. Ainsi, et contrairement à SR-BI, l'apoA-I libre et les HDL naissantes sont des accepteurs efficaces pour les lipides efflués par l'ABCA1. De plus, les autres apolipoprotéines échangeables présentant des motifs à hélices- $\alpha$  amphipatiques (apoA-II, apoA-IV, apoE, apoC) sont aussi des accepteurs plasmatiques potentiels pour les lipides dont l'efflux dépend d'ABCA1 [62]. En revanche, les HDL3 sont des ligands faibles, tandis que les HDL2 ne sont pas de bons ligands d'ABCA1 [66].

Le modèle actuel d'efflux *via* l'ABCA1 propose la liaison de l'hélice 10 de l'apoA-I aux domaines lipidiques générés par ce transporteur dans la membrane cellulaire. L'apoA-I ainsi ancrée interagit directement avec l'ABCA1, ce qui entraîne la lipidation de l'apoA-I et la maturation des HDL [61]. Les HDL immatures sont catabolisées plus rapidement que les matures, raison pour laquelle la lipidation et la maturation des HDL sont des étapes très importantes pour leur métabolisme normal. Ceci explique les taux faibles, voire nuls, de HDL chez les patients atteints de la maladie de Tangier [123].

Récemment, l'ABCA1 a été détecté à la fois à la surface cellulaire et dans les compartiments d'endocytose, suggérant l'implication probable d'un trafic intracellulaire dans sa fonction d'efflux vers l'apoA-I [65].

### II.2.2 Régulation transcriptionnelle

Le séquençage du gène, situé sur le chromosome 9q31, a mis à jour de nombreux éléments spécifiques de régulation sur le promoteur du gène ABCA1. On y retrouve notamment des sites de régulation tissu spécifiques tels que les facteurs de transcription Sp1 et Sp3, *l'upstream stimulatory factor* USF1/2 et le facteur nucléaire hépatocytaire HNF-1a [67], [68]. Bien que l'on ne sache pas vraiment à quel niveau il agit, l'AMP cyclique (AMPc) est un acteur très présent dans l'activation du gène et de l'efflux de cholestérol vers l'Apo-AI [67], [69], [70]. D'autres travaux ont montré que l'expression et l'activité d'ABCA1 sont sensibles aux variations intracellulaires de stérols par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires liver X receptor (LXR) / retinoid X receptor (RXR) qui

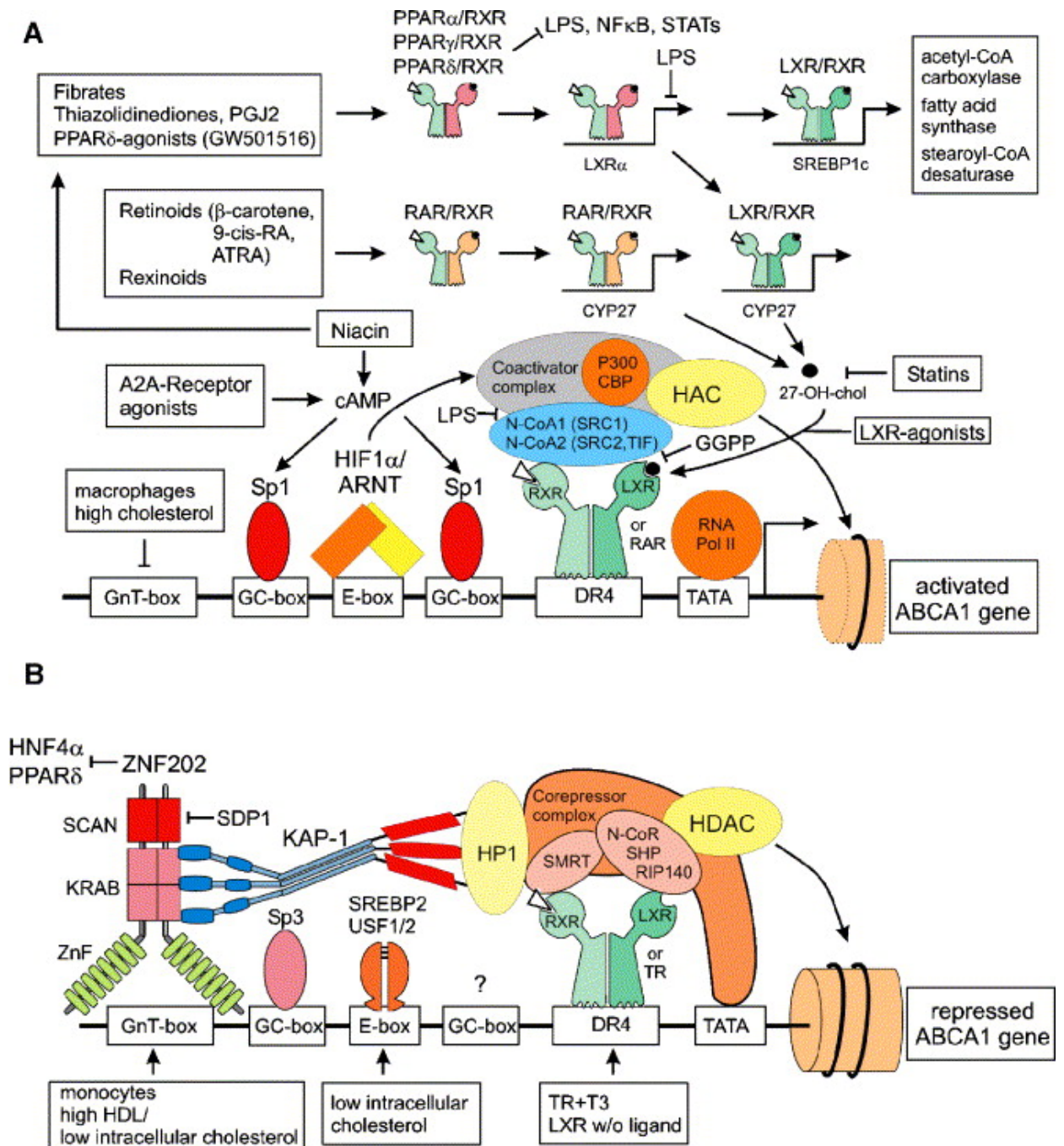
trouvent un site DR4, site de fixation de l'hétérodimer LXR/RXR, sur le promoteur du gène [70]. Lorsque ces récepteurs sont activés par le LDL [71] ou par leurs ligands, tel que le 27 hydroxy-cholestérol, la transcription du gène est accrue. Selon Pullinger, cette régulation pourrait trouver une explication dans la présence de quatre sites de fixation de SREBP1, élément de réponse aux stérols, sur le promoteur d'ABCA1 [72]. Dans les macrophages humains, les agonistes des PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors)  $\alpha$  et  $\gamma$  augmentent l'expression du gène et l'efflux de cholestérol en passant probablement par l'intermédiaire des LXR [73]. Le PPAR $\delta$  influence également la transcription du gène et l'efflux du cholestérol dans le même sens et peut-être de manière plus prononcée que les PPAR $\alpha$  et  $\gamma$ , et ce, sans faire intervenir le LXR. Ce dernier résultat a été observé uniquement chez des singes rhésus obèses et insulino-résistants [74].

D'autres facteurs jouent un rôle répresseur sur ABCA1. Le promoteur du gène possède un site de fixation de la protéine « en doigts de zinc » 202 (ZNF202) qui inhibe son expression [75]. L'interféron  $\gamma$ , facteur d'inactivation des macrophages, diminue l'efflux de cholestérol vers le HDL, via l'apoA-I, en réprimant l'expression du gène ABCA1 [76]. Le même résultat est obtenu chez des souris rendues diabétiques par la présence d'acides gras polyinsaturés et de corps cétoniques, particulièrement l'acéto-acétate [77]. Les acides gras polyinsaturés régulent aussi ABCA1 au niveau post-transcriptionnel en



augmentant le « turnover » déjà rapide de la protéine dans les macrophages et peuvent ainsi en diminuer l'expression à la surface cellulaire [78].

En présence d'AMPc, la phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) de résidus dans le domaine régulateur de la protéine ABCA1 régule l'activité du transporteur. C'est au niveau de deux sérines situées dans les NBD d' ABCA1 que se réalise la phosphorylation par la PKA [79], [131], [80]. Récemment, une séquence riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (PEST) a été identifiée dans la structure primaire de la protéine. Cette séquence entraîne la dégradation d'ABCA1 par une calpaïne protéase, permettant ainsi le contrôle de la quantité et de l'activité du transporteur. Toutefois, si l'ABCA1 est liée à de l'apoA-I, la protéase ne trouve plus son site de fixation et l'efflux de cholestérol est activé [81], [132]. La figure 12 présente les voies de signalisation majeures qui contrôlent la transcription de l'ABCA1.



**Figure 12. Éléments de régulation des promoteurs d'ABCA1. A : ABCA1 activé. B : ABCA1 réprimé.** L'ABCA1 est sous le contrôle d'un promoteur principal et de trois promoteurs alternatifs situés dans l'intron 1. Les exons 1, 1a/d, 1c et 1b ne sont pas codants, le codon ATG de départ étant situé dans l'exon 2. Les différents exons 1 sont donc utilisés par différents types cellulaires sans atteinte à la structure primaire de la protéine. Les différents promoteurs contiennent les éléments de base (boîte TATA et boîte CAAT) en plus d'éléments putatifs de régulation par les stérols (SRE). Les

éléments DR4 assurent la liaison des récepteurs LXR et RXR activant la transcription, tandis qu'un élément permet la liaison du répresseur ZNF202. La boîte E (E-box) permet la liaison des facteurs USF1 et USF2 avec le répresseur de transcription Fra-2. Cet élément serait utile lors de la mitose.

L'augmentation du niveau de cholestérol intracellulaire entraîne une conversion du cholestérol en hydroxystérols, des ligands du «liver-X-receptor» (LXR). Ce dernier hétérodimérise avec le «retinoid-X-receptor» (RXR) pour se lier à l'élément DR4 du promoteur de l'ABCA1. Cette interaction est inhibée par le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP). La quantité de LXR intracellulaire, augmentée par l'activation des «peroxysome-proliférateur activated receptors» (PPAR), détermine le niveau d'expression d'ABCA1 [82].

### II.2.3 Structure et régulation post-traductionnelle

#### *a) Structure générale*

L'analyse de la séquence primaire de l'ABCA1 prédit deux domaines transmembranaires (TM) comprenant chacun 6 hélices alpha orientées de façon antiparallèle, intercalés entre deux domaines liant les nucléotides (NBF). Un schéma de la structure topographique de l'ABCA1 est montré à la figure 13.

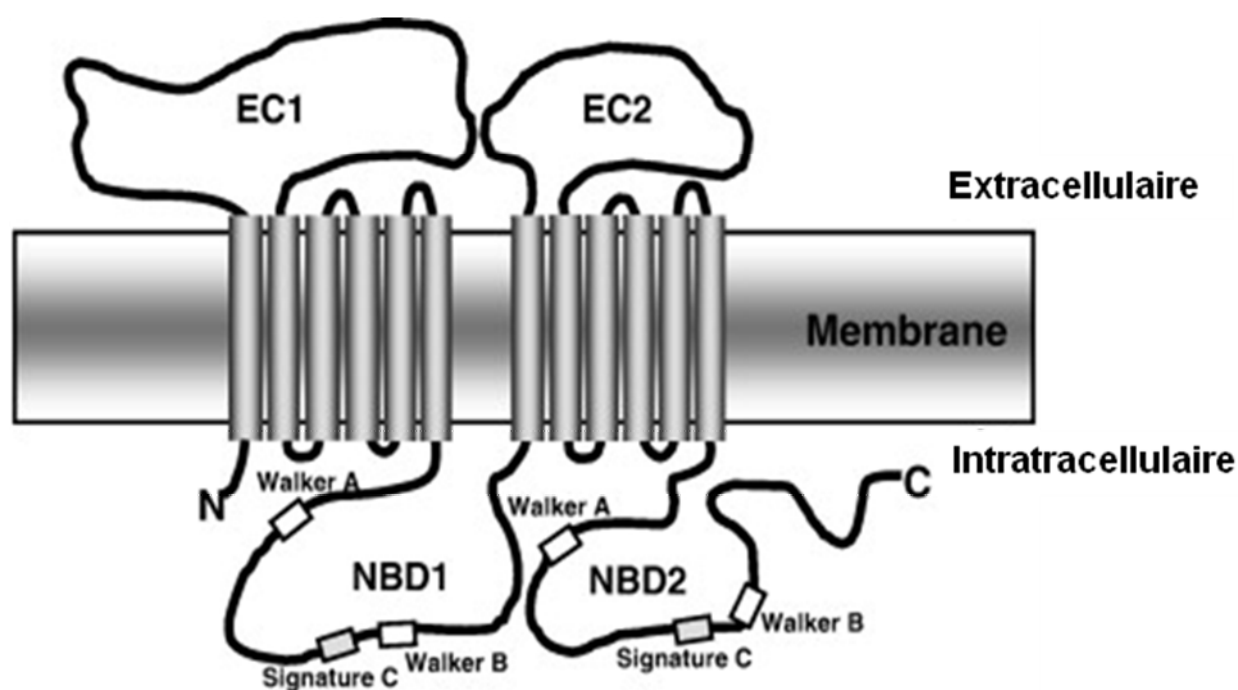
#### *b) Les domaines extracellulaires et intracellulaires*

Les domaines extracellulaires seraient le site d'interaction avec les ligands puisque des mutations ponctuelles dans ces domaines diminuent l'association de l'apoA-I, sans pour autant affecter l'expression de l'ABCA1 à la surface membranaire [125], [126], [127].

Les domaines intracellulaires contiennent les motifs Walker A, Walker B et «Signature» caractéristiques des ABC. Le rôle des domaines de liaison des nucléotides (NBD) dans l'hydrolyse de l'ATP a été bien étudié. L'ABCA1

hydrolyse l'ATP lentement, comparativement au transporteur MDR1. Par ailleurs, il semble que ni le cholestérol, ni les phospholipides, ni même l'apoA-I n'active l'hydrolyse d'ATP. Les auteurs de l'étude concluent que l'ABCA1 n'est probablement pas un transporteur actif, mais plutôt un régulateur membranaire, vu son hydrolyse lente de l'ATP [128].

D'autres motifs des segments intracellulaires modulent la stabilité, la fonction et la localisation cellulaire de l'ABCA1 : la séquence PEST, des sites consensus de phosphorylation par la PKA et du domaine PDZ.



**Figure 13. Structure topographique de l'ABCA1.** Les deux segments extracellulaires (EC1 et EC2) permettent la liaison du ligand et la dimérisation. Les domaines intracellulaires contiennent les motifs de régulation post-traductionnelle, deux séquences consensus de phosphorylation par la PKA et un motif PDZ. Adapté de [124]

Les acides aminés 1283-1306 de l'ABCA1 présentent une séquence appelée « PEST », une séquence riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T). Une séquence PEST est caractéristique d'une dégradation rapide en favorisant habituellement l'ubiquitination, un signal ciblant une protéine pour dégradation protéosomale [129]. La séquence PEST influence spécifiquement la dégradation de l'ABCA1 par la protéase Calpaïne. L'incubation avec l'apoA-I abolit la phosphorylation des résidus thréonine (Thr-1286 et Thr-1305). Ceci augmente la demi-vie de l'ABCA1 en inhibant sa dégradation par la Calpaïne [130].

Le traitement de fibroblastes avec du 8-bromo-AMPC augmente l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  orthophosphate dans l'ABCA1. Notre laboratoire a démontré que l'incubation avec l'apoA-I induisait la phosphorylation d'ABCA1 par une voie dépendante de la PKA [133], entraînant une augmentation de l'efflux de cholestérol. L'apoA-I joue donc un double rôle en stabilisant l'ABCA1 par déphosphorylation de la séquence PEST et en activant l'efflux de cholestérol par phosphorylation par la PKA.

Le rôle d'un domaine PDZ est de positionner les protéines les unes par rapport aux autres en les associant avec les composantes membranaires du cytosquelette. Les trois derniers acides aminés de l'ABCA1 forment une séquence PDZ. Une étude a identifié la  $\beta$ 2-syntrophine comme protéine interagissant avec l'ABCA1. Ceci positionnerait l'ABCA1 dans la membrane hors des radeaux lipidiques (rafts) [134, 135]. L' $\alpha$ 1-syntrophine a aussi été identifiée

comme interagissant avec l'ABCA1 [136]. Le domaine PDZ est donc essentiel au maintien de la fonction d'ABCA1.

#### II.2.4 Déficience familiale en HDL et maladie de Tangier

La maladie de Tangier est rare et se traduit par une quasi-absence d'HDL et d'apoA-I dans la circulation sanguine et par des dépôts tissulaires de cholestérol, notamment les amygdales qui deviennent orange. Les patients atteints de cette maladie ont des risques accrus de survenue d'incidents cardiaques.

Tirant avantage de l'étude de grandes familles, quatre groupes (incluant le nôtre) utilisent le criblage génomique, l'haplotypage et la saturation de l'haplotype pour cerner le gène responsable. C'est en 1999 qu'est finalement publié que l'ABC1 (ancien nom pour l'ABCA1) du chromosome 9q31 est muté dans la maladie de Tangier [113], [114], [115], [116] et chez les patients atteints de déficience familiale en HDL [117]. L'ABCA1 ne peut alors plus transférer les lipides sur les HDL naissantes d'où une absence d'HDL et une élimination rapide de l'apoA-I circulante. La plupart des malades sont homozygotes, cette maladie est autosomale récessive avec une pénétrance complète

#### II.3 Efflux du cholestérol et des phospholipides

Le transporteur ABCA1 est reconnu pour son implication dans l'efflux de cholestérol et de phospholipides. Les fibroblastes de patients avec mutation dans

l'ABCA1 ont des efflux de cholestérol et de phospholipides abaissés [109]. Toutefois, le mécanisme moléculaire d'efflux lipidique par l'ABCA1 reste indéterminé. Fielding et ses collègues ont proposé un mécanisme en deux étapes après avoir comparé l'efflux de cellules exprimant ou non l'ABCA1. Par exemple, les cellules endothéliales qui n'expriment pas l'ABCA1 sont capables d'exercer un efflux de cholestérol seulement si l'apoA-I a été préalablement phospholipidé par incubation avec des fibroblastes exprimant l'ABCA1 [143].

Ils proposent alors un modèle d'efflux en deux étapes, la première étant l'ajout de phosphatidylcholine sur l'apoA-I, un processus médié par l'ABCA1. Cette phospholipidation de l'apoA-I la rendrait favorable à ensuite accepter du cholestérol provenant des *caveolae*, un mécanisme indépendant de l'ABCA1. Cela suggère que les efflux de cholestérol et de phospholipides peuvent être dissociés. Il est alors proposé que l'ABCA1 transfère de la phosphatidylcholine sur l'apoA-I tandis que l'efflux de cholestérol serait secondaire et indépendant de l'ABCA1. Cependant, d'autres groupes (incluant le notre) n'ont pas été capables de distinguer l'efflux de cholestérol de l'efflux de phospholipides [144].

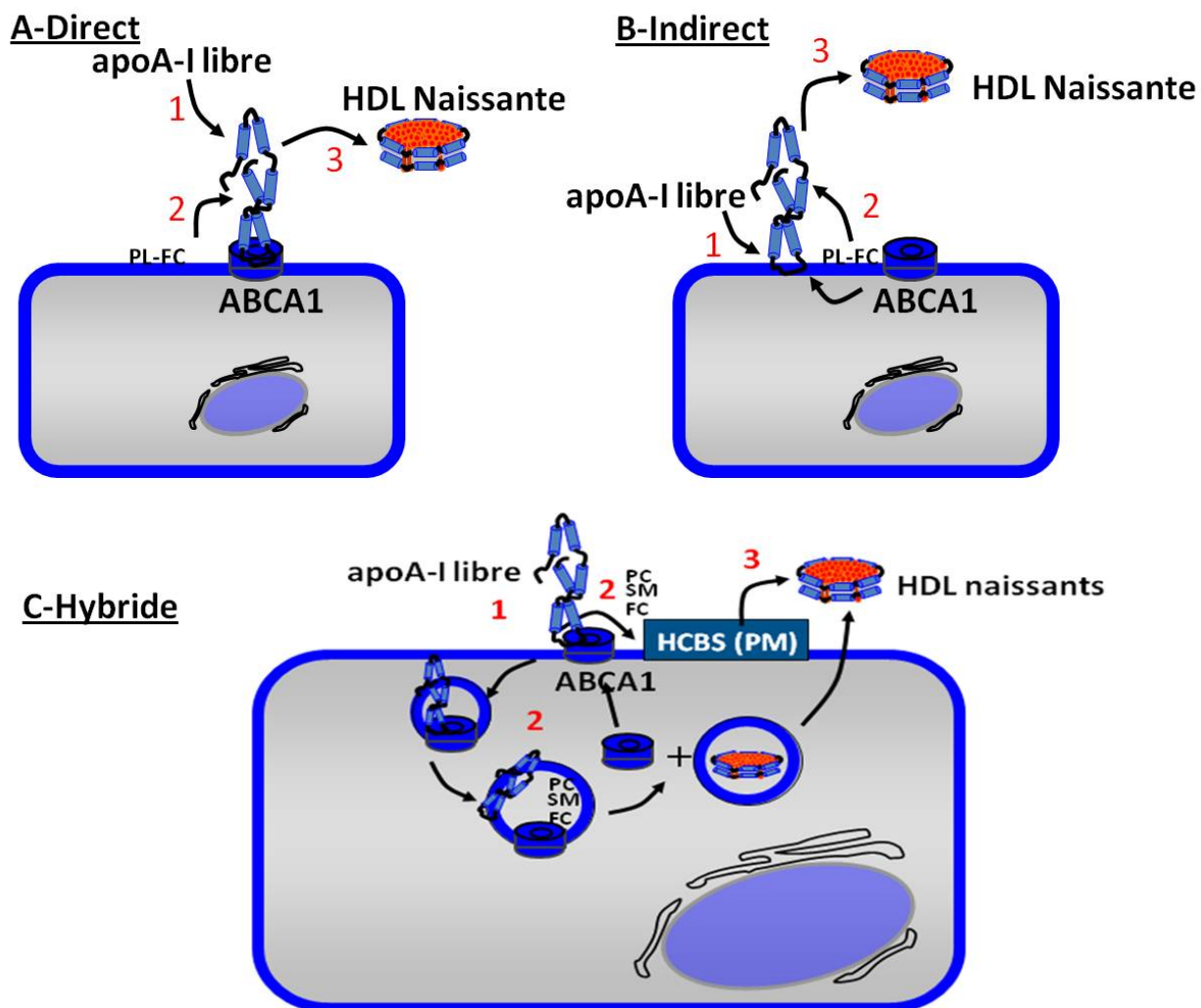
#### **II.4 Interaction ABCA1/apoA-I et voie d'endocytose**

Plusieurs théories existent concernant la première étape dans la génération des HDL, c'est la lipidation de l'apoA-I pauvrement lipidée par l'ABCA1. Les deux théories les plus connues s'opposent sur la nature de cette interaction. La première propose que, montré par pontage intermoléculaire (« cross-linking »)

[122],[138],[125],[110], l'apoA-I est un ligand pour l'ABCA1, son récepteur, qui transférerait des lipides sur l'apoA-I [137]. L'enrichissement de l'apoA-I en lipides diminuerait son affinité pour l'ABCA1, ce qui faciliterait la dissociation du ligand (figure 14). Ce modèle est aussi supporté par le fait que des mutations dans le domaine extracellulaire de l'ABCA1 inhibent la liaison de l'apoA-I, sans affecter la présence de l'ABCA1 à la membrane [125], [133].

Dans la deuxième théorie, on propose une interaction indirecte selon laquelle l'ABCA1 génère des microdomaines instables dans la membrane plasmique, permettant l'accommodation de l'apoA-I. L'apoA-I gagnerait des lipides par microsolvubilisation, un processus indépendant de l'ABCA1 (figure 14). Cette suggestion provient de différentes observations. L'ABCA1 mutée dans le domaine ATPase inhibe la liaison de l'apoA-I sans pour autant affecter la présence de l'ABCA1 à la membrane. Aussi, l'association de l'apoA-I à la membrane n'est pas parfaitement corrélée à la quantité d'ABCA1 présente à la membrane. Cependant, la mobilité latérale de l'ABCA1 dans la membrane est différente de celle de l'apoA-I.





**Figure 14. Trois modèles de lipodation de l'apoA-I par l'ABCA1.** **A)** Le premier modèle suggère une interaction protéine/protéine directe entre un ligand (apoA-I) et son récepteur (ABCA1). L'ABCA1 transférerait alors des lipides (PL + C) sur l'apoA-I, diminuant ainsi l'affinité entre les deux et provoquant la dissociation. **B)** Le deuxième modèle propose que l'apoA-I s'accapare des lipides dans des domaines instables de la membrane créés par l'activité phosphatidylsérine translocase de l'ABCA1. **C)** Un modèle hybride est proposé : l'apoA-I se lie à l'ABCA1 puis aux domaines riches en phosphatidylsérine (HCBS) générés par l'ABCA1. Ensuite soit l'apoA-I sera dissociée, soit internalisée avec l'ABCA1 et resecrétée, sous forme des HDL naissantes.

Un troisième modèle existe. C'est le modèle hybride des deux premiers, qui propose que l'apoA-I lie l'ABCA1 en premier pour un temps court par

l'établissement d'un contact protéine-protéine. Partiellement lipidée, l'apoA-I sera transférée vers les microdomaines générés par l'ABCA1 (HCBS). L'apoA-I suffisamment lipidée pourrait alors quitter la membrane sous la forme d'une particule discoïdale pré- $\beta$  ou HDL naissante [9]. Les résidus de l'apoA-I responsables de l'interaction avec l'ABCA1 n'ont pas encore été identifiés. Cependant, il a été proposé un rôle important de l'hélice 9 de l'apoA-I dans la liaison à l'ABCA1 [66].

Une deuxième voie a été montrée : l'endocytose du complexe ABCA1/apoA-I. Cette voie fera une partie très intéressante de cette thèse.

Avant l'identification de l'ABCA1, des études ont montré par microscopie électronique que l'apoA-I peut-être internalisée dans les puits de clathrine de macrophages dans un processus dépendant de l'AMPc [139]. Plus récemment, il a été montré par microscopie de fluorescence que l'ABCA1 transite entre des compartiments endosomaux et la membrane plasmique [140].

Finalement, utilisant la microscopie confocale, un groupe a démontré, qu'à 37 °C, l'apoA-I était d'abord internalisée avec l'ABCA1 pour ensuite être resecrétée dans le milieu [141]. Dans des macrophages murins, à 21 °C, l'interaction apoA-I/ABCA1 démontre au microscope confocal une localisation en surface et aucun efflux de cholestérol n'est détecté. Par contre, dès que les cellules sont mises à 37 °C, une internalisation se produit et l'efflux de cholestérol devient détectable [142]. Toutes ces évidences mettent le point sur une possible internalisation du complexe.

Dans les chapitres 4 et 5 nous allons fournir des évidences que la majorité de l'apoA-I n'interagit pas avec l'ABCA1 et, qu'il existe deux voies de lipidations de l'apoA-I bien distinctes : une extracellulaire et une intracellulaire.

### **II.5 Autres ligands pour l'ABCA1**

Malgré la concentration de la littérature sur l'interaction apoA-I/ABCA1, d'autres apolipoprotéines peuvent interagir avec ce fameux transporteur. Des études de surexpression de l'ABCA1 dans des cellules Hela ont démontré un efflux de cholestérol et de phospholipides (vers les apolipoprotéines A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E) de 2 à 4 fois plus important dans les cellules exprimant l'ABCA1 *versus* les cellules-contrôle. De plus, l'apoA-II a autant d'affinité que l'apoA-I pour l'ABCA1 et peut être un compétiteur pour l'association à l'ABCA1. C'est la présence d'hélices amphipatiques sur ces apolipoprotéines qui expliquerait leur capacité d'interagir avec l'ABCA1 et de faire l'efflux de lipides [145]. Par ailleurs, notre groupe a aussi étudié la capacité de l'apoE à interagir avec l'ABCA1. Nous avons révélé que l'apoE est un meilleur compétiteur que les HDL3 dans la liaison d'apoA-I/ABCA1. De plus, l'interaction apoE/ABCA1 génère des particules pré- $\beta$  LpE, ainsi qu'un efflux de cholestérol et de phospholipides dans une cinétique similaire à celle de l'apoA-I [146]. L'ABCA1 est donc une protéine aux multiples partenaires afin de débarrasser les cellules de leur surplus en lipides.

## **B- Contribution de la thèse**

### **I. Le HCBS (*High Capacity Binding Site*):**

Dans le présent ouvrage, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes de l'interaction moléculaire entre l'apoA-I et le transporteur ABCA1 qui mène à des voies de lipidation de l'apoA-I pour former des particules HDL naissantes. En première étape, nous avons identifié deux sites distincts de liaison de l'apoA-I : un site à faible affinité, qui a une capacité de liaison élevée (HCBS, non-associé avec ABCA1) et, un site à haute affinité avec une capacité de liaison basse (associé à l'ABCA1). Nos résultats indiquent qu'un ABCA1 fonctionnel est nécessaire pour la formation de ce nouveau site de liaison d'apoA-I(HCBS).

Ensuite, nous avons essayé de déterminer les caractéristiques structurales du HCBS. Nous avons montré que la phosphatidylcholine représente le composant phospholipidique principal du HCBS. Il semble que la liaison transitoire et rapide de l'apoA-I à l'ABCA1 permette des interactions suivantes avec le HCBS. Ce dernier pourrait fournir un environnement stable pour l'apoA-I sur la membrane plasmique ce qui permet l'extraction des lipides et la formation subséquente des HDL naissantes.

Dans cette thèse, nous avons fournis des évidences que l'augmentation de la liaison de l'apoA-I à l'ABCA1 a favorisé l'association de l'apoA-I au HCBS. Nos

données montrent que l'interaction initiale de l'apoA-I avec l'ABCA1 est cruciale pour l'association subséquente de l'apoA-I avec le HCBS. Le concept que l'ABCA1 peut être réutilisé pour un grand nombre de cycle de lipodation d'apoA-I afin d'assumer la lipodation de plusieurs molécules d'apoA-I par le même ABCA1 est bien favorisé par notre étude. Cependant, la région C-terminale de l'apoA-I, résidus 187-243, semble exigée pour l'association de l'apoA-I à l'ABCA1 et au HCBS.

La réaction de transfert de lipide à l'intérieur de la cellule comme partie d'une voie de retro-endocytose a été toujours controversée. Nous avons montré que deux-tiers de l'apoA-I total (associé aux cellules) a été trouvé associé à la membrane plasmique et l'un-tier est associé aux compartiments intracellulaires (CICs). Aussi, l'ABCA1 semble nécessaire pour l'association de l'apoA-I avec la MP et les CICs. Ces résultats fournissent un fort appui pour l'existence d'une voie de lipodation intracellulaire. Ils suggèrent que l'internalisation de l'ABCA1 est fonctionnellement importante en assurant la lipodation intracellulaire de l'apoA-I.

Le concept que l'ABCA1 crée un site membranaire lipidique ou des changements dans la conformation des lipides membranaires [183; 185] peut avoir des implications importantes sur la compréhension de la voie de genèse des HDL par la voie de l'ABCA1. Nos résultats soutiennent le modèle en deux étapes (*two-step model*) pour l'efflux des lipides par la voie de l'ABCA1. Toutes ces observations soulignent l'importance du transporteur ABCA1 dans la voie de la biogénèse des HDL.

## II. La voie de retro-endocytose :

Étant démontré que l'apoA-I a été trouvée associée aux CICs, la définition des caractéristiques structurales de la compartimentalisation, du transport et de la ré-sécrétion cellulaire de l'apoA-I représente le pont principal à traverser pour une meilleure compréhension de la genèse des HDL naissantes au niveau cellulaire. L'hypothèse de retro-endocytose des HDL a été proposée depuis plus de 20 ans. L'existence de deux compartiments cellulaires distincts pour la formation des HDL naissantes a été bien montrée : la membrane plasmique a une capacité double d'accommoder l'apoA-I comparé à celle des compartiments intracellulaires. Dans les deux cas, l'apoA-I ré-sécrété des CICs et/ou dissocié de la membrane plasmique, a été libéré sous forme de HDL naissantes.

Cependant, les résultats cinétiques indiquent que les CICs représentent un compartiment métaboliquement actif pour la lipidation de l'apoA-I. L'évaluation quantitative suggère un rôle important de la MP pour associer l'apoA-I et soutient l'idée que la MP représente un compartiment de lipidation indépendant. Nous avons montré que la MP puisse agir comme un point d'attachement initial pour l'apoA-I, tout en lui permettant d'être apporté à une proximité étroite pour l'interaction avec la voie d'endocytose. Cet attachement initial de l'apoA-I peut aboutir à des changements de l'organisation des phospholipides membranaires à fin de créer des nouveaux points d'attachements [183; 185] (comme le HCBS). Notre étude appui le concept que l'association de l'apoA-I avec la MP et les CICs dépend de la formation d'un complexe de haute affinité entre l'apoA-I et

l'ABCA1, ce qui permet la compartimentalisation et le transport de l'apoA-I. Réciproquement, des modifications dans la structure de l'apoA-I (comme la délétion de la région C-terminale, la lipidation de l'apoA-I) ou la présence d'un ABCA1 non fonctionnel aboutissent à l'altération de l'association de l'apoA-I avec la MP et les CICs. Pris ensemble, nos résultats indiquent que l'interaction initiale entre l'apoA-I et l'ABCA1 joue un rôle central en déterminant la compartimentalisation cellulaire et le transport subséquents de l'apoA-I, permettant de ce fait la formation des HDL naissantes dans des compartiments cellulaires différents. Nos résultats soutiennent un modèle de lipidation à deux-compartiment pour la genèse des HDL naissantes.

### **III. Le pré $\beta$ -HDL :**

Étant donné que l'apoA-I pauvre en lipide joue un rôle important dans le processus de transport du cholestérol à rebours, elle représente une cible potentielle pour des thérapies pour empêcher le développement de la maladie d'athérosclérose vasculaire. Cependant, le fait que l'apoA-I pauvre en lipide, tel que le pré $\beta_1$ -LpA-I plasmatique, a les propriétés biologiques qui le rendent même plus efficace que l' $\alpha$ -HDL mature dans la prévention ou la régression de l'athérosclérose est actuellement le sujet de beaucoup d'investigations.

Nos résultats prouvent que les pré $\beta_1$ -LpA-I natives et les pré $\beta_1$ -LpA-I-Like ont une capacité beaucoup plus grande de lier l'ABCA1 que le HDL-3. Cependant,

l'apoA-I libre interagit avec l'ABCA1 d'une manière semblable que les particules pré $\beta_1$ -LpA-I-Like. Ceci est acceptable du fait que le pré $\beta_1$ -LpA-I a été proposé comme le premier accepteur du cholestérol dérivé des cellules ([18,26] Chap.5). Ces résultats montrent que l'augmentation spécifique des particules pré $\beta_1$ -LpA-I-Like après le traitement du plasma avec le DMPC est associée à une augmentation significative de la capacité du plasma traité de favoriser l'efflux de cholestérol par la voie de l'ABCA1. Nous avons, alors, assumé que les particules pré $\beta_1$ -LpA-I-Like contribuent d'une manière significative au relâchement du cholestérol par la voie de l'ABCA1.

Les résultats de notre étude semblent raisonnablement consistants avec le concept que les particules pré $\beta_1$ -LpA-I ou l'apoA-I pauvre en lipide sont le substrat préféré pour le transporteur ABCA1 *in vitro*. D'une manière intéressante, les changements structuraux des HDL plasmatiques par le DMPC ont eu comme conséquence la redistribution de l'apoA-I du plasma en faveur de la fraction d'apoA-I pauvre en lipide, permettant un relâchement plus efficace du cholestérol par la voie de l'ABCA1.



## C- Conclusion

L'homéostasie du cholestérol chez l'humain est assurée par le métabolisme des lipoprotéines. Parmi ces dernières, les HDL assument un rôle particulièrement important dans le transport à rebours du cholestérol. L'apoA-I, la composante protéique majeure la plus importante des HDL, représente le substrat préféré par l'ABCA1 dans le processus de la biogénèse des HDL.

La compréhension des voies par lesquelles l'ABCA1 transfère des lipides sur l'apoA-I pour former les HDL est une étape cruciale à fin d'établir des stratégies potentielles pour prévenir les maladies cardiaques. C'est dans cette direction que cette thèse a été entreprise. Le rôle des pré- $\beta$ -HDL et leur implication dans l'efflux du cholestérol par la voie d'ABCA1 ont été pareillement investigués.

## Chapitre II

### Énoncé du projet

#### II.1 Introduction

Les niveaux élevés de LDL-cholestérol et des niveaux bas de HDL-cholestérol se trouvent parmi les facteurs de risque connus pour qui favorisent les maladies cardiovasculaires. Les patients atteints de la maladie de Tangier présentent des niveaux de HDL très bas ainsi que des problèmes cardiovasculaires précoces. Notre laboratoire s'intéresse depuis les quinze dernières années à un phénotype de sévérité intermédiaire, mais semblable à celui des patients de Tangier : la déficience familiale en HDL (FHD).

Des études d'efflux de cholestérol réalisées à l'aide de fibroblastes cutanés de ces patients ont révélé que le processus de lipidation de l'apolipoprotéine A-I y était défectueux.

Récemment, le gène encodant le transporteur « ATP-binding cassette A1 » (ABCA1) a été identifié comme responsable de la maladie de FHD/Tangier. Les transporteurs ABC utilisent l'hydrolyse d'ATP comme source d'énergie pour effectuer le transport actif de molécules variées. Il est bien accepté que l'ABCA1 transporte le cholestérol vers la membrane externe et facilite l'efflux de lipides vers l'apoA-I aboutissant à la génèse des particules HDL naissantes. Ce processus est connu sous le nom de transport à rebours du cholestérol (« reverse cholesterol transport »). Chez les patients avec la maladie de FHD/Tangier, ce processus est altéré.

## II.2 Notre modèle d'étude

Depuis plusieurs années, notre laboratoire utilise des fibroblastes humains obtenus par biopsies cutanées des patients. Ce modèle comporte plusieurs avantages :

### *Accessibilité et maintenance ex vivo*

Il s'agit d'un type cellulaire facile à obtenir. La biopsie cutanée est une procédure mineure ne laissant qu'une très petite cicatrice. De plus, la culture *ex vivo* des fibroblastes dans un pétri facilite leur utilisation à plusieurs reprises comme toutes les lignées cellulaires. Le seul désavantage est le rendement de transfection très faible.

### *Homéostasie cellulaire*

Dans les fibroblastes, le contrôle de l'homéostasie du cholestérol est relativement simple. Le cholestérol peut provenir des LDL captés et endocytés par leur récepteur de la surface membranaire. Il peut aussi provenir de la biosynthèse *de novo* ou être stocké sous forme estérifiée dans le réticulum endoplasmique. L'ABCA1 est très faiblement exprimé dans le fibroblaste; elle peut être induite par l'activation des voies de signalisation LXR/RXR. En plus, l'ABCA1 est le seul transporteur exprimé dans les fibroblastes, ce qui est un désavantage dans les macrophages qui possèdent, en plus, des récepteurs de lipoprotéines oxydées et le récepteur SR-BI. Finalement, dans l'hépatocyte, le

phénomène devient plus compliqué du fait qu'il possède deux voies additionnelles pour se débarrasser du cholestérol : la sécrétion sous forme d'acides biliaires et la production de VLDL.

### *Les BHKs*

Pour mieux valider et soutenir notre étude, nous avons utilisés des cellules BHK (Baby Hamster Kidney) transfectées par l'ADNc de l'ABCA1. L'expression de l'ABCA1 dans ces cellules est inductible par le *mifepristone* ([15,16] Chap. 3).

### **II-3 Questions posées**

Il est bien accepté bien que l'apoA-I et le transporteur ABCA1 jouent des rôles cruciaux dans la biogénèse des HDL. La lipidation de l'apoA-I par l'ABCA1 suppose une interaction entre les deux molécules. Deux modèles sont proposés pour expliquer cette interaction. Dans le premier, aucune interaction physique entre les deux molécules n'est requise et l'apoA-I devient lipidée par contact avec les domaines lipidiques générés par l'ABCA1. Dans le deuxième modèle, l'ABCA1 transfère activement des lipides sur l'apoA-I pendant une interaction directe protéine/protéine. Cependant, la nature et les détails des interactions apoA-I/ABCA1 demeurent mal compris.

Afin de déterminer la nature de l'interaction entre l'apoA-I et l'ABCA1, nous avons posé la question :

**1) Quels sont les sites cellulaire de liaison de l'apoA-I et, sont-ils dépendants de l'ABCA1?**

On considère que la lipodation de l'apoA-I se produit à l'intérieur de la cellule comme partie d'une voie de retro-endocytose. Le concept de Smith et collègues est d'intérêt particulier : l'efflux cellulaire du cholestérol implique l'endocytose et la resécrétion de l'apoA-I.

Cependant, il n'est pas clair, si l'apoA-I solubilise un domaine membranaire qui est créé par l'ABCA1 ou si le complexe apoA-I/ABCA1 doit agir l'un sur l'autre directement et être internalisées ensemble pour la formation suivante des HDLs naissantes. Cette information est critique à l'évaluation continue si la membrane plasmique ou les compartiments intracellulaires représentent les sites cellulaires actifs pour la lipodation de l'apoA-I. Bien qu'il soit bien accepté que la voie de retro-endocytose joue un rôle important dans la formation des particules HDLs naissantes, les causes déterminantes structurales régissant la dynamique de la lipodation de l'apoA-I à différents sites cellulaires n'ont pas été encore élucidées. Nous avons posé la question :

**2) Quelles sont les voies de lipodation de l'apoA-I par l'ABCA1, et quel est le niveau d'importance occupé par chacune de ces voies?**

Les premières études par Fielding et collègues ont documenté qu'une sous-classe mineure des HDLs humaines, qui migre en position pré- $\beta$  sur des gels d'agarose, peut éliminer le cholestérol libre des fibroblastes en culture plus rapidement que les HDLs qui migrent en position  $\alpha$ , qui constituent la partie majeure des HDLs plasmatiques. En outre, il a été documenté que les particules pré- $\beta$  -HDL étaient présentes dans la lymphe périphérique des chiens suggérant

un rôle principal pour ces particules dans le déplacement initial du cholestérol. Ceci est conforme avec le concept de Hara et Yokoyama dans lequel l'apoA-I libre ou pauvre en lipide interagit avec un site sur la membrane cellulaire, enlève des lipides cellulaires, et génère des particules naissantes de pré- $\beta$ -HDL. Plus tard, les particules de pré- $\beta$ -HDL deviennent matures, sphériques, et aillent une migration en position  $\alpha$  sur un gel d'agarose par l'action de la LCAT, qui convertit le cholestérol libre en cholestéryl ester. D'ailleurs, ce concept est soutenu par des études démontrant que les particules pré- $\beta$ -HDL agissent en tant que premier accepteur de cholestérol cellulaire, le transfèrent dans des séries de particules pré- $\beta$  plus grandes, et finalement vers des particules en migration  $\alpha$ .

Malgré l'importance des particules de lipoprotéines pré- $\beta$ 1-apoA-I (LpA-I) dans le transport à rebours du cholestérol, très peu est connu au sujet de leur contribution dans la voie d'efflux du cholestérol ABCA1-dépendante dans le plasma humain. Nous avons posé la question :

**3) Par quelle voie les particules de pré $\beta$ -HDL contribuent au mécanisme du transport à rebours du cholestérol (« reverse cholesterol transport »)?**

C'est à ces trois questions que les chapitres suivants tentent successivement de répondre. Toutefois, comme il est impossible de répondre parfaitement à chaque question, et que des réponses incomplètes soulèvent toujours de nouvelles questions, le sixième chapitre proposera un sommaire des résultats obtenus et discutera des nouveaux intérêts suscités.

## Chapitre III

### Article #1 \*

#### 1. Contexte de travail

Il est bien accepté bien que l'apoA-I et le transporteur ABCA1 jouent des rôles cruciaux dans la biogénèse des HDL. La lipidation de l'apoA-I par l'ABCA1 suppose une interaction entre les deux molécules. Deux modèles sont proposés pour expliquer cette interaction. Dans le premier, aucune interaction physique entre les deux molécules n'est requise et l'apoA-I devient lipidée par contact avec les domaines lipidiques générés par l'ABCA1. Dans le deuxième modèle, l'ABCA1 transfère activement des lipides sur l'apoA-I pendant une interaction directe protéine/protéine. Cependant, la nature et les détails des interactions apoA-I/ABCA1 demeurent mal compris.

C'est dans ***le but d'étudier les sites cellulaires de liaison de l'apoA-I et leur dépendance de l'ABCA1*** que le travail a été entrepris (dans un système cellulaire).

Dans l'article suivant,

**Houssein Hajj Hassan et Maxime Denis** ont fait la majeure partie du travail et ont écrit le manuscrit.

**Dong-Young Donna Lee, Iulia Iatan, Dana Nyholt et Isabelle Ruel** ont aidé dans la culture des cellules et la manipulation des expériences.

**Larbi Krimbou** aco-écrit le manuscrit.

**Jacques Genest** a supervisé le travail.

**Identification of an ABCA1-Dependent Phospholipid-Rich Plasma Membrane Apolipoprotein A-I Binding Site for Nascent HDL Formation: Implications for Current models of HDL Biogenesis**

**Houssein Hajj Hassan\*, Maxime Denis\*, Dong-Young Donna Lee, Iulia Iatan, Dana Nyholt, Isabelle Ruel, Larbi Krimbou and Jacques Genest**

J Biol Chem. 2008 Apr 25; 283(17):11164-75. Epub 2008 Jan 24

\* These authors contributed equally to this work

From the Cardiovascular Genetics Laboratory, Cardiology Division, McGill University Health Centre / Royal Victoria Hospital, Montréal, Québec H3A 1A1, Canada

**Running title: ApoA-I interaction with the HCBS**



**ABSTRACT**

It is well accepted that both apolipoprotein A-I (apoA-I) and the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) play crucial roles in HDL biogenesis and in the human atheroprotective system. However, the nature and specifics of apoA-I/ABCA1 interactions remain poorly understood. Here is presented evidence for a new cellular apoA-I binding site having a 9-fold higher capacity to bind apoA-I as compared to the ABCA1 site in fibroblasts stimulated with 22OH/9CRA. This new cellular apoA-I binding site was designated “high capacity binding site” (HCBS). Glyburide drastically reduced  $^{125}\text{I}$ -apoA-I binding to the HCBS, whereas  $^{125}\text{I}$ -apoA-I showed no significant binding to the HCBS in ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts. Furthermore, reconstituted HDL exhibited reduced affinity for the HCBS. Deletion of the C-terminal region of apoA-I ( $\Delta 187$ -243) drastically reduced the binding of apoA-I to the HCBS. Interestingly, overexpressing various levels of ABCA1 in BHK cells promoted the formation of the HCBS. The majority of the HCBS was localized to the plasma membrane and was not associated with membrane raft domains. Importantly, treatment of cells with phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC), but not sphingomyelinase, concomitantly reduced the binding of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to the HCBS, apoA-I-mediated cholesterol efflux and the formation of nascent apoA-I-containing particles. Altogether these data suggest that a functional ABCA1 leads to the formation of a major lipid-containing site for the binding and the lipidation of apoA-I at the plasma membrane. Our results provide a biochemical

basis for the HDL biogenesis pathway that involves both ABCA1 and the HCBS, supporting a two-binding site model for ABCA1-mediated nascent HDL genesis.

**Keywords:** ApoA-I, ABCA1, HDL, apoA-I binding sites, nascent HDL

## **ABBREVIATIONS**

**22OH**, 22-(R)-hydroxycholesterol; **9CRA**, 9-cis-retinoic acid; **2D-PAGGE**, two-dimensional polyacrylamide non-denaturing gradient gel electrophoresis; **ABCA1**, ATP binding cassette A1; apo, apolipoprotein; **BSA**, Bovine serum albumin; **DSP**, dithiobis(succinimidylpropionate); **DTT**, dithiothreitol; **FC**, free cholesterol; **HDL**, high density lipoprotein; **HCBS**, high capacity binding site; **ICCs**, intracellular compartments; **LpA-I**, nascent apoA-I-containing particle; **PL**, phospholipids; **PC**, phosphatidylcholine; **PM**, plasma membrane; **RCT**, reverse cholesterol transport; **TD**, Tangier disease.

## INTRODUCTION

A growing body of evidence indicates that both apoA-I and the ATP-binding cassette transporter (ABCA1) not only play a major role in HDL biogenesis and in the reverse cholesterol transport (RCT) process, but have also emerged as potential targets for therapies designed to inhibit the development of atherosclerotic vascular disease (1,2). Therefore, there is a strong scientific rationale for a clear understanding of the mechanisms and molecular pathways underlying apoA-I lipidation process and especially the mechanistic basis of lipid-free apoA-I interaction with ABCA1.

ApoA-I binding to the extracellular domain of the ABCA1 transporter results in the active removal of cellular cholesterol and phospholipids to lipid-poor apolipoproteins from a variety of cells (3,4). This process plays crucial roles in both the formation and maintenance of HDL levels in plasma and is likely important for the first step of the RCT process from peripheral tissues, including macrophages in the vessel wall (5).

Although the molecular basis for the interaction between ABCA1 and apoA-I has yet to be elucidated, there are two prevailing hypotheses describing the interaction. First, the direct association model proposes that ABCA1 acts as a receptor to which the apoA-I ligand binds directly. This direct interaction is proposed to stimulate ABCA1's cholesterol efflux activity, resulting in the transfer of cholesterol and phospholipids onto the acceptor apolipoprotein. Evidence for the direct association model comes from chemical cross-linking studies performed in our laboratory and others, which indicate that apoA-I and ABCA1

are in very close proximity ( $<7 \text{ \AA}$ ) (6,7,8,9). A second model has been proposed suggesting that ABCA1 acts by flipping phospholipids to the outer leaflet of the plasma bilayer. Subsequently, apoA-I is proposed to bind these translocated phospholipids and then extract both phospholipid and cholesterol in a process that requires no direct interaction between the apolipoprotein and ABCA1 (10,11). This view gained support from studies showing that an intact ABCA1 ATPase activity was required for apoA-I binding to the cell surface (10). On the other hand, it has been suggested that the ABCA1-mediated apoA-I lipidation process may occur inside the cell as a part of a retroendocytosis pathway (12,13). These contrasting models demonstrate that the molecular mechanism by which ABCA1 mediates the lipidation of apoA-I has yet to be clarified.

In the present study, we investigate the structural characteristics of cellular binding sites for apoA-I and their functions related to the biogenesis of nascent HDL particles.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients' selection** — For the present study, we selected fibroblasts from 3 normal control subjects and 1 patient with TD (homozygous for Q597R at the ABCA1 gene) as previously described (14). The protocol for the study was reviewed and accepted by the Research Ethics Board of the McGill University Health Center. Separate consent forms for blood sampling, DNA isolation and skin biopsy were provided.

**Cell culture** — Human skin fibroblasts were obtained from 3.0 mm punch biopsies of the forearm of patients and healthy control subjects and were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 0.1% nonessential amino acids, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% fetal bovine serum (FBS). BHK cells stably transfected with an ABCA1 cDNA that is inducible by treating the cells with mifepristone and cells transfected with the same vectors lacking the ABCA1 cDNA insert (mock-transfected) were generously provided by Dr. John F. Oram from the Department of Medicine, University of Washington and were characterized and cultured as described previously (15,16). These BHK cells do not normally express ABCA1.

**Purified apoA-I** — Purified plasma apoA-I (Biodesign) was resolubilized in 4M guanidine HCL and dialyzed extensively against PBS buffer. Freshly resolubilized apoA-I was iodinated with <sup>125</sup>Iodine by IODO-GEN® (Pierce) to a specific activity of 3000 to 3500 cpm/ng apoA-I and used within 48 h. Expression of wild type (WT) apoA-I and its mutants in a bacterial system, and the isolation

and purification of these proteins have been described previously by Marcel and colleagues (17). Deletion mutant apoA-I  $\Delta(187-234)$  was provided by Dr Yves L Marcel.

***Preparation of reconstituted HDL particles r(HDL)*** — Complexes comprising apoA-I and POPC, were prepared using the sodium cholate dialysis method as described by Jonas and colleagues (18). ApoA-I / POPC molar ratio of 1:100 was used in this experiment. r(HDL) particles were further concentrated by ultrafiltration (spiral ultrafiltration cartridge, MWCO 50,000, Amicon) to discard any lipid-free apoA-I or proteolytic peptides. ApoA-I-lipid complex formation was verified by analysis with 2D-PAGGE as we have previously described (19).

***Quantitative chemical cross-linking, and immuno-precipitation (IP) assay*** — Fibroblasts were grown to confluence in 100 mm diameter dishes and then stimulated with 2.5  $\mu\text{g/mL}$  22-(R)-hydroxycholesterol and 10  $\mu\text{M}$  9-*cis*-retinoic acid for 20 h in DMEM / BSA. BHK cells stably expressing ABCA1 or mock were treated or not with mifepristone as described by Oram and colleagues (15,16). Cells were incubated in the presence of 10  $\mu\text{g/mL}$  of apoA-I for various periods of time or increasing concentrations of apoA-I. Cells were then washed three times with PBS. DSP; dithiobis(succinimidylpropionate) was dissolved immediately before use in dimethyl sulfoxide (DMSO). The cross-linking reaction was performed at room temperature in 6 mL/dish of cross-linking solution for 30 min using 1 mM DSP as described by Tall and colleagues (20). Cells were then washed twice with PBS and lysed at 4°C with IP buffer containing 20 mM Tris (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% dodecylmaltoside (Roche) in pres-

ence of a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Inactivation of the cross-linker was done by addition of Tris pH 7.5 to a final concentration of 20 mM. Samples containing  $^{125}\text{I}$ -apoA-I cross-linked to ABCA1 (200  $\mu\text{g}$  total protein) were incubated with 10  $\mu\text{L}$  of an affinity-purified human anti-ABCA1 antibody (Novus) for 20 h at 4°C, followed by the addition of Protein A bound to sepharose (30  $\mu\text{L}$ ). The amount of bound iodinated apoA-I to ABCA1 (immunoprecipitates) or non-ABCA1 associated (supernatants) was determined by gamma counting, protein concentration was determined, and results were expressed as ng apoA-I/ $\mu\text{g}$  cell protein. However, both the incomplete cross-linking and immunoprecipitation of apoA-I/ABCA1 complex may result in an inaccurate quantification. Several controls were performed to verify this important point. Different conditions of cross-linking and immuno-precipitation were used. Furthermore, we found that the cross-linking is effectively completed by 10 min, using 1mM DSP.

**Cellular cholesterol efflux** — Cholesterol efflux was determined as previously described (9) with minor modifications. Briefly, 50 000 cells were seeded in 12-well plates. At mid-confluence, the cells were labeled with 4-8  $\mu\text{Ci/mL}$   $^3\text{H}$ -cholesterol (Perkin Elmer) for 24 h. At confluence, cells were cholesterol-loaded (20  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. During a 24 h equilibration period, cells were stimulated with 2.5  $\mu\text{g/mL}$  of 22 (R)-hydroxycholesterol and 10  $\mu\text{M}$  of 9-*cis*-retinoic acid for 20 h. Cholesterol efflux were determined at either 2 h or 4 h with either 10  $\mu\text{g/mL}$  apoA-I, HDL<sub>3</sub> or 3  $\mu\text{g/mL}$  apoA-I $\Delta$ (187-243). Cellular cholesterol efflux

was determined as follow:  $^3\text{H}$  cpm in medium/ $(^3\text{H}$  cpm in medium +  $^3\text{H}$  cpm in cells); the results were expressed as % of total radiolabeled cholesterol.

**Cell surface biotinylation** — Confluent fibroblasts were stimulated with 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  22(R)hydroxycholesterol and 10  $\mu\text{M}$  9-*cis*-retinoic acid for 20 h. BHK cells stably expressing ABCA1 or mock were treated or not with mifepristone. Cells were incubated in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of apoA-I for various time periods or for 45 min at 37°C with increasing concentrations of apoA-I. Cells were then washed three times with PBS and then surface proteins were biotinylated with 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sulfosuccinimidyl 2-(biotinamido)-ethyl-1,3-dithiopropionate (Pierce) for 30 min at 4 °C. The biotinylation reaction was quenched for 10 min at 4 °C by addition of 1 M Tris-HCl (pH 7.5) to the reaction mixture to a final concentration of 20 mM. Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed, homogenized, and 200  $\mu\text{g}$  of protein was added to 30  $\mu\text{l}$  of streptavidin-Sepharose (Amersham Biosciences) beads and incubated overnight on a platform mixer at 4°C. The pellet (plasma membrane) or supernatant (intracellular compartments) are washed two times with immunoprecipitation buffer and directly counted for radioactivity. To verify whether the biotinylation of surface protein is complete under conditions used in the present experiment, the amount of biotin was increased up to 2 mg/mL. No significant additional association of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I with both the PM or ICC was observed.

**Treatment with phospholipases** — Confluent fibroblasts were incubated for 45 min in DMEM containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $^{125}\text{I}$ -apoA-I. After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were subjected to treatment with 2.5 U/mL



phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) or 0.4 U/mL sphingomyelinase (SMase) (Sigma) for 30 min at 37 °C. Following washes, cells were treated for cross-linking or cell surface biotinylation as described above. Cell membrane integrity and cellular toxicity under treatment with phospholipases were assessed by leakage of [<sup>3</sup>H]adenine (21).

***Triton X-100 cell solubilization*** — Cells were separated into TX-100 soluble and insoluble fractions as previously described (22). Briefly, confluent 22OH/9CRA-stimulated cells were washed in PBS and then scraped into MES-buffered saline (25 mM MES, pH 6.5, 0.15 M NaCl) containing 1% Triton X in presence of a protease inhibitor cocktail. The suspension was homogenized, kept on ice for 20 min, and centrifuged at 14,000x *g*, for 20 min at 4 °C. The supernatant (containing the TX-100 soluble fraction) was removed and the pellet was suspended in TX-100 buffer containing HEPES (pH 7.4) instead of MES and incubated at room temperature for 30 min to solubilize rafts. The amount of <sup>125</sup>I-apoA-I associated with the supernatants or pellets was determined by gamma counting. Aliquots of the supernatant and solubilized pellet were used for immunoblots and ABCA1 immunoprecipitation.

***Other Methods*** — Removal of lipid-free apoA-I from nascent apoA-I-containing particles (LpA-I) and separation of lipoproteins by two-dimensional non-denaturing gradient gel electrophoresis (2D-PAGGE) were performed as we have previously described (19, 23).

***Statistical analysis*** — Results are compared statistically by the t-test. Two-tailed *p* values < 0.05 were considered as significantly different.

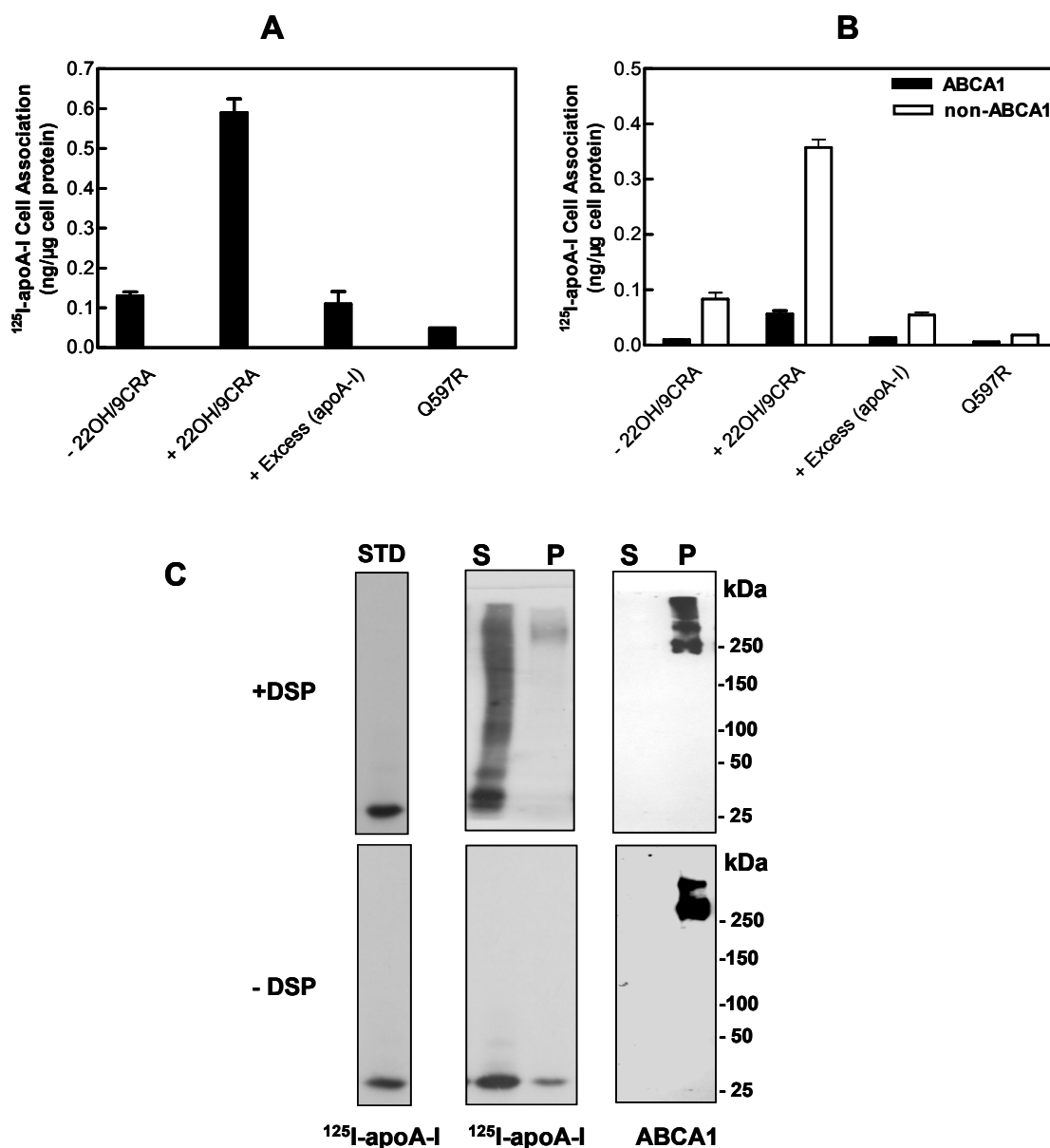
## RESULTS

**Development of a Quantitative Binding Assay for ApoA-I** — To examine the interaction between apoA-I and ABCA1 in a cell culture model, we first developed a quantitative assay based on optimal chemical cross-linking of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to ABCA1 with the cell-permeable dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP) followed by immunoprecipitation of the complex with an affinity-purified polyclonal anti-ABCA1 as described in “Methods”. The amount of bound iodinated apoA-I to ABCA1 (immunoprecipitates) or  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, non-associated with ABCA1 (supernatants) was determined by  $\gamma$ -counting. As shown in Fig. 1B,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was incubated with intact 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts for 45 min at 37°C, followed by cross-linking and immunoprecipitation with an anti-ABCA1 antibody. Unexpectedly, the majority of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was found non-associated with ABCA1. We have assumed that the cross-linking reaction was complete based on the results obtained with different concentrations and time of incubation with DSP (see Methods). Therefore, the concentration of 1 mM DSP and incubation time period of 30 min as well as 10  $\mu\text{l}$  of ABCA1 antibody for the immunoprecipitation were used throughout the present study. Importantly, a period of 45 min incubation of apoA-I with cells was chosen to permit sufficient time for equilibration of apoA-I with different cellular compartments without interfering with the completion of the cross-linking reaction. It is possible, however, that the majority of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I found non-associated with ABCA1 reflect the inefficiency of the cross-linking procedure. Several controls were performed to verify this important point. Transferrin (Tf) a ligand that is known to

specifically interact with the transferrin receptor (TfR) was used to verify the efficiency of the cross-linking reaction.  $^{125}\text{I}$ -Tf was incubated with HepG2 for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , followed by cross-linking with DSP (1mM, 30 min) and immunoprecipitation of the cross-linked  $^{125}\text{I}$ -Tf/TfR complex using polyclonal anti-TfR antibody. We found that 92% of  $^{125}\text{I}$ -Tf co-immunoprecipitated with the TfR antibody (data not shown). This result supports the efficiency of the cross-linking reaction under similar conditions used for the cross-linking of apoA-I/ABCA1 as described above.

The ApoA-I/ABCA1 cross-linking assay permitted the separation between the ABCA1 binding site and other eventual potential cellular site for the binding of apoA-I, such as SR-BI, ABCG1 or specialized phospholipid membrane domains. However, there is no detectable presence of SR-BI or ABCG1 in human fibroblasts as reported previously (24). To test the specificity of the cross-linking and immunoprecipitation methods, the presence of a 30-fold excess of unlabeled apoA-I during incubation of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I with 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts, the absence of 22OH/9CRA treatment or ABCA1 mutant fibroblasts (Q597R) reduced drastically the larger fraction of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, non-associated with ABCA1 (Fig.1B). Furthermore, the minor fraction of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with ABCA1 was also reduced. This result is consistent with the total binding of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to the cell under different conditions (Fig. 1A). The observation that the presence of ABCA1 mutant (Q597R) abolished the association of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to both  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated and non-associated with ABCA1 fractions indicate that a functional ABCA1 is required for the formation of the larger fraction of  $^{125}\text{I}$ -

apoA-I, non-associated with ABCA1. To verify that the immunoprecipitates contained the majority of ABCA1, the immunoprecipitates (P) and supernatants (S) of 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts in the presence and absence of DSP were analyzed by 4-22.5% SDS-PAGE under non-reducing conditions.  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was detected by direct autoradiography and ABCA1 was revealed by an anti-ABCA1 antibody. As shown in Fig. 1C (upper panel), in the presence of DSP the majority of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was found in the supernatants as a monomeric and multimeric forms, whereas a minor proportion of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was found associated with ABCA1 in the immunoprecipitates (P). At the same time, no detectable ABCA1 was found in the supernatants (S) and the majority of the oligomeric ABCA1 complex was found in the immunoprecipitates (P), including the tetramers as previously reported (25,26).  $^{125}\text{I}$ -apoA-I treated with DSP in the absence of the cell was used as a standard (STD). On the other hand, both  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated or not with ABCA1 was found in its monomeric form in the absence of DSP (Fig. 1C, lower panel). This result is consistent with a quantitative analysis reported in Fig. 1B. The fact that the majority of ABCA1 was immunoprecipitated with the anti-ABCA1 antibody in the absence or presence of DSP indicates that the cross-linking with DSP did not affect the interaction of ABCA1 with the antibody. Taken together, these results support the specificity and the efficiency of both the cross-linking and immunoprecipitation methods and validate our quantitative assay.



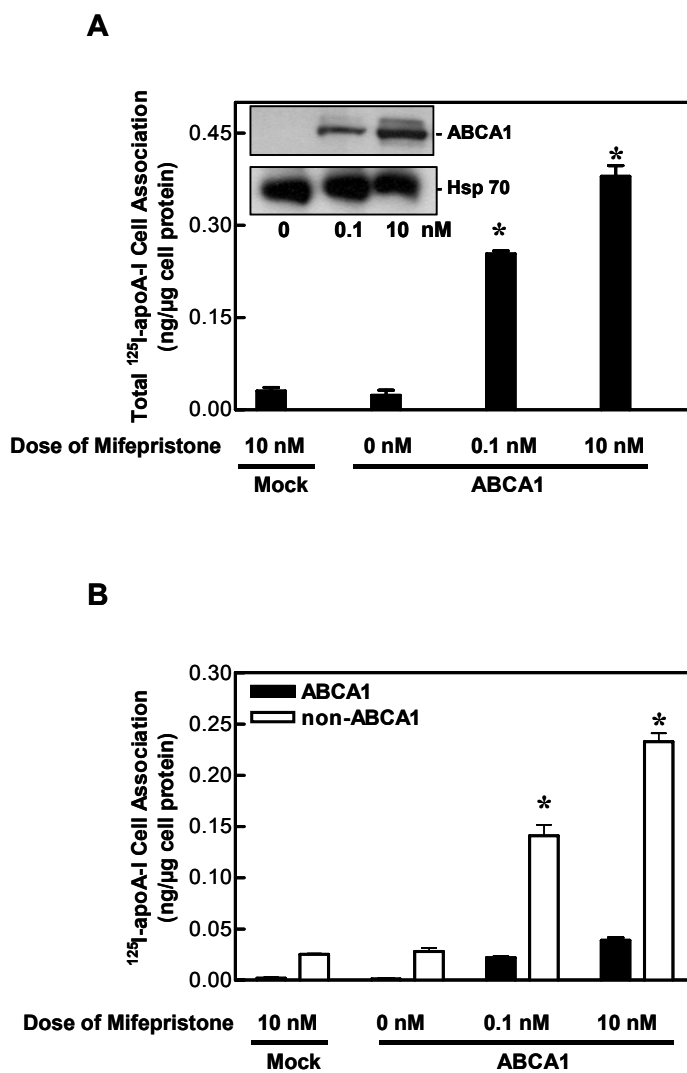
**Figure 1. Lipid-free apoA-I binding to ABCA1 and non-ABCA1 binding sites determined by quantitative cross-linking and immunoprecipitation assay. A,** confluent unstimulated, 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts and ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I in the presence or absence of 30-fold excess of unlabeled apoA-I (+ Excess) for 45 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were submitted the DSP cross-linker (1mM, 30 min). Prior to lysis, a fraction of cell lysate was directly counted for the determination of total  $^{125}\text{I}$ -apoA-I binding to the cells. **B,** samples containing  $^{125}\text{I}$ -apoA-I cross-linked to ABCA1 (200  $\mu\text{g}$  total protein) were incubated with 10  $\mu\text{L}$  of affinity-purified human anti-ABCA1

antibody. The radioactivity found in pellets (ABCA1-associated) and in supernatants (ABCA1 non-associated) was determined by  $\gamma$ -counting as described in “Methods”. **C (upper panel)**, both the supernatants (S) and pellets (P) from  $^{125}\text{I}$ -apoA-I incubated with 22OH/9CRA-stimulated normal fibroblasts as described in **(B)**, as well as  $^{125}\text{I}$ -apoA-I incubated in the presence of 1 mM DSP for 30 min without cells, used as a standard (STD), were loaded on a 4-22.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane.  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was detected by direct autoradiography and ABCA1 was revealed by an anti-ABCA1 antibody. **C (lower panel)**, similar experiments described in upper panel were conducted in the absence of DSP. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Results shown are representative of four independent experiments.

### **Overexpressing Various Levels of ABCA1 in BHK Cells Promoted the Formation of the Putative non-ABCA1 Binding Site** —

Based on the experiments described above, we initially hypothesized that apoA-I non-associated with ABCA1 may represent a new cellular apoA-I binding site. To further examine the role of ABCA1 in mediating the formation of this new, non-ABCA1, apoA-I binding site, different levels of ABCA1 were overexpressed in BHK cells with a mifepristone-inducible ABCA1 gene (15,16). As shown in Fig 2A (inset), in absence of induction, BHK-ABCA1 cells had no detectable ABCA1 protein, whereas cells induced with 0.1 and 10 nM mifepristone for 20h expressed increasing levels of ABCA1 in a dose-dependent manner. Concomitantly, cellular cholesterol efflux was significantly increased ( $2 \pm 0.35$  %,  $8 \pm 0.22$  % and  $13 \pm 0.68$  %; 0, 0.1 and 10 nM mifepristone; respectively). At the same time, the total binding of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was also increased significantly with increasing the dose of mifepristone (Fig. 2A). On the other hand, the putative non-ABCA1, apoA-I binding site was significantly increased following induction with 10 nM

mefipristone as compared to 0.1 nM (Fig. 2B). Similarly, the smaller fraction of apoA-I associated with ABCA1 was also increased. These results support the data obtained with 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts and indicate that ABCA1 is involved in the formation of the new putative non-ABCA1, apoA-I binding site.



**Figure 2. ABCA1 expression promoted the formation of a non-ABCA1, apoA-I binding site.** **A**, mock or transfected BHK cells were treated or not with 0.1 or 10 nM mifepristone for 20 h. Cells were incubated with 10 μg/mL of <sup>125</sup>I-apoA-I for 45 min at 37 °C. After washing to remove unbound <sup>125</sup>I-apoA-I, cells were submitted to DSP (1mM, 30 min). Prior to lysis, a fraction of cell lysate was directly counted for the determination

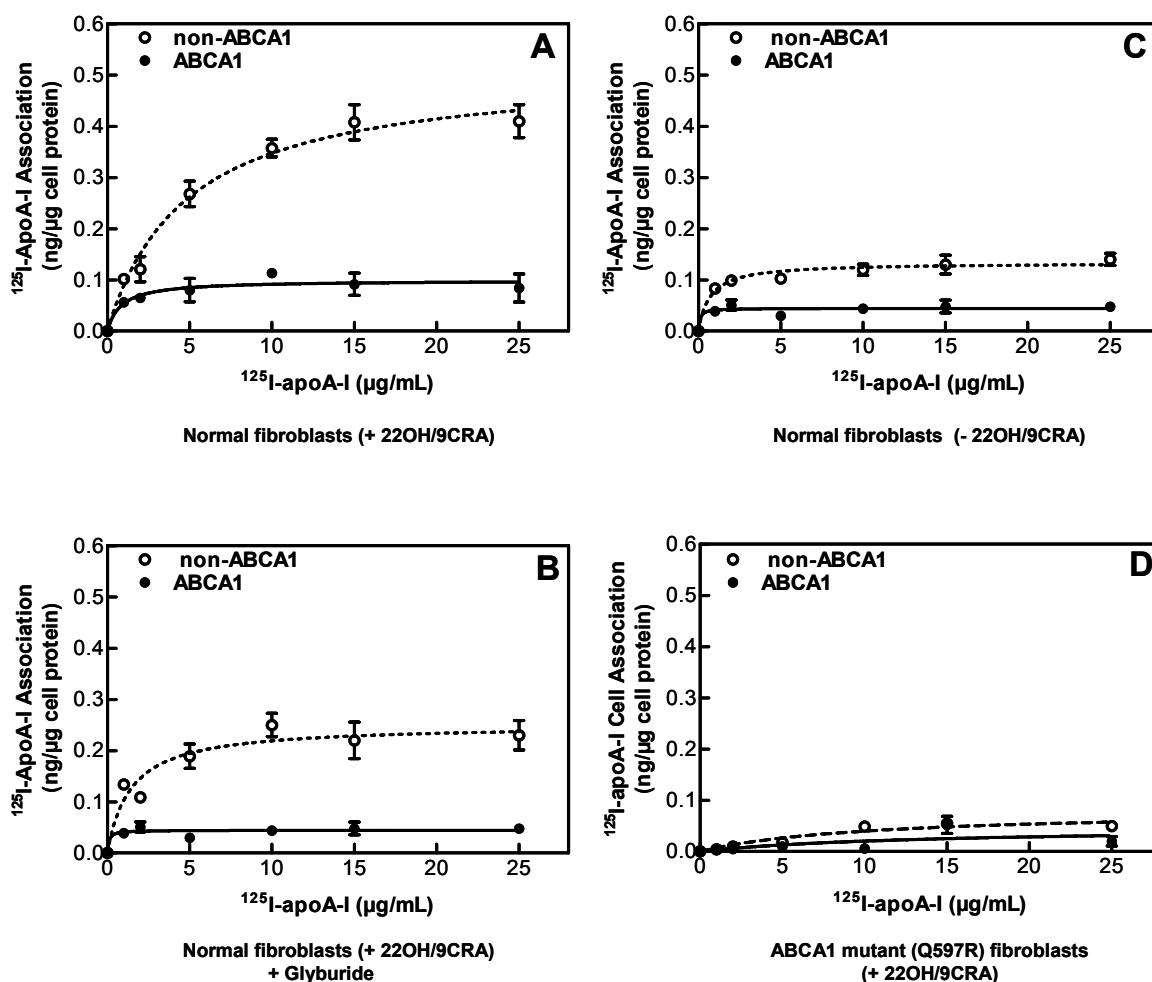
of total  $^{125}\text{I}$ -apoA-I binding to the cells. The *inset* shows the separation by SDS-PAGE of equal amounts of cell protein (40  $\mu\text{g}$ ) of ABCA1-transfected cells treated or not with 0.1 or 10 nM mifepristone for 20 h. ABCA1 was detected with an ABCA1 antibody. Cytosolic protein Hsp 70 serves as a loading control. **B**, samples containing  $^{125}\text{I}$ -apoA-I cross-linked to ABCA1 (200  $\mu\text{g}$  total protein) were incubated with 10  $\mu\text{L}$  of affinity-purified human anti-ABCA1 antibody. The radioactivity found in pellets (ABCA1-associated) and in supernatants (ABCA1 non-associated) was determined by  $\gamma$ -counting. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Results shown are representative of two independent experiments.

### **Affinity Binding of ApoA-I to the putative non-ABCA1 Binding Site (HCBS)**

— To better characterize the new binding site for apoA-I, either intact normal fibroblasts treated or not with 22OH/9CRA, or ABCA1 mutant (Q597R) were incubated with increasing concentrations of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C. After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cross-linking, immunoprecipitation and quantification of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated or not with ABCA1 were performed as described above. As shown in Fig. 3A,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I exhibited saturable binding to both ABCA1 and non-ABCA1 binding sites that was found to occur in a concentration-dependent manner in 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts, whereas glyburide drastically reduced apoA-I binding to both sites (Fig. 3B). Furthermore, in the absence of 22OH/9CRA treatment, apoA-I exhibited reduced binding to both sites (Fig. 3C). At the same time, ABCA1 mutant fibroblasts (Q597R) showed no significant binding to both sites (Fig. 3D). We have previously reported that the present ABCA1 mutant did not bind apoA-I, but was expressed normally and localized to the cell surface (9, 27). Interestingly, kinetic analysis revealed that the apparent binding capacity ( $B_{\text{max}}$ )



of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to the non-ABCA1 binding site in stimulated fibroblasts (Fig. 3A) was at least 9 orders of magnitude higher than that of ABCA1 binding site, whereas apoA-I exhibited near a 2-fold higher affinity for ABCA1 than the non-ABCA1 binding site (Table 1). These results suggest that ABCA1 creates a new cellular “high capacity binding site” (HCBS) for the binding of apoA-I.



**Figure 3. Effect of 22OH/9CRA and glyburide on the association of apoA-I to ABCA1 and non-ABCA1 binding site (HCBS).** Confluent normal (A, B, C) and ABCA1 mutant (Q597R) (D) fibroblasts were incubated with increasing concentration of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37 °C in the presence (A, B, D) or absence (C) of 22OH/9CRA or 300  $\mu\text{M}$  glyburide (B). After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were

submitted to the DSP (1 mM for 30 min). Samples (200  $\mu$ g total protein) were incubated with 10  $\mu$ L of affinity-purified human anti-ABCA1 antibody. The radioactivity found in pellets (ABCA1-associated) and in supernatants (ABCA1 non-associated) was determined by  $\gamma$ -counting. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Results shown are representative of four different independent experiments. Binding parameters of  $^{125}$ I-apoA-I to both ABCA1 and non-ABCA1 binding sites ( $K_d$  and  $B_{max}$ ) were obtained using Graph Pad Prism 4.00 software.

Table 1. Binding parameters for interaction of lipid-free apoA-I and reconstituted HDL (rLpA-I) with ABCA1 and non-ABCA1 binding site (HCBS).

Binding affinity parameters	<i>App B<sub>max</sub></i> ng/ $\mu$ g cell protein	<i>App K<sub>d</sub></i> $\mu$ g/mL
$^{125}$ I-apoA-I		
ABCA1-associated	0.04 $\pm$ 0.01*	1.80 $\pm$ 0.10**
ABCA1 non-associated	0.36 $\pm$ 0.03	3.50 $\pm$ 0.20
$^{125}$ I-rLpA-I		
ABCA1-associated	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	9.25 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>
ABCA1 non-associated	0.06 $\pm$ 0.01	7.50 $\pm$ 1.45

Reconstituted HDL (rLpA-I) particles were prepared as described in Methods. The values were mean  $\pm$  SD of triplicate measures.

*App B<sub>max</sub>*, \* p < 0.001; <sup>a</sup> p < 0.001, ABCA1-associated compared to ABCA1 non-associated for lipid-free apoA-I and for comparison between lipid-free apoA-I and rLpA-I, respectively.

*App K<sub>d</sub>*, \*\* p < 0.05 and <sup>b</sup> p < 0.05, ABCA1-associated compared to ABCA1 non-associated for lipid-free apoA-I and for comparison between lipid-free apoA-I and rLpA-I, respectively.

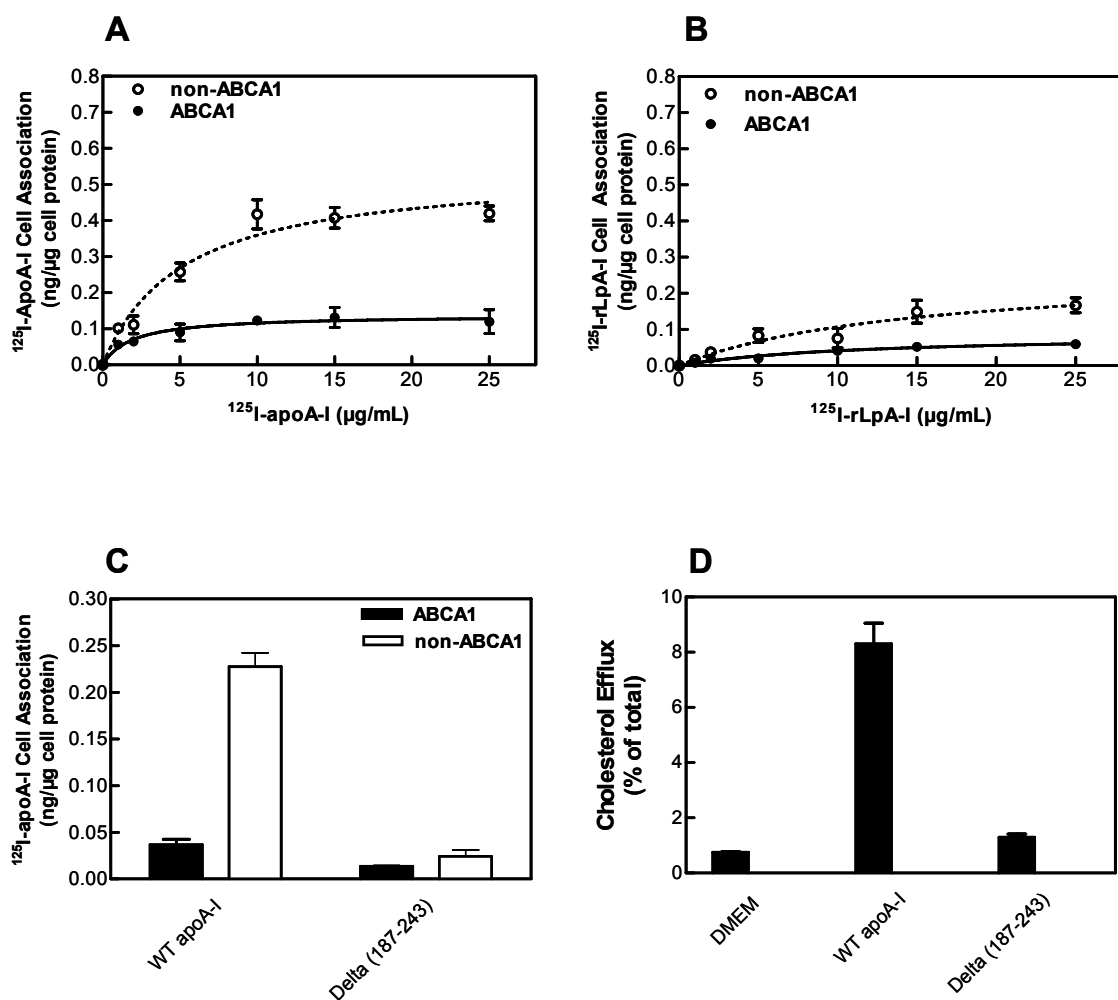
Kinetic data were obtained using the Graph Pad Prism 4.0 software.

**Affinity Binding of Reconstituted HDL Particles to the HCBS** — We have previously shown that lipid association with apoA-I or apoE3 reduced their ability to interact with ABCA1 (9,23,28). In the current study, we tested the role of lipid association on ligand binding affinity of apoA-I to both ABCA1 and non-ABCA1

binding sites (HCBS).  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was used for the preparation of rLpA-I with POPC as described under “Methods”. Most of the discoidal rLpA-I had diameters of 13 nm (not shown). Fig. 4 (A and B) shows that  $^{125}\text{I}$ -rLpA-I exhibited a 6-fold decreased capacity ( $B_{\text{max}}$ ) and 2-fold decreased affinity for the HCBS compared to lipid-free  $^{125}\text{I}$ -apoA-I (Table 1). At the same time,  $^{125}\text{I}$ -rLpA-I showed near complete absence binding to ABCA1 binding site. This is consistent with our previous results showing that either rLpA-I or HDL<sub>3</sub> competed poorly the binding of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to ABCA1 (9). This result indicates that the association of apoA-I with lipid decreased apoA-I affinity for both ABCA1 and the HCBS. It is possible that apoA-I lipidation weakened the formation of a high affinity complex between apoA-I and ABCA1 that resulted in impaired binding of apoA-I to the HCBS.

**Effect of the Carboxy-Terminal Deletion of ApoA-I on the Ability of ApoA-I to Bind to the HCBS** — It is well documented that the C-terminal region of apoA-I is important in ABCA1-mediated lipid efflux pathway. Indeed, previous studies have documented that apoA-I deletion mutant lacking residues 187-243 of the C-terminal domain  $\Delta(187-243)$  exhibits both reduced cell surface binding and ability to promote lipid efflux (29, 30). To further examine the role of the C-terminal domain of apoA-I in the binding to the HCBS and in promoting ABCA1-mediated cholesterol efflux, iodinated WT apoA-I or  $\Delta(187-243)$  mutant (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were incubated with stimulated fibroblasts for 45 min at 37°C. After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cross-linking, immunoprecipitation and quantifi-

cation of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated or not with ABCA1 were performed as described above. As shown in Fig. 4C, apoA-I mutant  $\Delta(187-243)$  exhibited a drastically reduced binding to both ABCA1 and non-ABCA1 binding site (HCBS). As expected the presence of apoA-I mutant  $\Delta(187-243)$  greatly reduces cholesterol efflux from 22OH/9CRA- stimulated fibroblasts as compared to WT apoA-I (Fig. 4D). In a parallel experiment, we confirmed that apoA-I  $\Delta(187-243)$  exhibited reduced cross-linking to ABCA1 compared to WT apoA-I, as assessed by SDS-PAGE, followed by detection of apoA-I/ABCA1 complex with apoA-I antibody (data not shown). These results indicate that the C-terminal domain of apoA-I is essential for the binding of apoA-I to both ABCA1 and the HCBS.

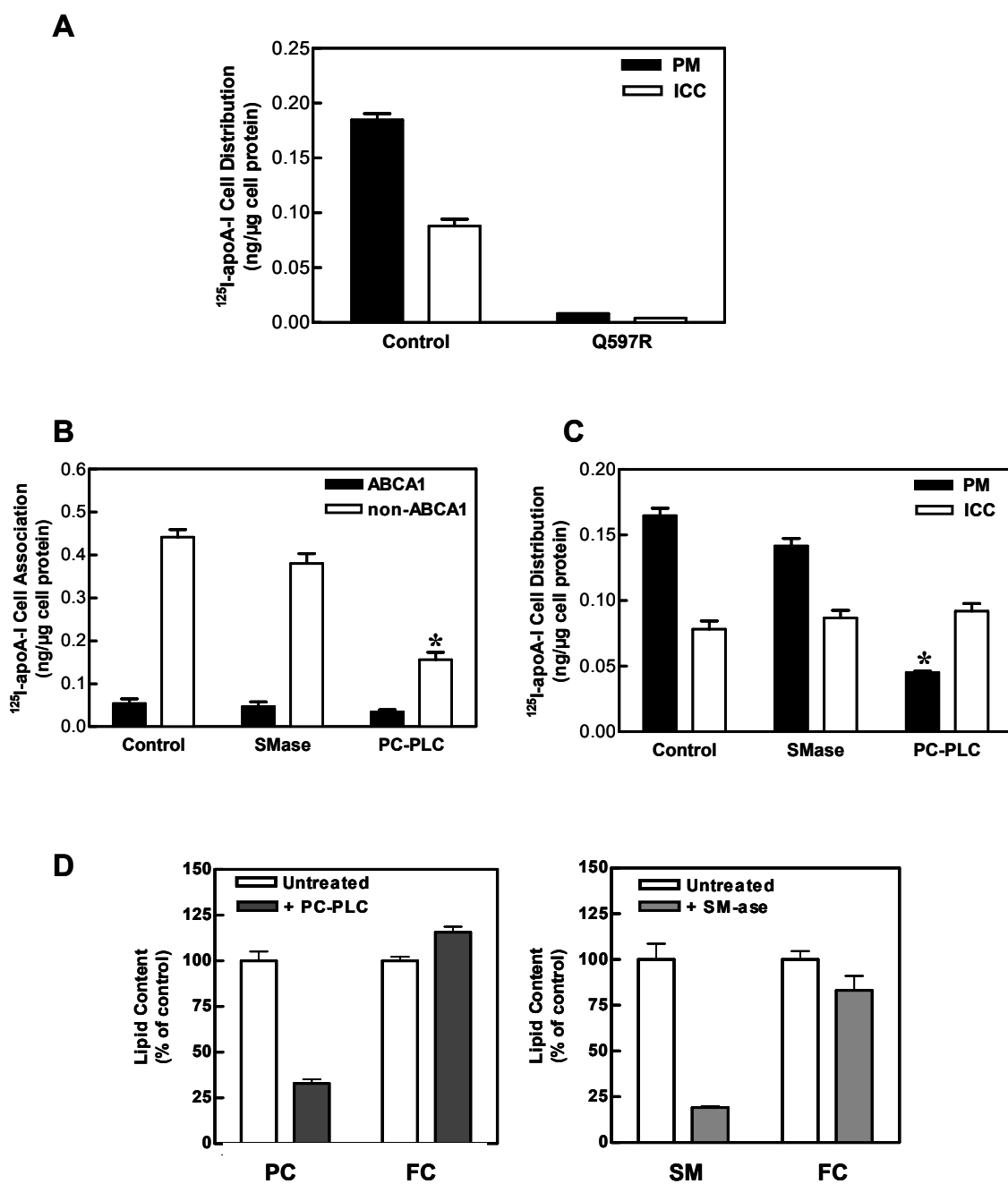


**Figure 4. Effect of apoA-I lipidation and deletion of the C-terminal domain of apoA-I on affinity binding to ABCA1 and non-ABCA1 binding site (HCBS).** Confluent stimulated normal fibroblasts were incubated with increasing concentration of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I (**A**) or reconstituted HDL particles ( $^{125}\text{I}$ -rLpA-I) (**B**). After washing to remove unbound ligands, cells were submitted to DSP and the radioactivity associated with both ABCA1 and non-ABCA1 binding sites was determined. **C**, iodinated WT apoA-I or apoA-I $\Delta$ (187-243) (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , specific activity = 3500-4000 cpm/ng) were incubated for 45 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After washing to remove unbound ligands, cells were submitted to DSP and the radioactivity associated with both ABCA1 and non-ABCA1 binding sites was determined. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Binding parameters of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I and  $^{125}\text{I}$ -rLpA-I to both ABCA1 and non-ABCA1 binding sites ( $K_d$  and  $B_{max}$ ) were obtained using Graph Pad Prism 4.00 software. **D**, confluent normal fibroblasts

were labeled with 4  $\mu\text{Ci/mL}$  of [ $^3\text{H}$ ]cholesterol and then enriched with 20  $\mu\text{g/mL}$  of cholesterol. Cells were stimulated with 22OH/9CRA and efflux was initiated by addition of 3  $\mu\text{g/mL}$  of either WT apoA-I or apoA-I $\Delta$ (187-243). After a 4-h incubation, cholesterol efflux was determined as described in “Methods”. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. \*,  $p < 0.001$  by Student’s  $t$  test.

**Localization of the HCBS to Plasma Membrane** — The finding that ABCA1-mediated the formation of a new apoA-I binding site (HCBS) raised the question of whether this binding site is localized to the plasma membrane (PM) and/ or intracellular compartments (ICCs). To address this question, we used a well-established biochemical assay based on a cell surface biotinylation approach to quantify the amount of apoA-I associated with PM and ICCs. Stimulated intact normal or ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts were incubated with 10  $\mu\text{g/ml}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C. Biotinylation was performed and  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with PM (pellets) or ICCs (supernatants) was determined by  $\gamma$ -counting. As shown in Fig. 5A, PM was found to have a 2-fold higher capacity to accommodate apoA-I as compared to ICCs. In separate experiments we found that  $^{125}\text{I}$ -apoA-I exhibited saturable binding that was found to occur in a concentration-dependent manner to both PM and ICCs fractions (data not shown). Furthermore, no significant apoA-I binding was detected in both PM and ICCs fractions in ABCA1 mutant (Q597R), used as a negative control in the present experiment (Fig. 5A). The integrity of the PM and ICCs fractions was assessed by separation of both isolated PM and ICCs on SDS-PAGE and detection of different cellular markers that co-localized specifically with the PM and ICCs by appropriate antibodies. No significant contamination of the PM with ICCs was

observed as assessed by the absence of VAL- $\alpha$ 2 from ICCs, which is considered being a marker for the PM. At the same time, Hsp-70 and tubulin were found exclusively associated with ICCs (data not shown). This finding indicates that the majority of the HCBS was associated with the PM domain.



**Figure 5. Distribution of apoA-I between plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICC) and effect of phospholipases treatment on the binding of apoA-I to the non-ABCA1 binding site (HCBS).** **A**, confluent stimulated normal and ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts were incubated with 10 µg/mL of <sup>125</sup>I-apoA-I for 45 min at 37 °C. Cells were then washed three times with PBS and then surface proteins were biotinylated as described in “Methods”. Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed, homogenized, and 200 µg of protein was added to 45 µl of streptavidin-Sepharose beads and incubated overnight on a platform mixer at 4 °C. Recovered supernatants (ICC) and pellets (PM) washed with lysis buffer were directly counted for radioactivity. **B**, confluent stimulated normal fibroblasts were incubated with 10 µg/mL of <sup>125</sup>I-apoA-I for 45 min at 37 °C. After washing to remove unbound <sup>125</sup>I-apoA-I, cells were treated or not with either 2.5 U/mL of PC-PLC or 0.4 U/mL of SMase for 30 min 37 °C. Cells were submitted to DSP and the radioactivity associated with both ABCA1 and non- ABCA1 binding sites was determined. **C**, confluent stimulated normal fibroblasts were incubated with <sup>125</sup>I-apoA-I and treated with phospholipases as described in (**B**). Cells were then washed three times with PBS and then surface proteins were biotinylated as described in “Methods”. Recovered supernatants (ICC) and pellets (PM) washed with lysis buffer were directly counted for radioactivity. Values represent the mean ± SD from triplicate wells. Results shown are representative of two different independent experiments. \*, p< 0.001 by Student’s *t* test. **D**, to assess how effectively phospholipids were removed by phospholipases treatment, cells were labeled with [<sup>3</sup>H]-choline and [<sup>3</sup>H]-cholesterol and the lipids separated by TLC and counted. PC-PLC and SM-ase treatment digested greater than 65% of phosphatidyl [<sup>3</sup>H]-choline and 80% of [<sup>3</sup>H]-sphingomyelin. [<sup>3</sup>H]-FC was used as a control. Values represent the mean ± SD from triplicate wells. Results shown are representative of two different independent experiments.

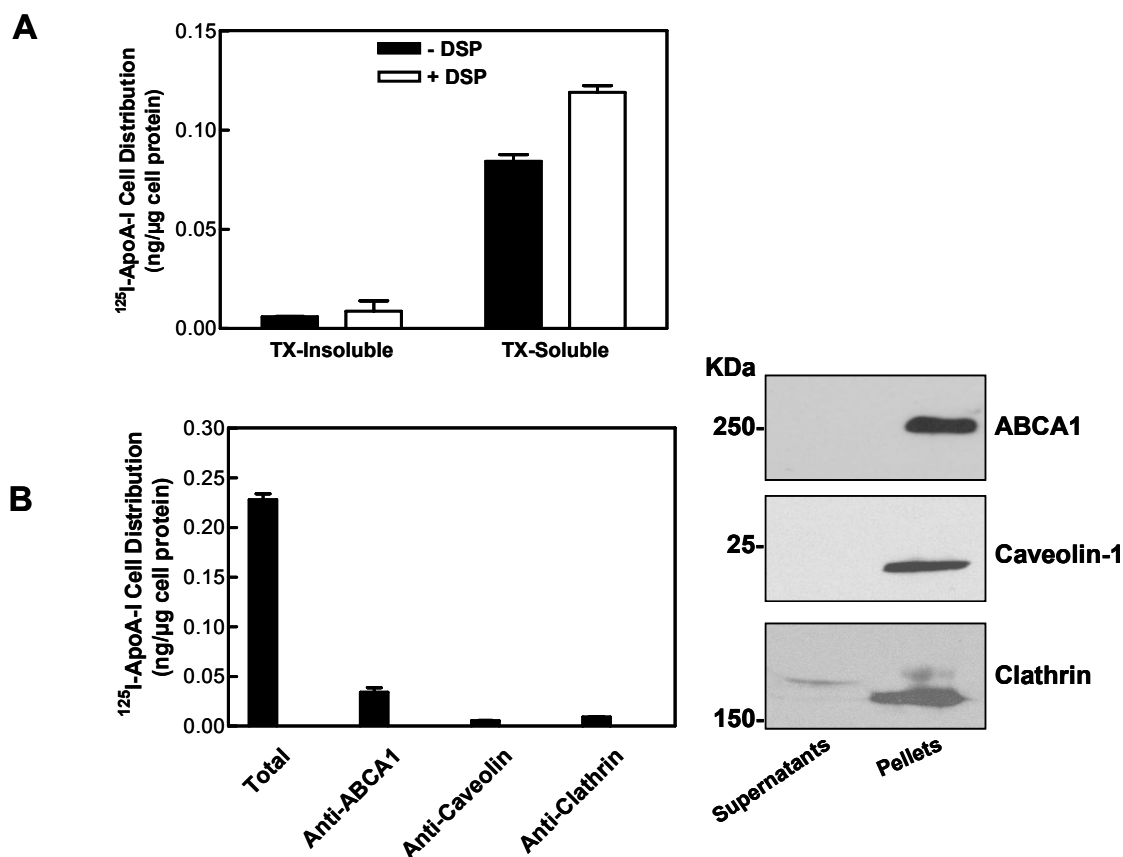
**Structural Characterization of the HCBS** — Given that the ABCA1 is a major protein that binds apoA-I in fibroblasts as assessed by cross-linking and SDS-PAGE (9,25), the question was raised whether the HCBS is constituted of phospholipids. We reasoned that treating the cells with specific phospholipases would be expected to severely disrupt the lipid environment, structure or



composition of the HCBS, which could subsequently decrease the binding of apoA-I. As shown in Fig. 5B, treatment of intact fibroblasts with PC-PLC, but not SMase as described under “Methods”, drastically reduced the association of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I with the HCBS. To further assess the specific effect of PC-PLC and SMase on  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with both PM and ICCs domains, after  $^{125}\text{I}$ -apoA-I binding and treatment or not with phospholipases, the cells were biotinylated for 30 min at 4°C. Then the amount of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with the PM and ICCs was determined by direct  $\gamma$ -counting. As shown in Fig. 5C, PC-PLC treatment decreased by 70% the amount of apoA-I associated with the PM, whereas SMase treatment induced a modest reduction in apoA-I associated with PM (10%). As expected, phospholipases treatment did not affect significantly the amount of apoA-I associated with ICCs. To assess how effectively phospholipids were removed by phospholipases treatment, the cells were labeled with [ $^3\text{H}$ ]-choline and the lipids separated by TLC and counted. PC-PLC and SMase treatment digested greater than 65% of phosphatidyl [ $^3\text{H}$ ]-choline and 80% of [ $^3\text{H}$ ]-sphingomyelin (Fig. 5D). [ $^3\text{H}$ ]-FC was used as control for the present experiment. On the other hand, cell membrane integrity and cellular toxicity following phospholipases treatments were assessed by [ $^3\text{H}$ ]adenine leakage. No significant increase of [ $^3\text{H}$ ]adenine release was observed with both PC-PLC and SMase treatments compared to untreated cells (data not shown). This result suggests that the HCBS is a phosphatidylcholine-containing site that binds apoA-I. The lack of SMase effect on the binding of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I to the HCBS indicates that the present binding site is not associated with sphingomyelin-rich

membrane raft domains. To further verify that the HCBS was not localized to membrane rafts, the distribution of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with the HCBS between Triton X-100 soluble and insoluble fractions was examined. Detergent insolubility has been used as a tool to identify lipid rafts and associated proteins (31). After incubation with  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, stimulated cells were subjected or not to the DSP and homogenized with TX-100 buffer, and the detergent-soluble and insoluble fractions were separated as described in "Methods". As shown in Fig. 6A, the majority of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with the HCBS was found in TX-100 soluble fraction. Furthermore,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with the HCBS was not co-immunoprecipitated by an anti-caveolin-1 antibody (Fig. 6B, upper panel). This result indicates that the HCBS does not co-localize with caveolin-1, a marker for raft domains (Fig. 6B). Co-immunoprecipitation of the HCBS with an anti-clathrin antibody was used as control for the present experiment and showed no significant association of the HCBS with clathrin, documented to be localized with membranes distinct from membrane rafts (32). Furthermore, a small proportion of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was co-immunoprecipitated with anti-ABCA1 antibody as described above. The immunoprecipitation of either ABCA1, caveolin-1 or clathrin was complete as assessed by the absence of these proteins from the supernatants, which contain the majority of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with the HCBS (Fig. 6B, lower panel). At the same time, we confirmed that ABCA1 was found in TX-100 soluble fraction and does not co-localize with caveolin-1 as previously documented (33,34). These data indicate

that both the HCBS and ABCA1 were not associated with membrane raft domains.

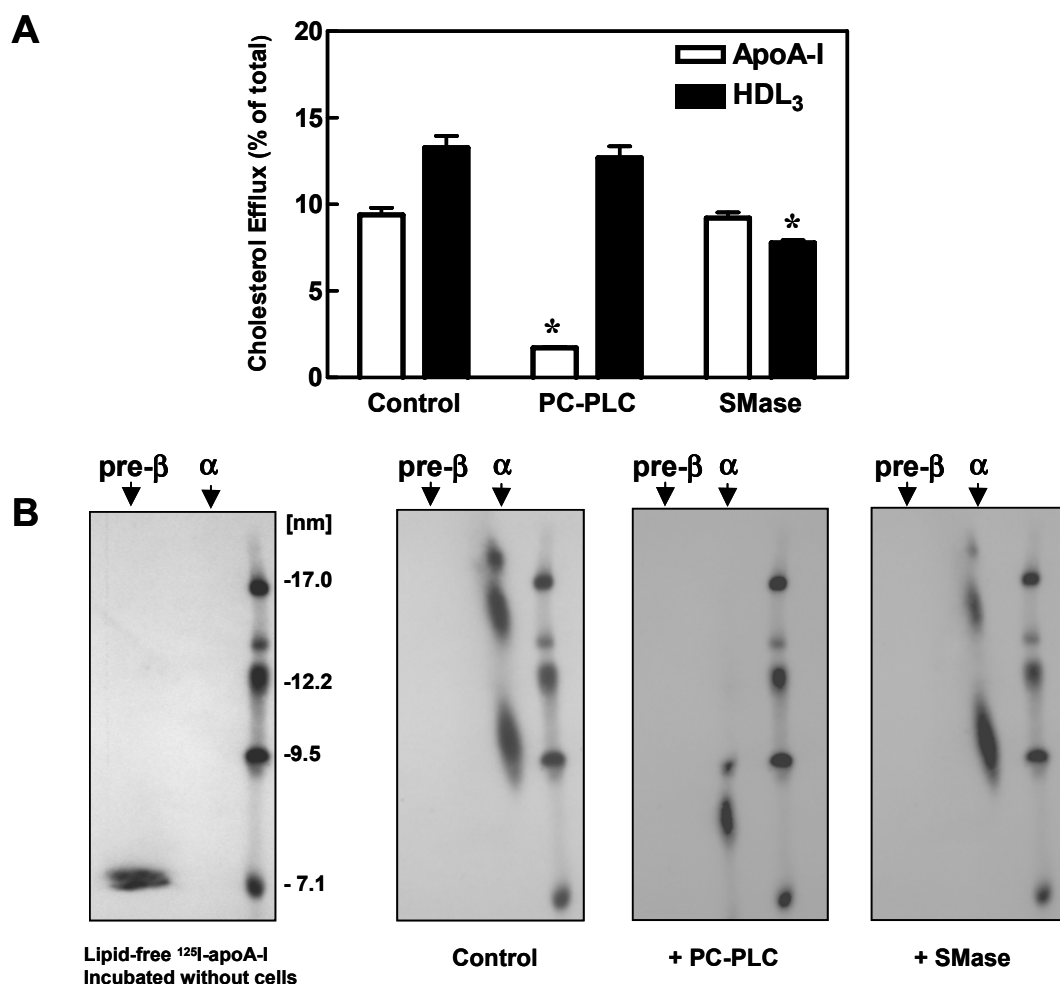


**Figure 6. Localization of the HCBS to non-raft membrane domains.** **A**, confluent stimulated normal fibroblasts were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were submitted or not to DSP and then subjected to Triton-X solubilization as described in “Methods”. The radioactivity associated with both soluble and insoluble fractions was determined. **B (right panel)**, confluent stimulated normal fibroblasts were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were submitted to DSP. Samples containing  $^{125}\text{I}$ -apoA-I (200  $\mu\text{g}$  total protein) were incubated with either anti-ABCA1, anti-caveolin-1 or anti-clathrin antibody (Santa Cruz). The radioactivity found in pellets and supernatants was determined by  $\gamma$ -counting. **B (left panel)**, equal amounts of protein from the supernatants and pellets were separated by SDS-PAGE and either ABCA1, caveolin-1 or clathrin were detected by appropriate antibodies.

**The HCBS is Essential for the Biogenesis of Nascent ApoA-I-containing**

**Particles** — Having determined that treating cells with PC-PLC strongly decreased the amount  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with the HCBS, the question was raised whether the HCBS is involved in the lipidation of apoA-I. To further assess the role of the HCBS in promoting cholesterol efflux mediated by apoA-I, we incubated [ $^3\text{H}$ ]cholesterol-labeled and cholesterol enriched fibroblasts with lipid-free apoA-I or HDL<sub>3</sub> for 90 min, after treatment of fibroblasts with PC-PLC or SMase. As shown in Fig. 7A, PC-PLC treatment drastically reduced apoA-I-mediated cholesterol efflux from ABCA1-stimulated fibroblasts, but cholesterol efflux to HDL<sub>3</sub> was not significantly affected. In contrast, SMase treatment did not impair apoA-I-mediated cholesterol efflux, but efflux of cholesterol to HDL<sub>3</sub> was decreased. At the same time, lipid-free- $^{125}\text{I}$ -apoA-I incubation with stimulated normal fibroblasts for 90 min at 37°C generated nascent-apoA-I-containing particles (LpA-I) having  $\alpha$ - electrophoretic mobility with diameters of 9 to 20 nm as we have previously documented (9, 23). In contrast, treating cells with PC-PLC, but not SMase inhibited the formation of larger LpA-I particles (Fig. 7B). Because PC-PLC and SMase were absent during  $^{125}\text{I}$ -apoA-I incubation with cells, we ruled out the possibility that the inhibition of nascent LpA-I formation was due to direct effect of PC-PLC on LpA-I particles. In parallel experiments we documented that apoA-I-mediated cholesterol efflux, as well as the formation of nascent LpA-I particles, following phospholipases treatments were absent in ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts under similar conditions used in the present experiments (data not shown). On the other hand, there is no

evidence for lipid-free <sup>125</sup>I-apoA-I aggregation, as assessed by the complete removal of lipid-free <sup>125</sup>I-apoA-I incubated with ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts under treatment or not with phospholipases by filtration with a 50,000 MWCO filter system (23). The inhibition of both apoA-I-mediated cholesterol efflux and the formation of larger nascent LpA-I, after the disruption of the HCBS with PC-PLC treatment indicates that the HCBS provides lipid for efflux promoted by apoA-I through the ABCA1 pathway, which is essential for the formation of nascent LpA-I particles.



**Figure 7. Disruption of the HCBS by PC-PLC treatment inhibited apoA-I-mediated cholesterol efflux and the formation of nascent apoA-I-containing particles.** **A**, confluent normal fibroblasts were labeled with 8  $\mu\text{Ci/mL}$  of [<sup>3</sup>H]cholesterol and then enriched with 20  $\mu\text{g/mL}$  of cholesterol. Cells were stimulated with 22OH/9CRA for 20 h. Cells were subjected to treatment with 2.5 U/mL of PC-PLC or 0.4 U/mL of SMase for 30 min at 37 °C. Following extensive washes; efflux was initiated by addition of 10  $\mu\text{g/mL}$  of either apoA-I or HDL<sub>3</sub>. After 90 min incubation, cholesterol efflux was determined as described in “Methods”. **B**, confluent stimulated normal fibroblasts were treated or not with phospholipases as described in (A). Cells were then washed three times with PBS to remove phospholipases and then incubated with 10  $\mu\text{g/mL}$  of <sup>125</sup>I-apoA-I for 90 min. Lipid-free <sup>125</sup>I-apoA-I was removed by using both ultrafiltration (MWCO 50,000) and dialysis membrane (MWCO 50,000) as described in “Methods”. Samples were separated by 2D-PAGE and <sup>125</sup>I-apoA-I was directly detected by autoradiography. Molecular size markers are indicated on the right side of each gel.

## DISCUSSION

In this study, we sought to better understand the molecular interaction between apoA-I and the ABCA1 transporter that leads to the formation of nascent HDL particles. Analysis of saturation binding data identified two distinct sites which bound apoA-I in fibroblasts stimulated with 22OH/9CRA: a low affinity site, which has a relatively high binding capacity (HCBS, non-associated with ABCA1) and high affinity site with a relatively low binding capacity (ABCA1 site). Importantly, the HCBS exhibited a 9-fold higher capacity ( $B_{max}$ ) to accommodate apoA-I compared to the ABCA1 binding site (Table 1). This is consistent with the results showing that overexpressing ABCA1 transporter in BHK cells promoted the formation of the HCBS, whereas the inhibition of ABCA1 activity by glyburide or the presence of ABCA1 mutant fibroblasts (Q597R) drastically reduced the binding of apoA-I to the HCBS (Figs. 2 and 3). These findings indicate that a functional ABCA1 is required for the formation of this novel apoA-I binding site. Interestingly, a previous study by Marcel and colleagues (11) has documented the existence of an apoA-I binding site in the extracellular matrix of macrophages (but not fibroblasts) that was partly ABCA1-dependent and was inhibited by glyburide and by trypsin. The cause of this disparity is unknown, but it may be attributable to ABCA1 stimulation with 22OH/9CRA in our experimental cell culture model, consistent with our finding that treatment of fibroblasts with 22OH/9CRA or overexpression of ABCA1 in BHK cells strongly increased the binding of apoA-I to the HCBS (Fig. 2 and 3). Importantly, after submission of this paper, Phillips and colleagues (39) confirmed

the existence of the HCBS and its involvement in the assembly of nascent HDL particles, based on our previous reports on the HCBS (4).

The structural characteristics of the HCBS has not yet been determined, in the present study we have obtained evidence that PC-PLC treatment of cells, but not SMase causes a dramatic decrease in apoA-I binding to the HCBS (Fig. 7), suggesting that phosphatidylcholine is the major phospholipid component of the HCBS. We propose that the rapid transient apoA-I binding to ABCA1 site allows secondary interactions with the HCBS, therefore the HCBS could provide a stable environment for apoA-I in close proximity to the plasma membrane that permits the extraction of lipids and subsequent formation of nascent HDL particles. Although evidence has been presented demonstrating molecular interactions between ABCA1 and apoA-I on the basis of chemical cross-linking, performed in our laboratory and other, indicating that apoA-I and ABCA1 are in very close proximity  $< 7 \text{ \AA}$  (9,35, 36), it remains controversial whether there is a “molecule-to-molecule contact” between apoA-I and ABCA1. Several competing models have been proposed for this interaction (10,11, 37).

The present study supports the concept that the generation of the HCBS is dependent on the formation of a high-affinity complex between apoA-I and ABCA1. However, it is possible that the low capacity site involving direct apoA-I/ABCA1 interaction serves a regulatory function and stabilizes ABCA1 as reported recently by Phillips colleagues (39). In the present study, we obtained evidence that increasing apoA-I binding to ABCA1 by 22OH/9CRA stimulation or overexpression of ABCA1 promoted the binding of apoA-I to the HCBS (Fig. 2



and 3). Conversely, inhibiting the binding of apoA-I to ABCA1 also inhibits its binding to the HCBS. For example: 1) inhibition of ABCA1 activity by glyburide decreased the binding of apoA-I to both ABCA1 and the HCBS; 2) reconstituted HDL particles (rLpA-I) exhibited reduced affinity for ABCA1 and also for the HCBS (Fig. 4A); and 3) ABCA1 mutants (Q597R and C1447R) that failed to bind apoA-I also failed to mediate the formation of the HCBS. Taken together, our data indicates that the initial interaction of apoA-I with ABCA1 site is required for the subsequent association of apoA-I with the HCBS.

The finding that the majority of apoA-I was found non-associated with ABCA1 after a 45 min incubation period with either stimulated fibroblasts or ABCA1 overexpressing BHK cells suggests that under conditions of continuous exposure to an excess of apoA-I, apoA-I/ABCA1 complexes must dissociate rapidly enough to allow replenishment of free ABCA1 binding site. This productive binding event targeted apoA-I to the adjacent PC-containing HCBS, which exhibited near a 9-fold higher capacity to bind apoA-I compared to the ABCA1 site. This is consistent with the concept that ABCA1 may be reutilized for a large number of apoA-I lipidation cycle, which may result in the lipidation of many apoA-I molecules by the same oligomeric ABCA1 complex (4, 24). Thus, the present tandem two-binding site model seems to be an efficient pathway for the lipidation of apoA-I. On the other hand, the rapid interaction of apoA-I/ABCA1 may have important implications in the activation of ABCA1 itself, consistent with our previous observations that treatment of either stimulated fibroblasts or CHO cells overexpressing ABCA1 with apoA-I for short periods of

time triggered cAMP production and consequently induced ABCA1 phosphorylation via a PKA-dependent mechanism (27,40). This is consistent with the finding of Oram and colleagues (41) that ABCA1 activity could be regulated by different signaling processes, including the JAK2 pathway.

Defining the structural characteristics of cellular apoA-I binding sites is key for understanding how ABCA1 regulates the associations of apoA-I with different cellular compartments. The present study shows that approximately two-thirds of total cell apoA-I was found associated with PM and the remaining with ICCs (Fig. 5 A). On the other hand, we documented that the majority of cell-associated apoA-I was found not bound to ABCA1 after short incubation periods. It is most likely that the HCBS is a PM lipid binding domain, consistent with our result showing that PC-PLC treatment of the cells drastically reduced apoA-I binding to the HCBS and specifically apoA-I associated with PM, but not ICCs (Fig. 5 B and C). Importantly, the HCBS was found not to be associated with sphingomyelin-rich membrane raft domains based on detergent solubility and lack of colocalization with marker proteins associated with raft domains, such as caveolin (Fig. 6), in agreement with the observation that the majority of PC-containing PM was found in non-raft domains (32). Similarly, previous studies have shown that ABCA1 itself was found associated with a membrane fraction distinct from cholesterol and sphingomyelin-rich rafts (33, 34). This result was further strengthened by the demonstration that disruption of the HCBS by PC-PLC treatment drastically reduced apoA-I-mediated cholesterol efflux from cells and inhibited the formation of nascent apoA-I-containing particles (Fig. 7 A

and B), but cholesterol efflux to HDL<sub>3</sub> was not significantly affected. In contrast, SMase treatment did not impair apoA-I-mediated cholesterol efflux, but efflux of cholesterol to HDL<sub>3</sub> was significantly decreased (Fig. 7A). This is in agreement with the finding of Mendez and Oram (33) that sphingomyelin-rich membrane rafts do not provide lipid for efflux promoted by apoA-I through the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. On the other hand, it is well documented that caveolae, a specialized type of membrane raft domains, play a role in cellular cholesterol transport and lipid efflux promoted by HDL or whole plasma (42,43) consistent with our result showing that disruption of sphingomyelin-rich membrane raft domains by SMase treatment significantly decreased HDL<sub>3</sub>-mediated cholesterol efflux (Fig. 7A). The finding that both ABCA1 and the HCBS were found in non-raft domains, suggests that the two binding sites are in close proximity, but more detailed analysis will be needed before this conclusion can be made with certainty.

The structural requirements for apoA-I to associate with both ABCA1 and the HCBS are as yet unknown, in the present report we obtained evidence that deletion of the C-terminal region of apoA-I, residues 187-243, blocked the binding of apoA-I to both ABCA1 and the HCBS. At the same time, apoA-I-mediated cholesterol efflux was almost completely inhibited in the presence of apoA-I  $\Delta(185-243)$  (Fig. 4 C and D), consistent with a previous study by Chroni and colleagues (8) documenting that direct cross-linking of apoA-I  $\Delta(185-243)$  and  $\Delta(220-243)$  to ABCA1 revealed that the  $K_d$  values for these mutants were increased 3-fold compared to WT apoA-I. In contrast, a recent study by Phillips

and colleagues (39) reported that the C-terminal deletion mutants  $\Delta(190-243)$  and  $\Delta(223-243)$  exhibited marked reductions in their abilities to bind to the surface of ABCA1-upregulated cells, but these C-terminal deletion mutants cross-linked to ABCA1 as effectively as WT apoA-I. The cause of this disparity is unknown, but it may be attributable to the concentration of apoA-I used in these experiments. Indeed, it was reported that significant differences for cell binding and cholesterol efflux between WT apoA-I and apoA-I mutants were seen when the cells were exposed to low concentrations of apoA-I (30). It is well established that the C-terminal  $\alpha$ -helices are important for effective cellular lipid efflux (29, 30). Interestingly, we have previously reported that apoA-I  $\Delta(185-243)$  incubated with HepG2 failed to form larger nascent LpA-I particles compared to WT apoA-I (4). It is possible that the C-terminal region of apoA-I is required for the formation of a productive complex with ABCA1 that leads to the creation of the HCBS or, alternatively, apoA-I  $\Delta(185-243)$  was unable to bind directly to a PC-containing HCBS (39).

Previous studies by Smith, Neufeld, Brewer, and colleagues (12,13) have proposed that the entire lipid transfer reaction may occur inside the cell as a part of a retroendocytosis pathway. We obtained evidence that two-thirds of total cell apoA-I was found associated with the PM and the remaining with ICCs (Fig. 5A). Furthermore, the presence of ABCA1 mutant (Q597R) abolished the association of apoA-I with both of the compartments, consistent with the idea that ABCA1 seems to be required for the association of apoA-I with both the PM and ICCs. These findings provide strong support for the existence of an intracellular

lipidation pathway. This is consistent with the findings of Tall and colleagues (44) that deletion of the PEST sequence leads to decreased internalization of ABCA1 and decreased cholesterol efflux from late endosomal cholesterol pools. Furthermore, a recent study by von Eckardstein and colleagues (45) has documented that ABCA1 modulates apoA-I transcytosis in endothelial cells. These results suggest that the internalization of ABCA1 is functionally important in mediating the intracellular lipidation of apoA-I. We are currently investigating the cellular compartmentalization and trafficking of apoA-I/ABCA1 and its relationship to the formation of nascent apoA-I-containing particles.

The concept that ABCA1 creates the putative PC-containing HCBS may have important implications on the understanding of ABCA1-mediated HDL genesis pathway. Our results support the two-step model for ABCA1-mediated lipid efflux proposed by Freeman, Zannis and colleagues (7,8). The initial rapid and transient productive binding of apoA-I molecules to the homo-tetrameric ABCA1 complex (25), likely through the  $\alpha$ -helices in the C-terminal-region of apoA-I (Fig. 4C and D) permits apoA-I insertion into the adjacent PC-containing HCBS having near 10-fold higher capacity to bind apoA-I, most likely created by the phospholipid translocase activity of ABCA1. The interaction of apoA-I with the HCBS allows PL and FC extraction and subsequent dissociation of the lipidated products (7,9) thereby allowing the formation of nascent HDL particles. Although the structural details of the two-binding site model has not yet been elucidated, the present study demonstrates that ABCA1 activity creates a new high capacity binding site required for the formation of nascent apoA-I-containing

particles (Fig. 7B), emphasizing the importance of the ABCA1 transporter in the HDL biogenesis pathway. However, it remains unknown whether ABCA1 modifies adjacent phospholipid bilayer domain (s) that permit the association of apoA-I with the HCBS and extraction of phospholipid and cholesterol, or alternatively, ABCA1 may alter apoA-I structure to increase its ability to bind to a PL bilayer within the HCBS. Further elucidation of the molecular interactions between apoA-I/ABCA1 and the HCBS should clarify the mechanism by which the ABCA1 transporter is involved in the biogenesis of HDL particles.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to express their gratitude to Drs. John F. Oram and Ashley M. Vaughan for generously providing BHK cells overexpressing ABCA1 and Dr Yves L. Marcel for kindly providing apoA-I  $\Delta(187-243)$ . This work was supported by grants MOP 15042 the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. J. Genest holds the McGill University-Novartis Chair in Cardiology.

**REFERENCES**

1. Brewer, H. B., Jr., Remaley, A. T., Neufeld, E. B., Basso, F., and Joyce, C. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1755-1760
2. von Eckardstein, A., Hersberger, M., and Rohrer, L. (2005) *Curr. Opin. Clin. Nutr Metab Care.* **8**: 147-152
3. Brewer, H. B., Jr. and Santamarina-Fojo, S. (2003) *Am. J. Cardiol.* **91**: 3E-11E
4. Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J. (2006) *Curr. Opin. Lipidol.* **17**: 258-267
5. Wang, N. and Tall, A. R. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 1178-1184
6. Wang, N., Silver, D. L., Costet, P., and Tall, A. R. (2000) *J. Biol. Chem* **275**: 33053-33058
7. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Chroni, A., Mendez, A. J., Zannis, V. I., and Freeman, M. W. (2004) *J. Lipid Res.* **45**: 287-294
8. Chroni, A., Liu, T., Fitzgerald, M. L., Freeman, M. W., and Zannis, V. I. (2004) *Biochemistry* **43**: 2126-2139
9. Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J., Jr. (2004) *J. Biol. Chem* **279**: 7384-7394



10. Chambenoit, O., Hamon, Y., Marguet, D., Rigneault, H., Rosseneu, M., and Chimini, G. (2001) *J.Biol.Chem* **276**: 9955-9960
11. Burgess, J. W., Kiss, R. S., Zheng, H., Zachariah, S., and Marcel, Y. L. (2002) *J.Biol.Chem* **277**: 31318-31326
12. Takahashi, Y. and Smith, J. D. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 11358-11363
13. Neufeld, E. B., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Jr., Knapper, C. L., Combs, C. A., Cooney, A., Comly, M., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Remaley, A. T., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2004) *J.Biol.Chem* **279**: 15571-15578
14. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J., Jr., and Hayden, M. R. (1999) *Nat.Genet.* **22**: 336-345
15. Oram, J. F., Vaughan, A. M., and Stocker, R. (2001) *J.Biol.Chem* **276**: 39898-39902
16. Vaughan, A. M. and Oram, J. F. (2003) *J.Lipid Res.* **44**: 1373-1380

17. Frank,P.G., Bergeron,J., Emmanuel,F., Lavigne,J.P., Sparks,D.L., Denefle,P., Rassart,E., and Marcel,Y.L. (1997). *Biochemistry* **36**: 1798-1806.
18. Jonas, A., Steinmetz, A., and Churgay, L. (1993) *J.Biol.Chem* **268**: 1596-1602
19. Krimbou, L., Marcil, M., Davignon, J., and Genest, J., Jr. (2001) *J.Biol.Chem* **276**: 33241-33248
20. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C., and Tall, A. R. (2001) *J.Biol.Chem* **276**: 23742-23747
21. Shirhatti, V., and Kishna,G. (1985) *Anal.Biochem* **1476**: 410-418
22. Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992) *Cell* **68**: 533-544
23. Krimbou, L., Hajj, H. H., Blain, S., Rashid, S., Denis, M., Marcil, M., and Genest, J. (2005) *J.Lipid Res.* **46**: 1668-1677
24. O'Connell, B.J, Denis, M., and Genest, J. (2004) *Circulation* **110**: 2281-2288
25. Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J. (2004) *J.Biol.Chem* **279**: 41529-41536
26. Trompier, D., Alibert, M., Davanture, S., Hamon, Y., Pierres, M., and Chimini, G. (2006) *J.Biol.Chem* **281**: 20283-20290

27. Haidar, B., Denis, M., Marcil, M., Krimbou, L., and Genest, J., Jr. (2004) *J.Biol.Chem* **279**: 9963-9969
28. Hajj, H. H., Blain, S., Boucher, B., Denis, M., Krimbou, L., and Genest, J. (2005) *J.Lipid Res.* **46**: 1457-1465
29. Burgess, J. W., Frank, P. G., Franklin, V., Liang, P., McManus, D. C., Desforges, M., Rassart, E., and Marcel, Y. L. (1999) *Biochemistry* **38**: 14524-14533
30. Vedhachalam, C., Liu, L., Nickel, M., Dhanasekaran, P., Anantharamaiah, G.M., Nickel, M., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2004) *J.Biol.Chem* **26**: 49931-49939
31. Rietveld, A., and Simons, K. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1376**: 467-479
32. Doyle, D.D., Going, G. E., Upshaw-Early, J., Page, E., Ranscht, B., and Palfrey, H. C. (1998) *J.Biol.Chem* **273**: 6937-6943
33. Mendez, A. J., Lin, G., Wade, D. P., Lawn, R. M., and Oram, J. F. (2001) *J.Biol.Chem* **276**: 3158-3166
34. Landry, Y. D., Denis, M., Nandi, S., Bell, S., Vaughan, A. M., and Zha, X. (2006) *J.Biol.Chem* **281**: 36091-36101
35. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C., and Tall, A. R. (2001) *J.Biol.Chem* **276**: 23742-23747

36. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Rhee, J. S., Andersson, L. P., Mendez, A. J., and Freeman, M. W. (2002) *J.Biol.Chem* **277**: 33178-33187
37. Panagotopoulos, S.E., Witting, S. R., Horace, E. M., Hui, D. Y., Maiorano, J. N., and Davidson, W. S. (2002) *J.Biol.Chem* **277**: 39477-39484
38. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Chroni, A., Mendez, A. J., Zannis, V. I., and Freeman, M. W. (2003) *J.Lipid Res.* **45**: 287-294
39. Vedhachalam, C., Ghering, A. B., Davidson, W. S., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* DOI:10.1161/ATVBAHA.107.145789
40. Haidar, B., Denis, M., Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J., Jr. (2002) *J.Lipid Res.* **43**: 2087-2094
41. Oram, J. F., and Heinecke, J.W. (2005) *Physiol. Rev.* **85**: 13437-1372
42. Smart, E., Ying, Y., Donzel, I.W.C., and Anderson, R.G.W. (1996) *J.Biol.Chem* **271**: 29427-29435
43. Fielding, P.E., and Fielding, C.J., (1995) *Biochemistry* **34**: 14288-14292
44. Chen, W., Wang, N., and Tall, A. R. (2005) *J.Biol.Chem* **280**: 29277-29281
45. Cavelier, C., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2006) *Circ Res.* **99**: 1060-1066

## Chapitre IV

### Article #2 \*

#### 1. Contexte de travail

Il est généralement accepté que la lipodation de l'apoA-I se produit à l'intérieur de la cellule comme partie d'une voie de retro-endocytose. Le concept de Smith et collègues est d'intérêt particulier : l'efflux cellulaire du cholestérol implique l'endocytose et la resécrétion de l'apoA-I. Cette information est critique à l'évaluation continue si la membrane plasmique ou les compartiments intracellulaires représentent les sites cellulaires actifs pour la lipodation de l'apoA-I.

C'est dans ***le but d'élucider les voies de lipodation de l'apoA-I par l'ABCA1 et le niveau d'importance occupé par chacune de ces voies*** que le travail a été entrepris.

Dans l'article suivant,

**Houssein Hajj Hassan et Dana Nyholt** ont fait la majeure partie du travail et ont écrit le manuscrit.

**Dong-Young Donna Lee, Iulia Iatan et Isabelle Ruel** ont aidé dans la culture des cellules et la manipulation des expériences.

**Anouar Hafiane** a aidé dans l'iodation de l'apoA-1.

**Larbi Krimbou** aco-écrit le manuscrit.

**Jacques Genest** a supervisé le travail.

**Quantitative Analysis of ABCA1-Dependent Compartmentalization and Trafficking of Apolipoprotein A-I: Implications For Determining Cellular Kinetics of Nascent High Density Lipoprotein Biogenesis**

**Houssein Hajj Hassan\*, Dana Nyholt\*, Dong-Young Donna Lee, Iulia Iatan, Anouar Hafiane, Isabelle Ruel, Larbi Krimbou and Jacques Genest**

J Lipid Res. 2007 Nov;48(11):2428-42. Epub 2007 Jul 26

\* These authors contributed equally to this work

From the Cardiovascular Genetics Laboratory, Cardiology Division, McGill University Health Centre / Royal Victoria Hospital, Montréal, Québec H3A 1A1, Canada

**Running title: Cellular compartmentalization and trafficking  
of apoA-I /ABCA1**

**Abstract**

The molecular mechanisms underlying the apoA-I/ABCA1 endocytic trafficking pathway in relation to HDL formation remain poorly understood. We have developed a quantitative cell surface biotinylation assay to determine the compartmentalization and trafficking of apoA-I between the plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICCs). Here, we report that  $^{125}\text{I}$ -apoA-I exhibited saturable binding to both the PM and ICCs in BHK cells stably over-expressing ABCA1 and in fibroblasts. The PM was found to have a 2-fold higher capacity to accommodate apoA-I as compared to ICCs. Furthermore, over-expressing various levels of ABCA1 in BHK cells promoted the association of apoA-I with PM and ICCs compartments. The C-terminal deletion of apoA-I  $\Delta(187-243)$  and reconstituted HDL particles exhibited reduced association of apoA-I with both the PM and ICCs. Interestingly, cell surface biotinylation with a cleavable biotin revealed that apoA-I induces ABCA1 endocytosis. Such endocytosis was impaired by naturally occurring mutations of ABCA1 (Q597R and C1477R). To better understand the role of the endocytotic pathway in the dynamics of the lipidation of apoA-I, a pulse chase experiment was performed and the dissociation (re-secretion) of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I from both PM and ICCs was monitored over a 6-h period. Unexpectedly, we found that the time required for 50% dissociation of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I from the PM was 4-fold slower than that from ICCs at 37°C. Finally, treatment of the cells with phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not sphingomyelinase, increased the dissociation of apoA-I from the PM. The present study has provided evidence that the lipidation of

apoA-I occurs in two kinetically distinguishable compartments. The finding that apoA-I specifically mediates the continuous endocytic recycling of ABCA1, together with the kinetic data showing that apoA-I associated with ICCs is rapidly re-secreted, suggests that the endocytotic pathway plays a central role in the formation of nascent HDL, in agreement with current models of nascent HDL biogenesis.

**Keywords:** ApoA-I, ABCA1, nascent HDL, internalization, apoA-I resecretion, apoA-I dissociation



## INTRODUCTION

The molecular interaction of apoA-I with the cell membrane ABCA1 transporter has important implications in reverse cholesterol transport (RCT). It provides a mechanism whereby excess cholesterol is removed from peripheral cells that are unable to catabolize cholesterol, including macrophages in the vessel wall. This process plays a crucial role in both the formation and maintenance of HDL levels in plasma and is believed to be one of the major mechanisms by which HDL protects against atherosclerotic cardiovascular disease (ACVD) (1,2). Despite a large body of information identifying HDL as a potent physiological protector against ACVD, the fundamental mechanisms underlying the genesis of HDL at the cellular level remain complex and poorly understood.

It is generally thought that the lipidation of apoA-I occurs inside the cell as a part of a retroendocytosis pathway. Of particular interest is the concept of Smith and colleagues (3) that cellular cholesterol efflux involves endocytosis and resecretion of apoA-I. This concept falls in line with the idea that the ABCA1 transporter may play an important role in the apoA-I retroendocytosis pathway and is supported by previous studies documenting that: 1) apoA-I colocalizes with ABCA1-containing endosomes (4); and 2) apoA-I-mediated lipid efflux is defective in the lysosomal storage diseases Niemann-Pick type C disease (NP-C) (5) and Niemann-Pick type B disease (NP-B) (6).

The pioneering biophysical and biochemical studies by Neufeld, Brewer, and colleagues (7,8) carried out with a functional fluorescent chimeric human ABCA1-GFP protein expressed in living cells have led to important new insights into the structural mechanisms involved in the lipidation of apoA-I. Indeed, ABCA1 was found to be present in late endosomes and lysosomes and to traffic between late endosomes and the plasma membrane (PM). The presence of both internalized apoA-I and ABCA1 in late endosomes is thought to be functionally important in mediating lipid efflux from this intracellular location. It is not clear, however, whether apoA-I solubilizes a membrane domain that is created by ABCA1 (9-11) or if apoA-I/ABCA1 must interact directly and be internalized together for subsequent nascent HDL formation. This information is critical to the ongoing assessment of whether PM or intracellular compartments (ICCs) represent active cellular sites for the lipidation of apoA-I.

Although it is accepted that a retroendocytosis pathway plays an important role in the formation of nascent HDL particles, the structural determinants governing the dynamics of apoA-I lipidation at different cellular sites have not yet been elucidated. In the present study, we have used a quantitative assay based on cell surface biotinylation to investigate the cellular compartmentalization and trafficking of apoA-I/ABCA1 in relation to the biogenesis of nascent HDL particles.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

***Patients' selection*** — For the present study, we selected fibroblasts from 3 normal control subjects and 2 patients with TD (homozygous for Q597R at the ABCA1 gene and compound heterozygous for C1477R as previously described (12)). The protocol for the study was reviewed and accepted by the Research Ethics Board of the McGill University Health Centre. Separate consent forms for blood sampling, DNA isolation, and skin biopsy were provided.

***Cell culture*** — BHK cells stably transfected with an ABCA1 expression vector that is inducible by treating the cells with mifepristone and cells transfected with the same vector lacking the ABCA1 cDNA insert (mock-transfected) were generously provided by Dr. John F. Oram from the Department of Medicine, University of Washington and were characterized and cultured as described previously (13,14). These BHK cells do not normally express ABCA1.

Human skin fibroblasts were obtained from 3.0 mm punch biopsies of the forearm of patients and healthy control subjects and were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 0.1% nonessential amino acids, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% fetal bovine serum (FBS).

***Human plasma apoA-I*** — Purified plasma apoA-I (Biodesign) was resolubilized in 4M guanidine-HCl and dialyzed extensively against PBS buffer. Freshly resolubilized apoA-I was iodinated with <sup>125</sup>Iodine by IODO-GEN® (Pierce) to a

specific activity of 3000 to 3500 cpm/ng apoA-I and used within 48 h. Expression of wild type (WT) apoA-I and its mutants in a bacterial system, and the isolation and purification of these proteins, have been described previously by Marcel and colleagues (15). Deletion mutant apoA-I  $\Delta(187-234)$  was provided by Dr. Yves L Marcel.

**Cell surface biotinylation assay** — BHK cells stably expressing ABCA1 or mock were treated or not with mifepristone as described by Oram and colleagues (13,14). Confluent fibroblasts were stimulated or not with 2.5  $\mu\text{g/mL}$  22(R)hydroxycholesterol and 10  $\mu\text{M}$  9-*cis*-retinoic acid for 20 h. Cells were incubated in the presence of 10  $\mu\text{g/mL}$  of apoA-I for 45 min at 37°C or with increasing concentrations of apoA-I. Cells were washed three times with PBS and surface proteins were biotinylated with 500  $\mu\text{g/mL}$  sulfosuccinimidobiotin (sulfo-NHS-biotin; Pierce) for 30 min at 4°C. The biotinylation reaction was quenched for 10 min at 4°C by removal of the biotin solution and addition of 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed, and homogenized. 200  $\mu\text{g}$  of protein was added to 50  $\mu\text{l}$  of streptavidin-Sepharose beads and incubated overnight on a platform mixer at 4°C. The pellet (plasma membrane; PM) or supernatant (intracellular compartments; ICCs) were washed with lysis buffer and counted for radioactivity.

**Preparation of reconstituted HDL particles r(HDL)** — Complexes comprising apoA-I and palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine (POPC) were prepared using

the sodium cholate dialysis method as described by Jonas and colleagues (16). An ApoA-I / POPC molar ratio of 1:100 was used. r(HDL) particles were further concentrated by ultrafiltration (spiral ultrafiltration cartridge, MWCO 50,000, Amicon) to discard any lipid-free apoA-I or proteolytic peptides. ApoA-I-lipid complex formation was verified by analysis with 2D-PAGGE as we have previously described (17).

***ABCA1 Endocytosis assay*** — Endocytosis assays were performed as described previously (18). Briefly, mifepristone induced BHK-ABCA1 or 22OH/9CRA- stimulated normal fibroblasts or ABCA1 mutant fibroblasts were biotinylated with a cleavable form of biotin (sulfosuccinimidyl 2-(biotinamido)-ethyl-1, 3-dithiopropionate (sulfo-NHS-SS-biotin); Pierce) at 4°C for 30 min. Excess biotin was removed and cells were incubated with warm DMEM containing 10 µg/ml apoA-I or not. Cells were maintained at 37°C for various time periods to permit cellular trafficking. Subsequently, cells were washed with ice-cold PBS and biotin cleavage was performed using a non-cell permeable reducing reagent (50 mM glutathione in 75 mM NaCl, 10 mM EDTA containing 1% BSA, pH 7.4), which was applied to the cells twice for 15 min. Reducing reagent was quenched twice min incubations with iodoacetamide (5 mg/mL) at 4°C. Biotinylated cells incubated with or without apoA-I at 4°C throughout each assay and subjected to reducing agent were used as controls for the efficacy of biotin cleavage. Under these conditions, more than 95% of biotinylated ABCA1 was cleaved by glutathione. Integrin  $\alpha$ 4 (Int  $\alpha$ 4) and activin

receptor type II (Act II) which localize to the plasma membrane in BHK cells and human fibroblasts, respectively, were used as controls for protein loading. The ratios of endocytosed ABCA1 over Int  $\alpha$ 4 and ABCA1 over ActRII were determined.

To ensure that application of cleavable biotin did not alter the function of ABCA1, cholesterol efflux assays were carried out on biotinylated cells. We found that labelling cell surface protein with cleavable biotin did not affect significantly apoA-I-mediated cholesterol efflux via ABCA1 pathway.

***Dissociation of  $^{125}$ I-apoA-I from intact cells*** — BHK-ABCA1, normal human fibroblasts, or fibroblasts with ABCA1 mutations (Q597R and C1477R) from Tangier disease subjects were used. Fibroblasts were grown to confluence in 100 mm diameter dishes and stimulated with 2.5  $\mu$ g/mL 22-(R)-hydroxycholesterol and 10  $\mu$ M 9-*cis*-retinoic acid for 20 h in DMEM / BSA. BHK cells stably expressing ABCA1 or mock were treated or not with mifepristone as described above. Cells were incubated in the presence of 10  $\mu$ g/mL of  $^{125}$ I-apoA-I for 45 min at 37°C. After washing to remove unbound  $^{125}$ I-apoA-I, DMEM was added, and the plates were immediately incubated at 37°C for increasing time periods. Biotinylation was performed and  $^{125}$ I-apoA-I dissociation from both plasma membrane and intracellular compartments was quantitated as described above.

**Analysis of nascent apoA-I-containing particles** —  $^{125}\text{I}$ -apoA-I released to the medium at the time point (6h) from mifepristone induced BHK-ABCA1 cells was analysed by 2D-PAGGE and the number of apoA-I molecule per particle was assessed by crosslinking with dithiobis[succinimidyl-propionate] (DSP) crosslinking, as previously described (20).

**Treatment with phospholipases** — Confluent BHK-ABCA1 cells were incubated for 45 min in DMEM containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $^{125}\text{I}$ -apoA-I. After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were subjected to treatment with 2.5 U/mL phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) or 0.4 U/mL sphingomyelinase (SMase) (Sigma) for 30 min at 37°C. Following washes, cell surface biotinylation was performed as described above.

**Statistical analysis** — Results were compared statistically by t-test. Two-tailed  $p$  values < 0.05 were considered as significantly different.

## RESULTS

**Development of a quantitative biotinylation assay**—To investigate the cellular compartmentalization and trafficking pattern of apoA-I in a cell culture model, we developed a quantitative assay based on cell surface biotinylation. This permitted us to quantify the amount of apoA-I associated with the plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICCs) as described in “Experimental Procedures”. However, both the incomplete biotinylation of cell surface proteins or possible contamination of PM with ICCs fractions could result in an inaccurate quantification. To test whether the biotinylation of cell surface proteins was complete, 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts were incubated with 10  $\mu\text{g/mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C, washed, and incubated with increasing amounts of biotin (0.25 to 3 mg/mL). After streptavidin pull-down,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with PM (pellets) or ICCs (supernatants) was determined by  $\gamma$ -counting. Increasing the amount of biotin beyond 0.5 mg/mL did not result in any significant increase in  $^{125}\text{I}$ -apoA-I association with either the PM or ICCs (**Fig.1A**).

To examine the specificity of the biotinylation reaction, a 30-fold excess of unlabeled apoA-I, absence of ABCA1 stimulation with 22OH/9CRA, and ABCA1 mutant fibroblasts (Q597R) were used as controls. As shown in **Fig.1B**, the presence of excess unlabeled apoA-I, the absence of stimulation with 22OH/9CRA, or utilization of an ABCA1 mutant (Q597R) drastically reduced the association of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I with both the PM and ICCs. We have previously



reported that the Q597R-ABCA1 mutant does not bind apoA-I, but is expressed normally and localizes to the cell surface (19).

To ascertain the integrity of the PM and ICCs fractions, both fractions were separated by SDS-PAGE and monitored by appropriate antibodies for the co-localization of specific cellular markers. No significant contamination of the PM with ICCs was observed as assessed by the absence of VAL- $\alpha$ 2 from ICCs, which is considered a marker for the PM. Similarly, Hsp-70 and tubulin were found exclusively associated with ICCs (**Fig.1C**). These results indicate that the biotinylation is complete and limited to the PM.

In light of these findings, a concentration of 0.5 mg/mL of biotin and an incubation period of 30 min at 4°C were used for biotinylation throughout the present study. Importantly, a period of 45 min incubation of  $^{125}$ I-apoA-I with cells at 37°C was chosen to permit sufficient time for equilibration of apoA-I with different cellular compartments. Although several groups used binding at 4°C to determine the association of apoA-I with the PM, we obtained evidence that incubation at 4°C alters the association of apoA-I with ABCA1 at the PM (data not shown), in agreement with previous studies (20,21). These results underscore the importance of using physiological temperatures to study apoA-I/ABCA1 interactions.

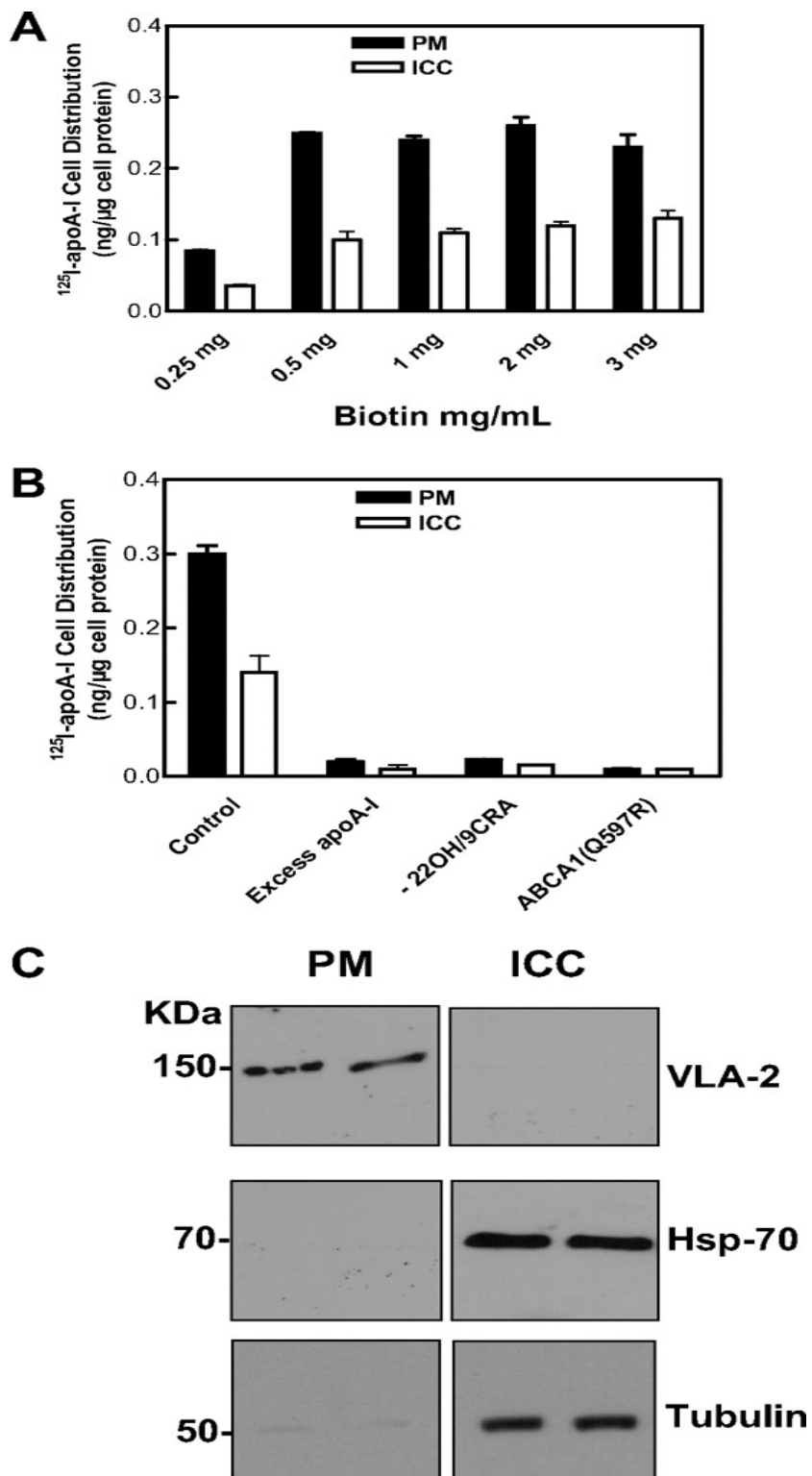


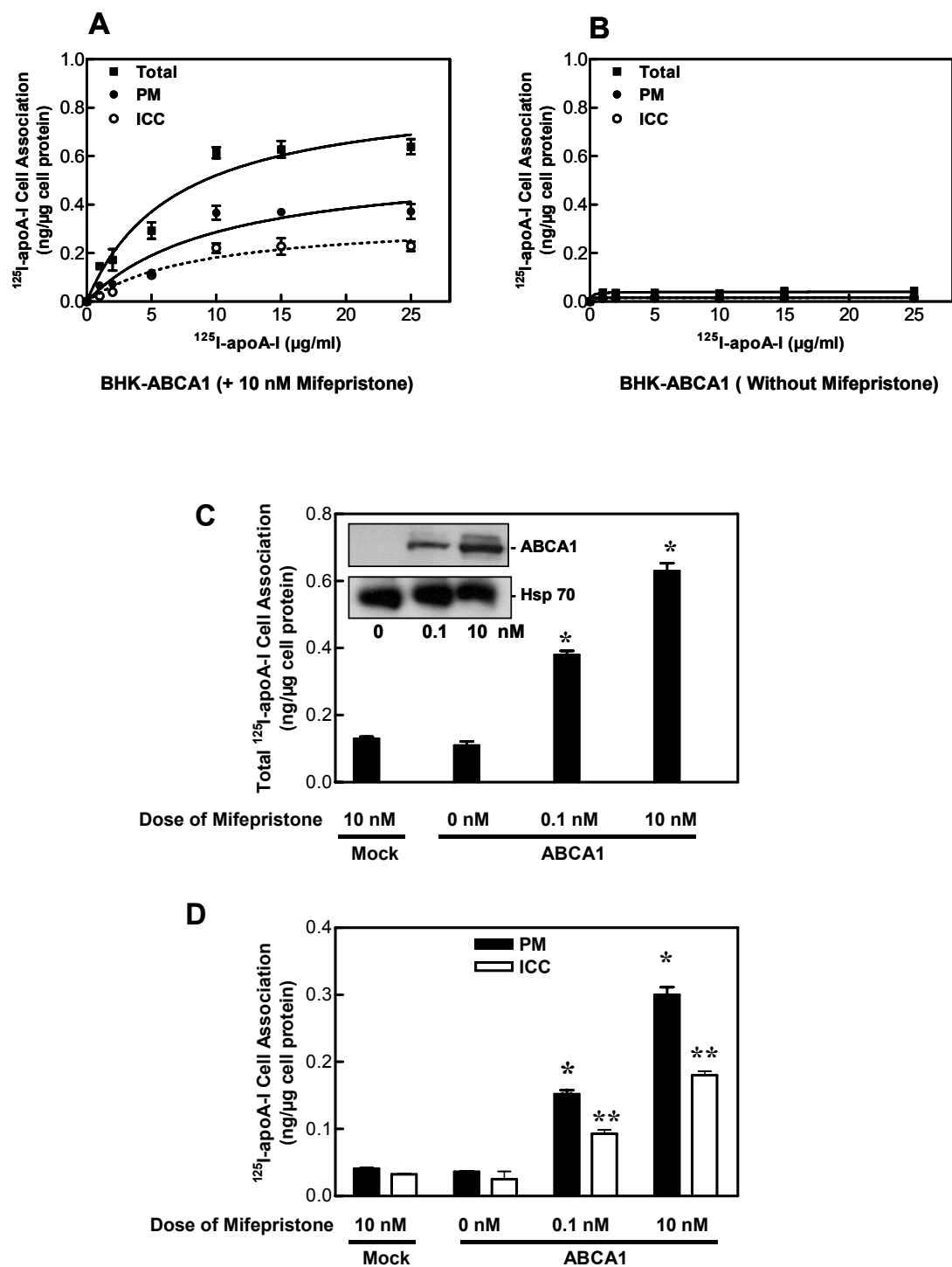
Figure 1. Development of a quantitative biotinylation assay to determine the distribution of apoA-I between the plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICCs). **A**, confluent stimulated normal fibroblasts were incubated with

10 µg/mL of <sup>125</sup>I-apoA-I for 45 min at 37°C. Cells were washed three times with PBS and surface proteins were subject to different amounts of biotin (0.25 to 3 mg/mL). Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed, homogenized, and 200 µg of protein was added to 50 µl of streptavidin-Sepharose beads and incubated overnight on a platform mixer at 4 °C. Recovered supernatants (ICCs) and pellets (PM) washed with lysis buffer were directly counted for radioactivity. **B**, normal fibroblasts stimulated with 22OH/9CRA in the presence or absence of 30-fold excess of unlabeled apoA-I, unstimulated normal fibroblasts, and ABCA1 mutant (Q597R) were incubated with 10 µg/mL of <sup>125</sup>I-apoA-I for 45 min at 37 °C. Surface proteins were biotinylated with (0.5 mg/mL) and <sup>125</sup>I-apoA-I associated with the PM and ICCs was determined as described in **(A)**. **C**, PM and ICCs fractions were separated by SDS-PAGGE and markers that co-localized specifically with the PM (very late antigen (VLA)-2) or ICCs (heat shock protein (HSP)-70 and tubulin) were detected with appropriate antibodies. Values represent the mean ± SD from triplicate wells. Results shown are representative of two different independent experiments.

**Association of apoA-I with the plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICCs)** — To determine the association of apoA-I with the PM and ICCs, either BHK cells treated or not with mifepristone or fibroblasts treated or not with 22OH/9CRA were incubated with increasing concentrations of <sup>125</sup>I-apoA-I for 45 min at 37°C. After washing to remove unbound <sup>125</sup>I-apoA-I, biotinylation was performed and <sup>125</sup>I-apoA-I associated with the PM and ICCs was determined by γ-counting. As shown in **Fig.2A**, <sup>125</sup>I-apoA-I exhibited saturable, concentration-dependent binding to both the PM and ICCs in BHK cells induced with mifepristone. Conversely, <sup>125</sup>I-apoA-I showed no significant association with either fraction in non-induced BHK cells (**Fig.2B**). Similarly, <sup>125</sup>I-apoA-I exhibited saturable binding to both PM and ICCs in 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts (data not shown). Importantly, analysis of affinity

parameters for the association of apoA-I with different cellular compartments revealed that the PM possessed nearly a 2-fold higher capacity ( $B_{max}$ ) to accommodate apoA-I as compared to ICCs in BHK expressing ABCA1 and stimulated fibroblasts. In contrast, apoA-I exhibited similar affinity for both the PM and ICCs (**Table 1**). This result indicates that under conditions of continuous exposure to an excess of apoA-I, two-thirds of apoA-I is found associated with the PM and the remaining one-third with the ICCs.

Transferrin (Tf), a ligand that is known to specifically interact with the transferrin receptor (TfR) and recycle to the cell surface (22) was used as a control. We found that 77% of  $^{125}\text{I}$ -Tf was found associated with the PM and 23% with ICCs in HepG2 ( $0.76 \pm 0.02$  vs.  $0.22 \pm 0.01$  ng Tf/ $\mu\text{g}$  cell protein).



**Figure 2. ABCA1 expression promoted the association of apoA-I with the PM and ICCs.** **A**, BHK stably over-expressing ABCA1 (BHK-ABCA1) were treated or not (**B**) with 10 nM mifepristone for 20 h. Cells were incubated with increasing concentrations of

$^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C. Surface proteins were biotinylated and separated by streptavidin pull-down. A fraction of cell lysate was directly counted for the determination of total  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with the cells. Recovered supernatants (ICCs) and pellets (PM) washed with lysis buffer were directly counted for radioactivity. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Affinity parameters of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I association with the PM and ICCs ( $B_{max}$  and  $K_d$ ) were obtained using Graph Pad Prism 4.00 software and were reported in Table 1. **C**, BHK-ABCA1 cells were treated or not with 0.1 or 10 nM mifepristone for 20 h. Cells were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37 °C. Surface proteins were biotinylated and separated by streptavidin pull-down. A fraction of cell lysate was directly counted for the determination of total  $^{125}\text{I}$ -apoA-I association to the cells. The *inset* shows the separation by SDS-PAGE of equal amounts of cell protein (40  $\mu\text{g}$ ) of ABCA1-transfected cells treated or not with 0.1 or 10 nM mifepristone for 20 h. ABCA1 was detected with an ABCA1 antibody. Cytosolic protein Hsp 70 serves as a loading control. **D**,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I associated with recovered supernatant (ICCs) and pellet (PM) samples was determined by  $\gamma$ -counting. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Results shown are representative of two independent experiments. \*, \*\*,  $p < 0.001$  by Student's *t* test.

**Table 1. Kinetics of apoA-I association and dissociation from the plasma membrane (PM) and intracellular compartments (ICCs) in BHK and fibroblasts.**

Kinetic parameters	Association		Dissociation	
	$App B_{max}$	$App K_d$	$K_{off}$	$t_{1/2}$
	<i>ng/ <math>\mu\text{g}</math> cell protein</i>	<i>ng/ <math>\mu\text{g}</math> cell protein</i>	<i>min<sup>-1</sup></i>	<i>min</i>
<b>BHK-ABCA1</b>				
<b>PM</b>	0.58 $\pm$ 0.05*	2.52 $\pm$ 0.20	30 $\pm$ 5	82 $\pm$ 7**
<b>ICCs</b>	0.31 $\pm$ 0.04	2.20 $\pm$ 0.15	127 $\pm$ 11	20 $\pm$ 3
<b>Fibroblasts + 22OH/9CRA</b>				
<b>PM</b>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.52 $\pm$ 0.14	18 $\pm$ 6	126 $\pm$ 24 <sup>b</sup>
<b>ICCs</b>	0.10 $\pm$ 0.02	1.68 $\pm$ 0.25	84 $\pm$ 18	29 $\pm$ 2

$App B_{max}$ , \*  $p < 0.001$  ; <sup>a</sup>  $p < 0.001$ , PM compared to ICCs in BHK and fibroblasts, respectively.  
 $t_{1/2}$ , \*\*  $p < 0.001$  and <sup>b</sup>  $p < 0.001$ , PM compared to ICCs in BHK and fibroblasts, respectively.  
 Kinetic data were obtained using the Graph Pad Prism 4.0 software.

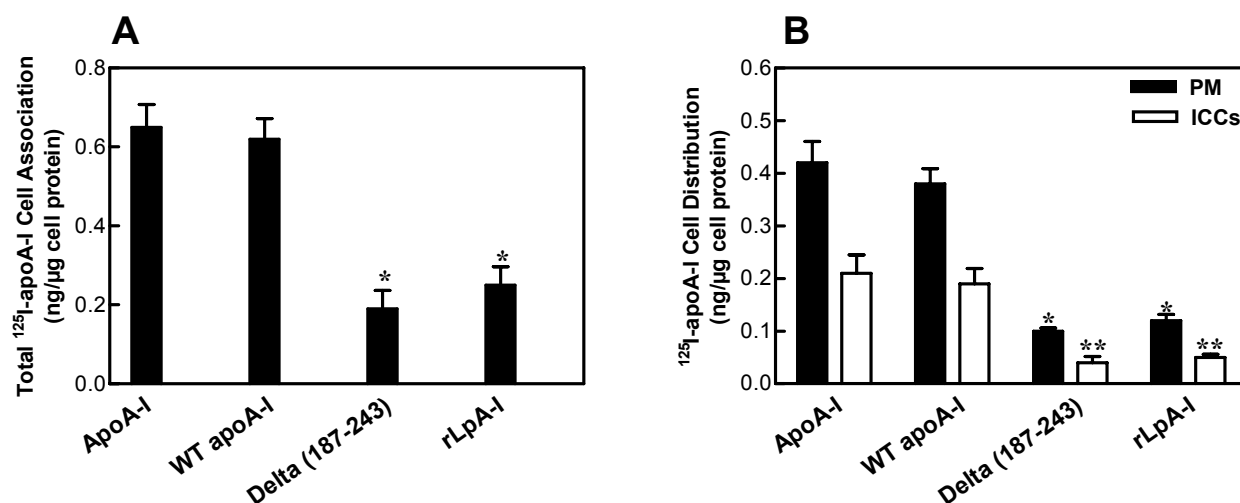
**Effect of the carboxy-terminal deletion of ApoA-I and the lipidation of WT apoA-I on the association with the PM and ICCs** —

It is well documented that the C-terminal region of apoA-I is important in the ABCA1-mediated lipid efflux pathway. Indeed, previous studies have documented that apoA-I deletion mutants lacking residues 187-243 of the C-terminal domain ( $\Delta(187-243)$ ) exhibit both reduced cell surface binding and ability to promote lipid efflux (9,11,15). Furthermore, we have previously shown that lipid association with apoA-I or apoE3 reduced their ability to interact with ABCA1 (20,25,26). We further examined the role of the C-terminal domain of apoA-I and the lipidation of WT apoA-I on the association with different cellular compartments. As shown in **Fig. 3A and B**, apoA-I  $\Delta(187-243)$  and rLpA-I exhibited drastically reduced cell association and association with both the PM and ICCs as compared to lipid-free WT apoA-I. These results indicate that the C-terminal domain of apoA-I is required for the association of apoA-I with both compartments. Similarly, they indicate a requirement of lipid-free apoA-I for compartmentalization.

**Over-expressing ABCA1 promotes the compartmentalization of apoA-I between the PM and ICCs** —

It is well documented that ABCA1 in late endocytic vesicles plays a role in cellular lipid efflux (4,8,23,24). To further examine the role of ABCA1 in the cellular compartmentalization of apoA-I, different levels of ABCA1 were expressed in BHK cells under a mifepristone-inducible ABCA1 gene. As shown in **Fig. 2C (inset)**, without induction, BHK-ABCA1 cells had no detectable ABCA1 protein, whereas cells induced with 0.1

and 10 nM mifepristone for 20h expressed increasing levels of ABCA1. Concomitantly, cellular cholesterol efflux was significantly increased ( $2 \pm 0.35$  %,  $8 \pm 0.22$  % and  $13 \pm 0.68$  %; 0, 0.1 and 10 nM mifepristone; respectively). Furthermore, ABCA1 induction by mifepristone was paralleled by elevated  $^{125}\text{I}$ -apoA-I association to both the PM and ICCs (**Fig. 2 D**). Similarly, stimulation of normal fibroblasts with 22OH/9CRA increased the association of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I with both the PM and ICCs (**Fig.1B**). These results indicate that expression of



ABCA1 is required for the association of apoA-I with both the PM and ICCs.

**Figure 3. Effect of a C-terminal deletion of apoA-I and the lipidation of WT apoA-I on the compartmentalization of apoA-I between the PM and ICCs.** **A**, iodinated apoA-I (isolated from human plasma), WT apoA-I, apoA-I  $\Delta(187-243)$  and rLpA-I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , specific activity = 3800-4000 cpm/ng) were incubated for 45 min at 37°C with induced BHK-ABCA1. After washing to remove unbound ligands, surface proteins were biotinylated and separated by streptavidin pull-down. A fraction of cell lysate was directly counted for the determination total cell-associated iodinated ligands cell association. **B**, recovered supernatants (ICCs) and pellets (PM) washed with lysis buffer were directly counted for radioactivity and the association of different ligands with the PM and ICCs was determined. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate

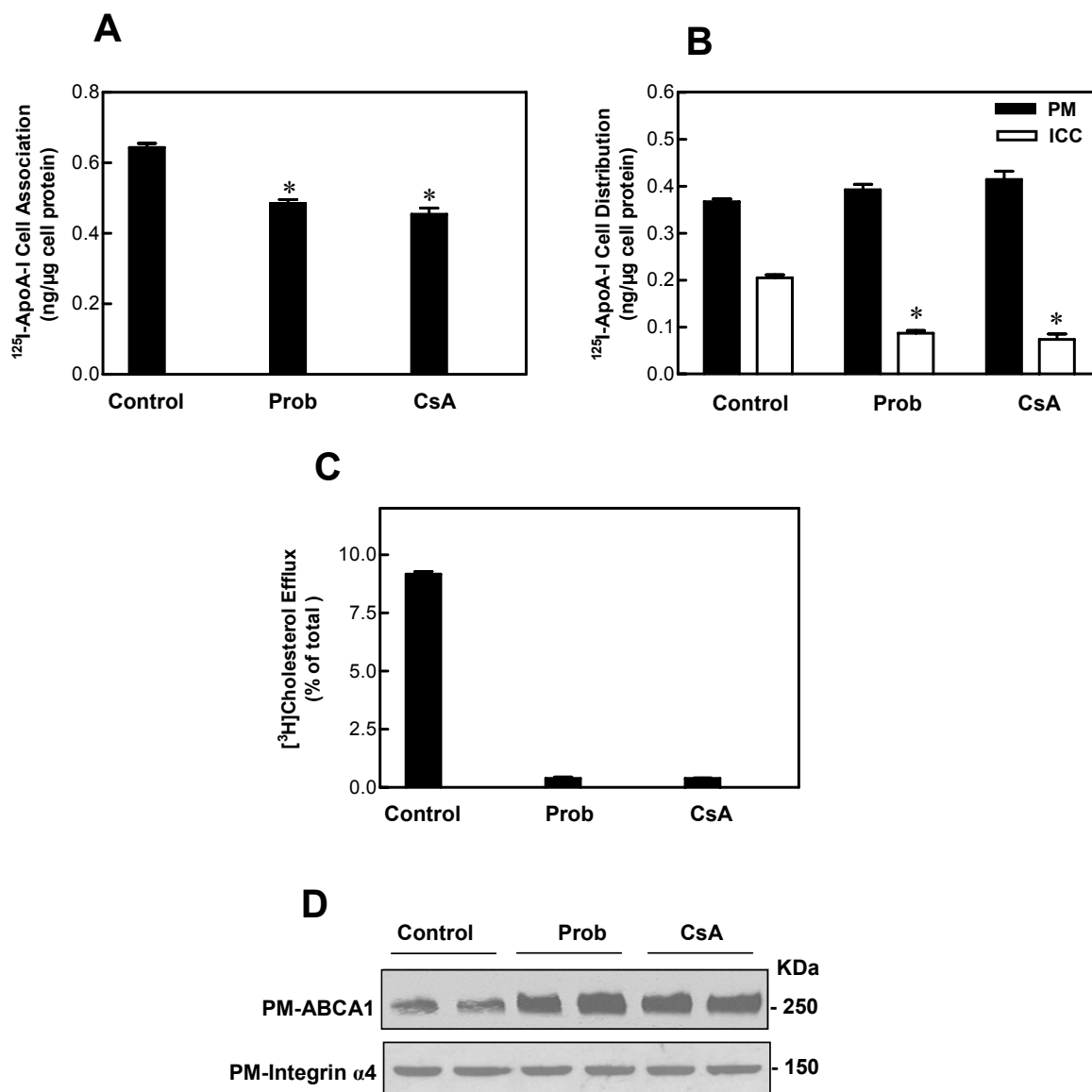


wells. Results shown are representative of two independent experiments. \*,  $p < 0.001$  by Student's *t* test.

**The endocytotic pathway is required for the association of apoA-I with**

**ICCs** — Having demonstrated that ABCA1 expression is required for the compartmentalization of apoA-I, we examined the impact of ABCA1 trafficking on apoA-I association with the PM and ICCs. Cells were treated with either cyclosporine A (CsA) or probucol, which are known to specifically inhibit ABCA1-mediated cholesterol efflux to apoA-I (28,29). CsA is a potent inhibitor of ABCA1 shown to block recycling of ABCA1 from the PM to endosomes, resulting in the inhibition of HDL biogenesis and of ABCA1 degradation by calpain proteases (28). Alternatively, Rothblat and colleagues suggest that probucol inhibits cholesterol efflux by preventing trafficking of ABCA1 to the PM (42). However, Yokoyama and colleagues did not observe any effect of probucol on the trafficking of ABCA1 (29). ProbucoI is suggested to prevent the structural interaction of ABCA1 with apoA-I and to decrease calpain-mediated degradation of ABCA1 (29). As expected, treatment of BHK-ABCA1 cells with either CsA or probucol significantly reduced the amount of cell-associated apoA-I (**Fig. 4A**) and apoA-I mediated cholesterol efflux (**Fig. 4C**). This loss was due to a significant reduction in the association of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I with ICCs, but not the PM (**Fig. 4B**). Furthermore, both CsA and probucol induced a marked increase in ABCA1 association with the PM (**Fig. 4D**). Despite this increase in PM-ABCA1, we did not observe a significant increase in PM-associated apoA-I. Although currently uninvestigated, this may be due to a decreased affinity of ABCA1 for

apoA-I by CsA and probucol treatment. Taken together, these results indicate that alteration of apoA-I and ABCA1 trafficking has a profound effect on the



apoA-I endocytotic pathway and the subsequent apoA-I lipidation process.

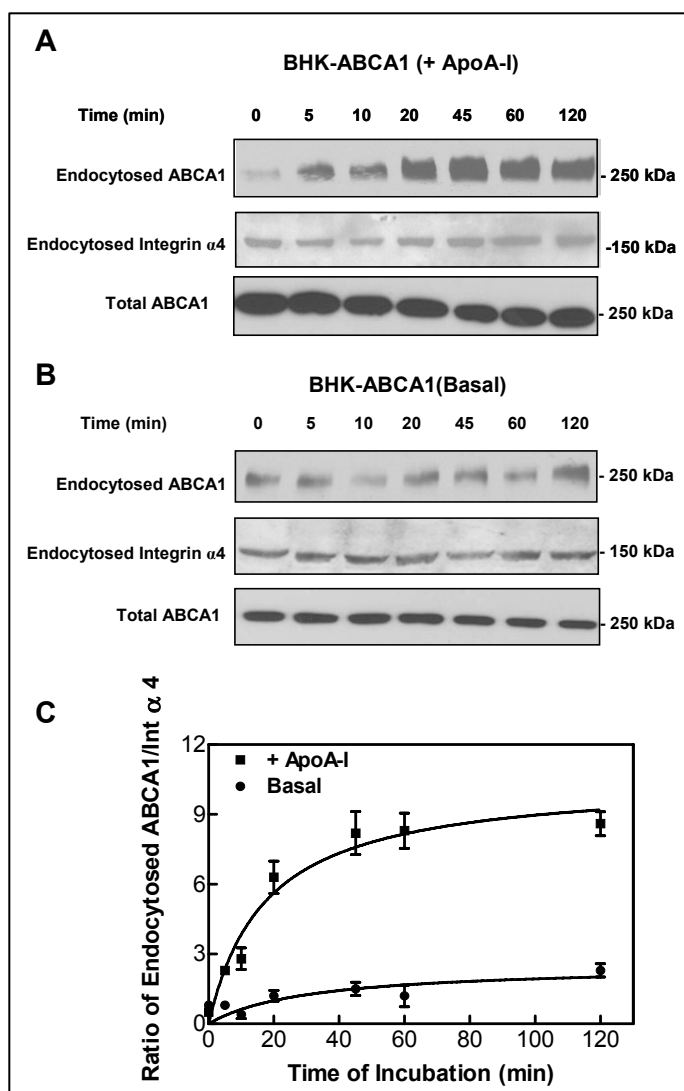
**Figure 4. Probucol (Prob) and cyclosporine A (CsA) inhibit the association of apoA-I with ICCs and promote the retention of ABCA1 at the PM.**

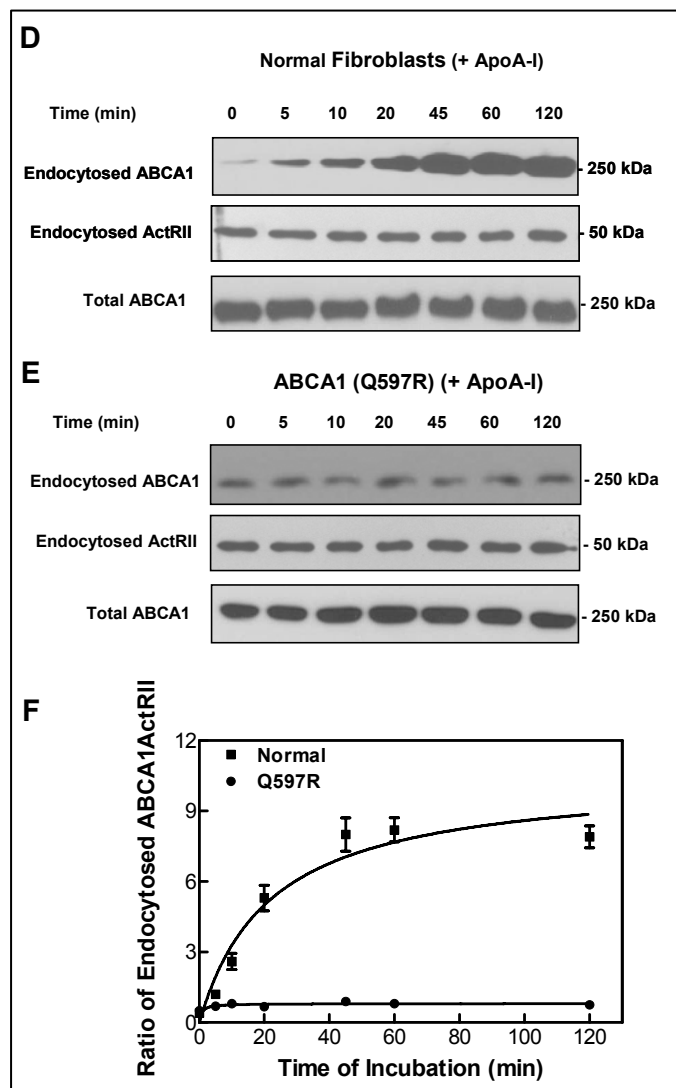
**A**, BHK cells were treated with 10 nM mifepristone for 20 h and were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C in the presence of 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  of probucol or 15  $\mu\text{mol}/\text{L}$  of cyclosporine A. Surface proteins were biotinylated and a fraction of cell lysate

was directly counted for the determination of total  $^{125}\text{I}$ -apoA-I association to the cells. **B**, recovered supernatants (ICCs) and pellets (PM) were directly counted for radioactivity. **C**, Cholesterol efflux was determined in the absence or presence of 10  $\mu\text{mol/L}$  of **Prob** or 15  $\mu\text{mol/L}$  **CsA**. **D**, pellets containing PM fractions were separated by SDS-PAGE in duplicate, transferred and revealed using an anti-ABCA1 antibody or an anti-integrin  $\alpha 4$ . Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Results shown are representative of two independent experiments. \*,  $p < 0.001$  by Student's *t* test.

**ApoA-I induces ABCA1 endocytosis** —Having determined that alteration of ABCA1 endocytic trafficking affects apoA-I association with ICCs and its subsequent lipidation, the question was raised as to whether ABCA1 localized at the cell surface is internalized together with apoA-I during the lipidation reaction. To quantify the amount internalized PM-ABCA1 we applied a cleavable-biotinylation assay. Under this technique, PM proteins are labeled with a cleavable biotin (sNH-SS-biotin) at 4°C and are subsequently transferred to 37°C to permit cellular trafficking. After incubating with or without  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for various periods of time, cells are treated with glutathione, a non-cell permeable reducing agent, which cleaves all PM-biotin. Under these conditions, only PM proteins that have been internalized retain the biotin signal, thus giving an indication of the rate and level of internalization. Biotinylated cells incubated at 4°C and subjected to a reducing agent were used as controls for the efficacy of biotin cleavage by glutathione as described in “Experimental Procedures”. As shown in **Fig. 5A**, a significant accumulation of glutathione-resistant ABCA1 was observed 5 min after the beginning of the internalization assay in the presence of apoA-I in BHK cells. Within 20 min, the amount of endocytosed ABCA1 reached a plateau in the presence of apoA-I, whereas ABCA1 exhibited no

significant internalization in the absence of apoA-I (basal state) in BHK cells (**Fig. 5B**). This was in contrast to integrin  $\alpha 4$ , a known PM marker, whose level of internalization did not change throughout the assay. The ratio of endocytosed ABCA1 over integrin  $\alpha 4$  is shown in **Fig. 5C**. The observed increase in ABCA1 internalization was not attributed to an overall increase in ABCA1 production since the total amount of ABCA1 protein remained constant (**Fig. 5B**).





**Figure 5. ApoA-I induces ABCA1 endocytosis.** BHK-ABCA1 cells (**A**, **B**) were treated with 10 nM mifepristone for 20 h to induce ABCA1 expression. Confluent normal fibroblasts (**D**) and ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts (**E**) were stimulated with 22OH/9CRA. Surface proteins of all cells were biotinylated with cleavable biotin for 30 min at 4°C. After washing, warm (37°C) DMEM containing 10 µg/mL apoA-I was added (**A**, **D**, **E**) or not (**B**). Cells were maintained at 37°C for various time periods to allow for internalization of ABCA1. Subsequently, they were transferred to 4°C, washed, and treated with glutathione. Cell proteins (200 µg) were added to 50 µl of streptavidin-Sepharose beads and incubated overnight on a platform mixer at 4 °C. Pellets

(internalized proteins) were separated on a 4-22.5% SDS-PAGE, transferred, and revealed using an anti-ABCA1 antibody, anti-integrin  $\alpha 4$  (Int  $\alpha 4$ ), or anti-activin receptor type II (ActRII). **C and E**, the ratios of ABCA1 over Int  $\alpha 4$  and ABCA1 over ActRII were quantitated by densitometric scanning. Results shown are representative of four independent experiments.

Similar results were obtained with normal fibroblasts but not TD mutants (Q597R and C1477R). The ratio of ABCA1 over activin receptor type II (ActRII) in 22OH/9CRA-stimulated normal fibroblasts showed increased internalization of ABCA1 (**Fig. 5F**), whereas ABCA1 mutant fibroblasts (Q597R) associated with TD showed no significant internalization in the presence of apoA-I. A representative experiments of internalized ABCA1 in normal and Q597R fibroblasts are shown (**Figs. 5D and E**). Furthermore, we found that ApoA-I-mediated ABCA1 internalization was impaired in ABCA1 mutant (C1477R) associated with TD (data not shown). These results strongly indicate that apoA-I induce the internalization of ABCA1.

**Dynamics of apoA-I dissociation from the PM and ICCs** — To further investigate the contribution of the PM and ICCs to the lipidation of apoA-I, the dissociation (re-secretion) of apoA-I from these compartments was monitored over a 6 h period.  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was incubated for 45 min at 37°C with mifepristone induced BHK-ABCA1 or 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts. After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were chased with medium alone for various time periods (0 to 6 h). As shown in **Fig. 6A and Table 1**, the kinetics of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I dissociation from the PM and its re-secretion from ICCs revealed that the

time required for 50% dissociation of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I from the PM was four-fold slower than that of ICCs at 37°C in both cell lines. At the same time, practically all radioactivity that disappeared from the cell appeared as intact lipidated  $^{125}\text{I}$ -apoA-I in the medium over a 6h period (**Fig. 6B**). Dissociation of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I from the PM and ICCs over the 6h chase was almost completely inhibited at 4°C (data not shown).

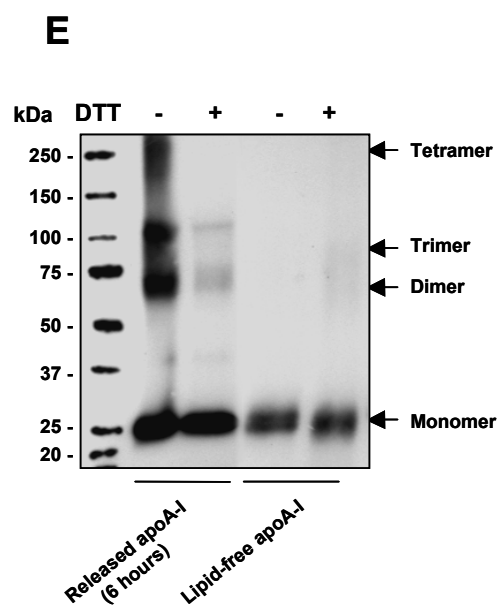
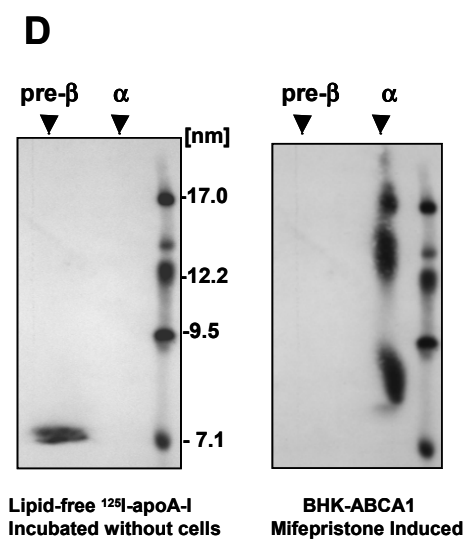
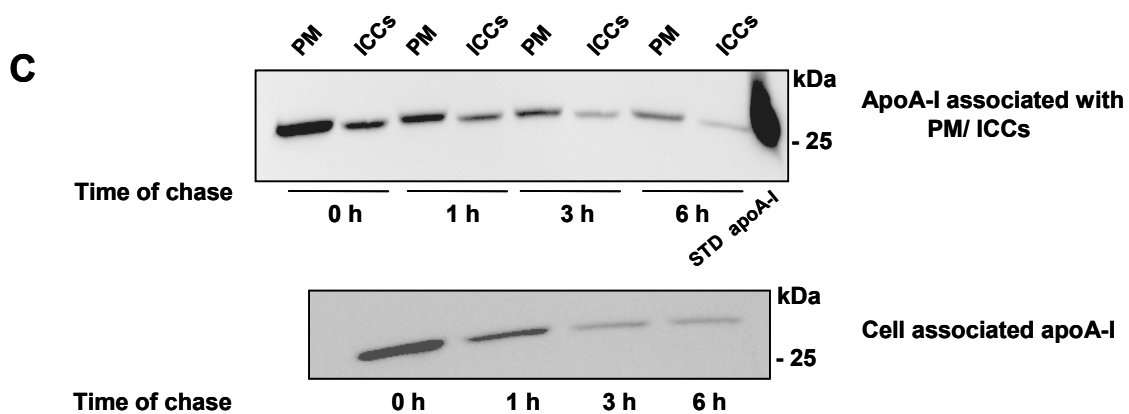
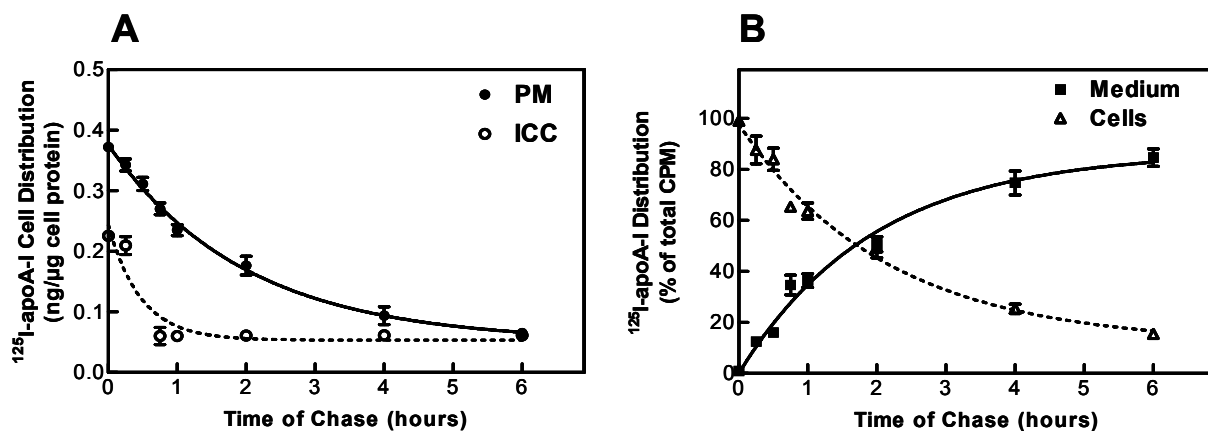
Over 95% of the radioactivity released to the medium and in cell lysates was precipitated by 10% trichloroacetic acid, indicating that endocytosis did not cause significant degradation of apoA-I, consistent with our previous findings (20) (data not shown). These results were verified visually by SDS-PAGE analysis in which a time-dependent loss of apoA-I from both the PM and ICCs was observed, without the appearance of lower molecular weight bands (**Fig. 6C**).

A recent study by Zha and colleagues reported that after incubation of BHK cells overexpressing ABCA1 with apoA-I for 2 hr at 37°C, internalized apoA-I is largely targeted for lysosomal degradation (43). However, we obtained evidence that under these conditions, degradation of apoA-I is increased two-fold as compared to incubation with apoA-I for 45 min at 37°C ( $9.52\pm 0.53\%$  versus  $4.13\pm 0.20\%$ , respectively). Freeman and colleagues demonstrated that in ABCA1-expressing 293 cells, the apoA-I/ABCA1 complex has a half-life of less than 30 min and that 50% of the cell-associated apoA-I is lipidated within 40 min (10). Similarly, we demonstrated previously (17) that in HepG2 cells and fibroblasts, formation of nascent particles occurs within 1 hr at 37°C and

presently (**Table 1**), that the kinetics of dissociation from the ICCs is rapid, with a half-life of 20 min. As such, a large number of lipidation cycles will have occurred within 2 hr incubation, and in doing so, will have reduced the lipid burden of the cell. It is likely that, in the absence of excess cellular cholesterol and/or phospholipids, apoA-I could be targeted for degradation. This is consistent with our finding that depletion of PM-cholesterol by treatment of BHK cells with  $\beta$ -cyclodextrin (50 mM for 45 min at 37°C), followed by incubation with  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C causes a three-fold increase of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I degradation compared to untreated cells ( $16.04 \pm 1.16\%$  versus  $4.13 \pm 0.20\%$ , respectively). More thorough investigations are required to examine cellular factors affecting apoA-I degradation.

Analysis of the dissociated  $^{125}\text{I}$ -apoA-I product by 2D-PAGGE revealed the presence of nascent apoA-I-containing particles having  $\alpha$ -electrophoretic mobility with diameters of 9 to 20 nm (**Fig. 6D**) as we have previously documented (17,20). Non-induced BHK cells were unable to form such particles (data not shown). The structural properties of these released particles were further examined by DSP-crosslinking. These nascent particles contain one, two, three or four molecules of apoA-I as we and others have previously documented (20, 44) (**Fig. 6E**). These results indicate that cell-associated apoA-I is re-secreted more rapidly from the ICCs versus its dissociation from the PM and apoA-I was released from both compartments as nascent apoA-I-containing particles.



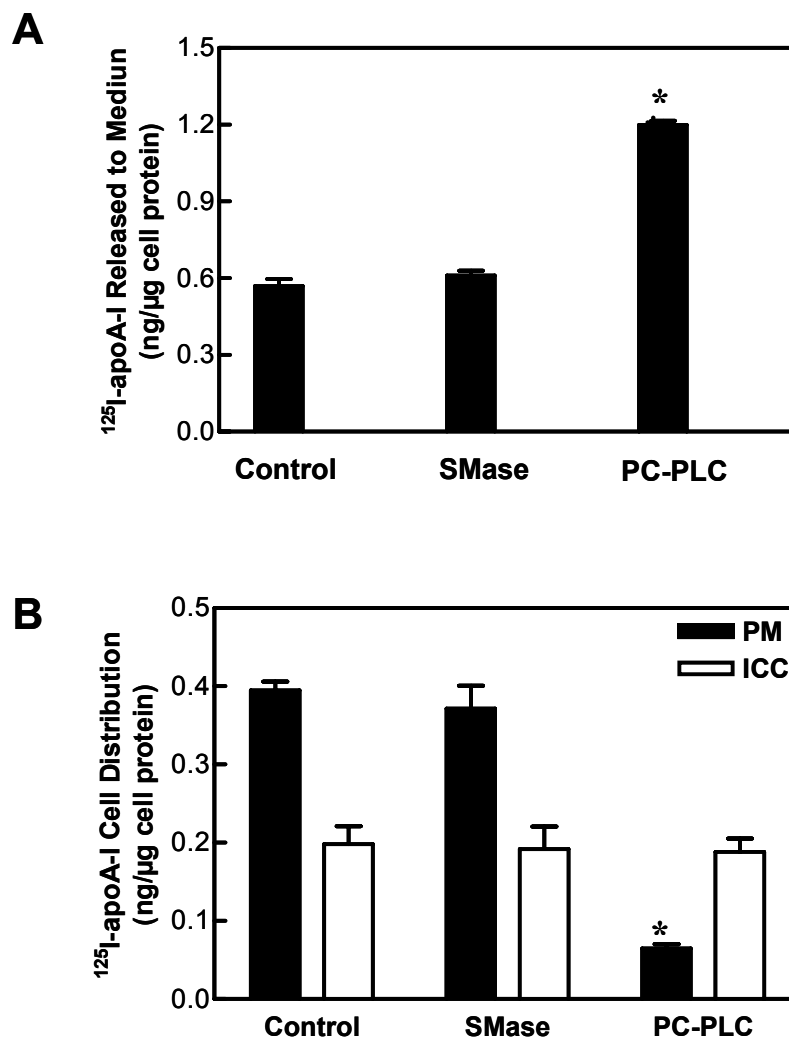


**Figure 6. Kinetics of apoA-I dissociation from the PM and its re-secretion from ICCs.** **A**, BHK cells were treated with 10 nM mifepristone for 20 h and were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37 °C. After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, DMEM was added and the plates were immediately incubated at 37°C for various time periods. At specified time points, surface proteins were biotinylated and recovered supernatants (ICCs) and pellets (PM) were directly counted for radioactivity. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. Kinetic parameters of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I dissociation from the PM and re-secretion from ICCs ( $K_{\text{off}}$  and  $t_{1/2}$ ) were obtained using Graph Pad Prism 4.00 software and were reported in Table 1. **B**,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I released to the media or associated with cell lysate was directly counted for radioactivity. **C**, BHK cells were treated and separated as in (A). Either PM, ICCs fractions or total cell lysate, from specified time points were separated on 8-28% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was directly detected by autoradiography. **D**,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I released to the medium at the time point (6h) from mifepristone induced BHK-ABCA1 cells was analysed by 2D-PAGE.  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was directly detected by autoradiography. Molecular size markers are indicated. **E**,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I released to the medium at the 6h time point from mifepristone-induced BHK-ABCA1 cells was treated with DSP as previously described (20). Samples were reduced or not with 50 mM DTT for 60 min at 37°C and separated by 8-28% SDS-PAGE.  $^{125}\text{I}$ -apoA-I treated with the crosslinker served as a control.  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was directly detected by autoradiography. Molecular markers are indicated.

### **Modulation of apoA-I dissociation from the PM by phospholipids —**

Recently, we and others have described a phosphatidylcholine containing non-ABCA1 PM site with a high binding capacity for apoA-I (31-33). In light of this, we hypothesized that PM-associated apoA-I could be released by treatment with phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC). As shown in **Fig. 7A**, treatment of intact BHK-ABCA1 with PC-PLC, but not sphingomyelinase, increased  $^{125}\text{I}$ -apoA-I dissociation from the PM. In contrast, the re-secretion of apoA-I from ICCs was not affected. As quantified by biotinylation, PC-PLC

treatment reduced by 80% the amount of apoA-I associated with the plasma membrane (**Fig. 7B**). As expected, PC-PLC treatment did not significantly affect the amount of apoA-I associated with ICCs. To assess how effectively phospholipids were removed by phospholipases, the cells were labelled with [<sup>3</sup>H]-choline and the lipids separated by TLC and counted. PC-PLC and SMase treatment digested greater than 65% of phosphatidyl [<sup>3</sup>H]-choline and 80% of [<sup>3</sup>H]-sphingomyelin. Cell membrane integrity and cellular toxicity following phospholipase treatment were monitored by [<sup>3</sup>H]adenine leakage. No significant increase in [<sup>3</sup>H]adenine release was observed by either PC-PLC or SMase treatment compared to untreated cells (data not shown). These results demonstrate that the association of apoA-I with the PM can be modulated by phospholipids and that a large fraction of PM-associated apoA-I is dependent on phosphatidylcholine (31-33).



**Figure 7. Effect of phospholipases on the dissociation of apoA-I from the PM.** **A**, BHK cells were treated with 10 nM mifepristone for 20 h and incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C. After washing to remove unbound  $^{125}\text{I}$ -apoA-I, cells were treated or not with either 2.5  $\mu\text{mL}$  of PC-PLC or 0.4U/mL of SMase for 30 min 37°C and the radioactivity appearing in the medium after treatment or not with phospholipases was determined. **B**, cells were incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $^{125}\text{I}$ -apoA-I for 45 min at 37°C and treated with phospholipases or not as described in (**A**), and then surface proteins were biotinylated. Recovered supernatants (ICCs) and pellets (PM) were directly counted for radioactivity. Values represent the mean  $\pm$  SD from triplicate wells. \*,  $p < 0.001$  by Student's *t* test.

## DISCUSSION

Defining the structural characteristics of cellular apoA-I compartmentalization, trafficking, and re-secretion is key for understanding how nascent HDL genesis occurs at the cellular level. Although the HDL retroendocytosis hypothesis was proposed by Assmann and colleagues (30) two decades ago, its fate, route, and physiological relevance still remain enigmatic. Previous studies by Smith, Neufeld, Brewer, and colleagues (3,7,8) have proposed a model in which the endocytotic pathway plays an important role in the formation of HDL particles. This is consistent with the work of Tall and colleagues (24), showing that deletion of the PEST sequence leads to decreased internalization of ABCA1 and reduced cholesterol efflux from late endosomal cholesterol pools. Furthermore, a recent investigation by von Eckardstein and colleagues (23) documented that ABCA1 modulates apoA-I transcytosis in endothelial cells. These studies strongly support the concept that the internalization and trafficking of ABCA1 is functionally important in mediating the intracellular lipidation of apoA-I.

Our present findings support the existence of two distinct cellular compartments for the assembly of nascent HDL particles. We obtained evidence that under conditions of continuous exposure to an excess of apoA-I the PM obtained a two-fold higher capacity to accommodate apoA-I as compared to ICCs (**Table 1**). We propose that the PM is able to accommodate more apoA-I due to the presence of a phosphatidylcholine-rich high-capacity binding site, as identified recently by our group as well as Phillips and colleagues (31-33).

Despite the fact that only one-third of cell-associated apoA-I was found within ICCs,  $^{125}\text{I}$ -apoA-I was re-secreted four-times faster from ICCs versus its dissociation from the PM (**Fig. 6 and Table 1**). In both cases, apoA-I re-secreted from ICCs and/ or dissociated from the PM was released as nascent HDL (**Fig.7C**).

While the kinetic findings indicate that ICCs represent a metabolically active compartment for the lipidation of apoA-I, in agreement with previous work (3,8), the quantitative assessment suggests an important role of the PM to associate apoA-I and supports the idea that the PM represents an independent lipidation compartment. This is consistent with our previous results documenting that disruption of the HCBS inhibited the formation of nascent HDL (31). It is possible, however, that the PM could act as an initial tether point or apoA-I reservoir, allowing apoA-I to be brought into close proximity for interaction with the endocytotic pathway.

The cause of the disparity between the kinetics of apoA-I dissociation from the PM and its re-secretion from ICCs is unknown, but it may be attributed to the retention of apoA-I by PM structures (lipids, rafts, caveolin or HCBS), consistent with the data showing that PC-PLC treatment increased the dissociation of apoA-I from the PM (**Fig. 7A**). Although it cannot be ruled out that apoA-I re-secreted from ICCs reassociates with the PM, our results showing that apoA-I dissociated and/or re-secreted from both the PM and ICCs are lipidated (**Fig. 6C**), together with the finding that lipidated rLpA-I exhibited decreased association with the PM and ICCs (**Fig. 3B**), do not support such a mechanism.

The structural requirements for apoA-I to associate with the PM and ICCs are as yet unknown. In the present report we obtained evidence that deletion of the C-terminal region of apoA-I, residues 187-243, drastically reduced the compartmentalization of apoA-I between the PM and ICCs (**Fig. 3B**), consistent with our previous report documenting that apoA-I  $\Delta(187-243)$  exhibited reduced binding to both ABCA1 and the HCBS (31). This is in agreement with a previous study by Zannis and colleagues (9) showing that direct cross-linking of apoA-I  $\Delta(185-243)$  and  $\Delta(220-243)$  to ABCA1 produced three-fold higher  $K_d$  values for these mutants compared to WT apoA-I. It is well established that the C-terminal  $\alpha$ -helices are important for effective cellular lipid efflux (9,11). Previously, we have reported that apoA-I  $\Delta(185-243)$  incubated with HepG2 failed to form larger nascent LpA-I particles compared to WT apoA-I (32). These results indicate that the C-terminal region of apoA-I is required for the formation of a productive complex with ABCA1 that leads to the compartmentalization of apoA-I between the PM and ICCs. Loss of compartmentalization by the C-terminal deletion mutant could be due to an inability of apoA-I  $\Delta(185-243)$  to bind directly to specialized phospholipid domains, such as the PC-containing HCBS within the PM (31-33) and/or to an impairment of the apoA-I endocytotic pathway.

The present report supports the concept that the association of apoA-I with the PM and ICCs is dependent on the formation of a high-affinity complex between apoA-I and ABCA1, which allows the compartmentalization and trafficking of apoA-I. We demonstrated that increasing apoA-I binding to ABCA1 by 22OH/9CRA stimulation or over-expression by mifepristone induction

promoted the association of apoA-I to both the PM and ICCs (**Figs. 1B and 2D**). Conversely, disruption of the high-affinity complex formation by deletion of the C-terminal or by lipidation of apoA-I impaired the association of apoA-I with both the PM and ICCs. Taken together, our findings indicate that the initial interaction between apoA-I and ABCA1 plays a pivotal role in determining the subsequent cellular compartmentalization and trafficking of apoA-I, thereby allowing the formation of nascent HDL particles at different subcellular compartments. However, it is possible that this low capacity site involving direct apoA-I/ ABCA1 interaction serves a regulatory function and stabilizes ABCA1, as reported recently by Phillips and colleagues (33).

Although the mechanisms governing ABCA1 turnover and its relationship to the compartmentalization and trafficking of apoA-I remain unknown, previous studies by Tall and colleagues (35) have shown that apoA-I increased cell surface ABCA1 by decreasing its degradation by calpain proteolysis. Additionally, we hypothesized that apoA-I induces continuous rapid internalization of PM-ABCA1. We proposed that, when the ABCA1 transporter system functions at steady state, the internalized apoA-I/ABCA1 complex must dissociate rapidly to allow replenishment of lost cell surface ABCA1 and completion of a large number of apoA-I lipidation cycles. This scenario is strongly supported by the following findings: 1) apoA-I specifically mediates the continuous endocytic recycling of ABCA1 and this process is impaired in TD cells (**Fig. 5**); 2) the re-secretion of <sup>125</sup>I-apoA-I from ICCs was faster than its



dissociation from the PM (**Table 1**); and 3) alteration in apoA-I/ABCA1 trafficking impaired the lipidation process (**Fig. 4**).

It is well documented that ligand binding can induce the phosphorylation of cellular receptors, triggering their oligomerization and endocytosis, and in turn, modulating their function. In light of this, apoA-I may have important implications in the activation of ABCA1, consistent with our previous study (19) which showed that brief treatment of 22OH/9CRA-stimulated fibroblasts or BHK cells over-expressing ABCA1 with apoA-I triggered cAMP production and consequently induced ABCA1 phosphorylation via a PKA-dependent mechanism. This is in agreement with the finding of Oram and colleagues (34) that ABCA1 activity could be regulated by different signaling processes, including the JAK2 pathway. Although apoA-I binds to both the dimeric and tetrameric forms of ABCA1 found in both the PM and ICCs compartments, the presence or absence of apoA-I does not affect the oligomerization of ABCA1 (42).

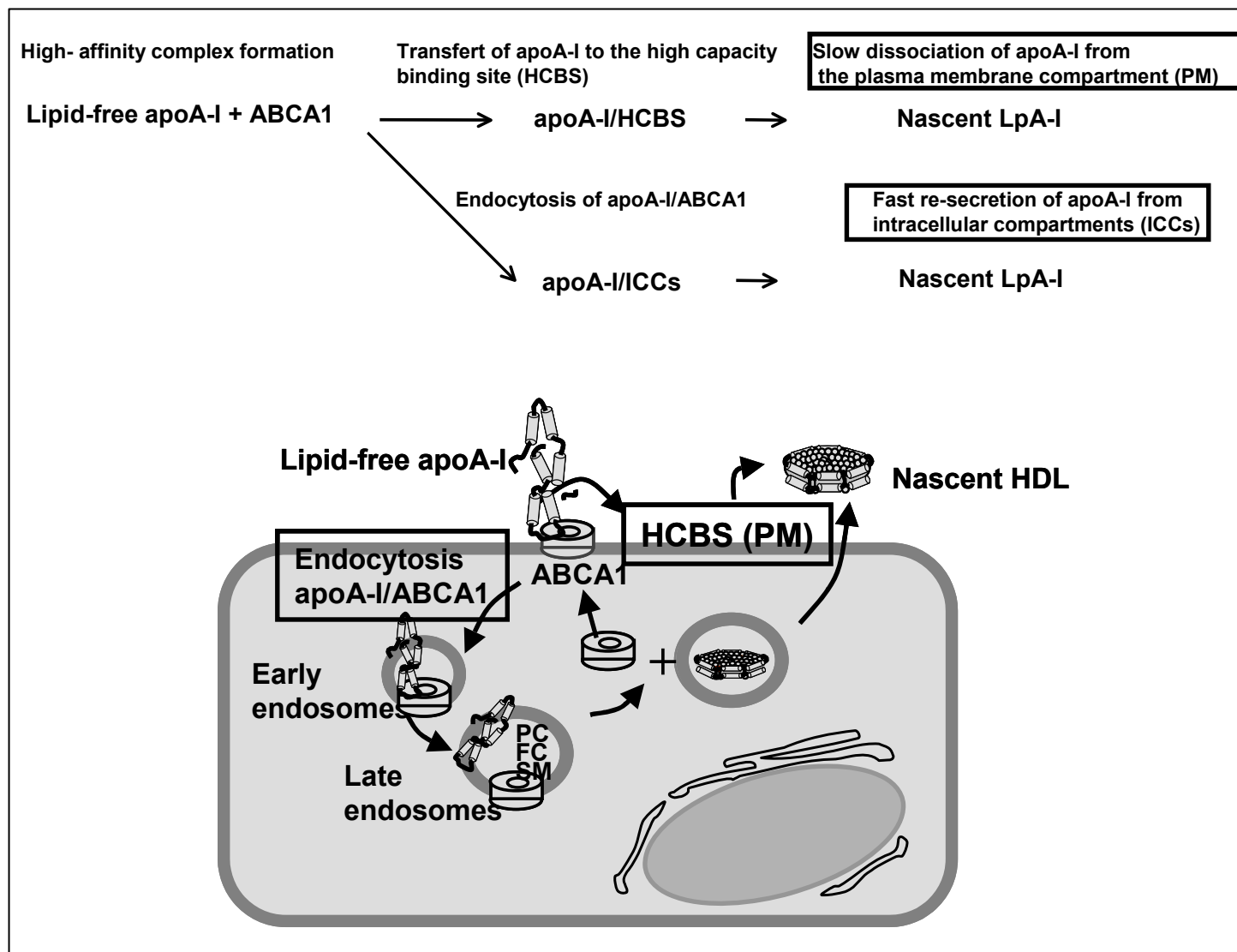
Our recent results showing that disruption of the high capacity binding site impaired HDL formation (31) indicate that a complex regulation mechanism exists for the lipidation of apoA-I within different subcellular compartments. It is likely that the bi-directional vesicular trafficking of ABCA1 is essential not only for the lipidation of apoA-I during its intracellular trafficking, but also for its lipidation within the high capacity binding site at the PM.

A major paradigm shift in the current concept of RCT comes from the proposition of Brewer and colleagues (36), suggesting that the liver is a major

source of plasma HDL-C. This concept is strongly supported by a recent study by Parks and colleagues (37) showing that targeted disruption of hepatic ABCA1 in mice dramatically reduced the level of circulating HDL. It would be of great interest to determine whether similar mechanisms that we propose here for the lipidation of exogenously added apoA-I could operate in hepatocytes and enterocytes. Indeed, Marcel and colleagues (38) have documented that newly synthesized apoA-I in hepatocytes undergoes an early ABCA1-independent phospholipidation in the ER that is followed by significant phospholipidation in Golgi. Furthermore, it has been shown that apoA-I acquires some cholesterol in the ER and Golgi but that the major transfer occurs at the cell surface of hepatocytes, consistent with our results showing the greater capacity of the PM to associate apoA-I (**Table 1**). At the same time, our kinetic data suggests that the endocytotic pathway plays a central role in the formation of nascent HDL, in agreement with current models of nascent HDL biogenesis. Thus, targeting apoA-I to ICCs rich in cholesterol may have important implications in preventing atherosclerotic cardiovascular disease. This is supported by the finding of Tabas and colleagues (39) that the endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages.

The present study has allowed for a direct quantitative comparison to be made between the kinetics of apoA-I compartmentalization, dissociation, and/or re-secretion from the PM and ICCs. Furthermore, we obtained evidence that the specific interrelationship between apoA-I and ABCA1 endocytic trafficking plays a key physiological role in the lipidation process. Our findings support a two-

compartment lipidation model for nascent HDL genesis, as illustrated in **Fig. 8**. The interaction of apoA-I with ABCA1 at the cell surface creates a new apoA-I high capacity-binding site at the PM (31-33) where apoA-I acquires lipids locally and is slowly released directly from the PM as nascent HDL particles (slow lipidation compartment). A second parallel compartment involves endocytosis of both apoA-I and ABCA1 followed by rapid dissociation and targeting of apoA-I to ICCs. ABCA1 is recycled to allow replenishment of lost cell surface ABCA1. ApoA-I extracts lipids locally from these intracellular sites and is rapidly released from the cell as nascent HDL particles (fast lipidation compartment). Development of a kinetic model as reported here is a suitable approach for dissecting a complex intracellular trafficking pathway for apoA-I/ABCA1 that plays an important role in cellular cholesterol homeostasis and the genesis of nascent HDL particles.



**Figure 8. A proposed two-compartment lipidation model for ABCA1-mediated nascent HDL genesis.** The formation of a high-affinity complex between apoA-I and ABCA1 permit the transfer of apoA-I to the PM high capacity-binding site (**HCBS**) where apoA-I acquires lipids locally and is released from the PM as nascent HDL particles (**slow dissociation**). A second parallel lipidation compartment involves endocytosis of both apoA-I and ABCA1 followed by a rapid recycling of ABCA1 and the targeting of apoA-I to **ICCs**, including early endosomes, late endosomes and most likely other intracellular sites. ApoA-I extracts lipids locally from these sites during its intracellular trafficking to form intracellularly lipidated apoA-I that is released from the cell as nascent HDL (**fast re-secretion**).

**Abbreviations:** **22OH**, 22-(R)-hydroxycholesterol; **9CRA**, 9-cis-retinoic acid; **2D-PAGGE**, two-dimensional polyacrylamide non-denaturing gradient gel electrophoresis; **ABCA1**, ATP binding cassette A1; apo, apolipoprotein; **BSA**, Bovine serum albumin; **FC**, free cholesterol; **HDL**, high density lipoprotein; **HCBS**, high capacity binding site; **ICCs**, intracellular compartments; **LpA-I**, nascent apoA-I-containing particle; **PL**, phospholipids; **PC**, phosphatidylcholine; **PM**, plasma membrane; **RCT**, reverse cholesterol transport; **TD**, Tangier disease.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to express their gratitude to Drs. John F. Oram and Ashley M. Vaughan for generously providing BHK cells over-expressing ABCA1 and Dr. Yves L. Marcel for kindly providing apoA-I  $\Delta(187-243)$ . This work was supported by grants MOP 15042 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. J. Genest holds the McGill University-Novartis Chair in Cardiology.

**REFERENCES**

1. Brewer, H. B., Jr., Remaley, A. T., Neufeld, E. B., Basso, F., and Joyce, C. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1755-1760
2. Linsel-Nitschke, P. and Tall, A. R. (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 193-205
3. Takahashi, Y. and Smith, J. D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 11358-11363
4. Smith, J. D., Waelde, C., Horwitz, A., and Zheng, P. (2002) *J. Biol. Chem* **277**, 17797-17803
5. Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A. R., Tabas, I., and Tall, A. R. (2001) *J. Biol. Chem* **276**, 43564-43569
6. Leventhal, A. R., Chen, W., Tall, A. R., and Tabas, I. (2001) *J. Biol. Chem* **276**, 44976-44983
7. Neufeld, E. B., Remaley, A. T., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Cooney, A. M., Comly, M., Dwyer, N. K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2001) *J. Biol. Chem* **276**, 27584-27590
8. Neufeld, E. B., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Jr., Knapper, C. L., Combs, C. A., Cooney, A., Comly, M., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Remaley, A. T., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2004) *J. Biol. Chem* **279**, 15571-15578

9. Chroni, A., Liu, T., Fitzgerald, M. L., Freeman, M. W., and Zannis, V. I. (2004) *Biochemistry* **43**, 2126-2139
10. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Chroni, A., Mendez, A. J., Zannis, V. I., and Freeman, M. W. (2004) *J.Lipid Res.* **45**, 287-294
11. Vedhachalam, C., Liu, L., Nickel, M., Dhanasekaran, P., Anantharamaiah, G. M., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2004) *J.Biol.Chem* **279**, 49931-49939
12. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J., Jr., and Hayden, M. R. (1999) *Nat.Genet.* **22**, 336-345
13. Oram, J. F., Vaughan, A. M., and Stocker, R. (2001) *J.Biol.Chem* **276**, 39898-39902
14. Vaughan, A. M. and Oram, J. F. (2003) *J.Lipid Res.* **44**, 1373-1380
15. Frank, P. G., Bergeron, J., Emmanuel, F., Lavigne, J. P., Sparks, D. L., Denefle, P., Rassart, E., and Marcel, Y. L. (1997) *Biochemistry* **36**, 1798-1806

16. Jonas, A., Steinmetz, A., and Churgay, L. (1993) *J.Biol.Chem* **268**, 1596-1602
17. Krimbou, L., Hajj, H. H., Blain, S., Rashid, S., Denis, M., Marcil, M., and Genest, J. (2005) *J.Lipid Res.* **46**, 1668-1677
18. Le, T. L., Yap, A. S., and Stow, J. L. (1999) *J.Cell Biol.* **146**, 219-232
19. Haidar, B., Denis, M., Marcil, M., Krimbou, L., and Genest, J., Jr. (2004) *J.Biol.Chem* **279**, 9963-9969
20. Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J., Jr. (2004) *J.Biol.Chem* **279**, 7384-7394
21. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Rhee, J. S., Andersson, L. P., Mendez, A. J., and Freeman, M. W. (2002) *J.Biol.Chem* **277**, 33178-33187
22. Raub, T. J. and Newton, C. R. (1991) *J.Cell Physiol* **149**, 141-151
23. Cavelier, C., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2006) *Circ.Res.* **99**, 1060-1066
24. Chen, W., Wang, N., and Tall, A. R. (2005) *J.Biol.Chem* **280**, 29277-29281
25. Hajj, H. H., Blain, S., Boucher, B., Denis, M., Krimbou, L., and Genest, J. (2005) *J.Lipid Res.* **46**, 1457-1465
26. Krimbou, L., Denis, M., Haidar, B., Carrier, M., Marcil, M., and Genest, J., Jr. (2004) *J.Lipid Res.* **45**, 839-848



27. Francis, G. A., Oram, J. F., Heinecke, J. W., and Bierman, E. L. (1996) *Biochemistry* **35**, 15188-15197
28. Le Goff, W., Peng, D. Q., Settle, M., Brubaker, G., Morton, R. E., and Smith, J. D. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2155-2161
29. Wu, C. A., Tsujita, M., Hayashi, M., and Yokoyama, S. (2004) *J. Biol. Chem* **279**, 30168-30174
30. Schmitz, G., Robenek, H., Lohmann, U., and Assmann, G. (1985) *EMBO J.* **4**, 613-622
31. Hajj-Hassan, H., Denis, M., Donna Lee, D.Y., Iatan, I., Nyholt, D., Ruel, I., Krimbou, L., and Genest, J. (2007) *J. Lipid Res.* **PMID:17656736**
32. Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J. (2006) *Curr. Opin. Lipidol.* **17**, 258-267
33. Vedhachalam, C., Ghering, A. B., Davidson, W. S., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1603-1609
34. Oram, J. F. and Heinecke, J. W. (2005) *Physiol Rev.* **85**, 1343-1372
35. Martinez, L. O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W., and Tall, A. R. (2003) *J. Biol. Chem* **278**, 37368-37374

36. Basso, F., Freeman, L., Knapper, C. L., Remaley, A., Stonik, J., Neufeld, E. B., Tansey, T., Amar, M. J., Fruchart-Najib, J., Duverger, N., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2003) *J.Lipid Res.* **44**, 296-302
37. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., and Parks, J. S. (2005) *J.Clin.Invest* **115**, 1333-1342
38. Maric, J., Kiss, R. S., Franklin, V., and Marcel, Y. L. (2005) *J.Biol.Chem.* **280**, 39942-39949
39. Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D., and Tabas, I. (2003) *Nat.Cell Biol.* **5**, 781-792
40. Tabas, I. (2002) *J.Clin.Invest* **110**, 905-911
41. Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J., Jr. (2004) *J.Biol.Chem* **279**, 41529-41536
42. Favari, E., Zanotti, I., Zimetti, F., Ronda, N., Bernini, F., and Rothblat, G.H. (2004) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**, 2345-2350
43. Denis, M., Landry, Y.D., and Zha, X. (2007) *Circulation* **116**, II 284c

44. Vedhachalam, C. Duong, P.T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2007)  
*J.Biol.Chem.* **282**, 25123-25

## Chapitre V

### Article #3 \*

#### 1. Contexte de travail

Des anciennes études ont documenté qu'une sous-classe mineure des HDLs humaines, qui migre en position pré- $\beta$  sur des gels d'agarose, agissent comme premier accepteur de cholestérol cellulaire et peuvent éliminer le cholestérol libre des fibroblastes en culture plus rapidement que les HDLs plasmatiques qui migrent en position  $\alpha$ . En outre, il a été documenté que les particules pré- $\beta$ -HDL présentes dans la lymphe périphérique des chiens jouent un rôle principal pour dans le déplacement initial du cholestérol. Ceci est conforme avec le concept dans lequel l'apoA-I libre interagit avec un site sur la membrane cellulaire et génère des particules naissantes de pré- $\beta$ -HDL.

C'est dans ***le but d'élucider la voie par laquelle les particules de pré- $\beta$ -HDL contribuent au mécanisme du transport du cholestérol à rebours*** que le travail a été entrepris.

Dans l'article suivant,

**Houssein Hajj Hassan** a fait la majeure partie du travail et a écrit le manuscrit.

**Sacha Blain, Betsie Boucher et Maxime Denis** ont aidé dans la culture des cellules et la manipulation des expériences.

**Larbi Krimbou** a co-écrit le manuscrit.

**Jacques Genest** a supervisé le travail

**Structural Modification of Plasma HDL by Phospholipids Promotes  
Efficient ABCA1-mediated Cholesterol Release**

**Houssein Hajj Hassan, Sacha Blain, Betsie Boucher, Maxime Denis  
Larbi Krimbou and Jacques Genest**

J Lipid Res. 2005 Jul;46(7):1457-65. Epub 2005 Jan 16

From the Cardiovascular Genetics Laboratory, Cardiology Division, McGill  
University Health Center / Royal Victoria Hospital, Montréal, Québec H3A 1A1,  
Canada

**Running title: Interaction of lipid-poor apoA-I with ABCA1**

**ABSTRACT**

It has been suggested that ABCA1 interacts preferentially with lipid-poor apoA-I. Here, we show that treatment of plasma with dimyristoyl phosphatidylcholine multilamellar vesicles (DMPC-MLV) generates pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles similar to those of native plasma. Isolated pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles inhibited the binding of  $^{125}$ I-apoA-I to ABCA1 more efficiently than HDL<sub>3</sub> (IC<sub>50</sub> = 2.20  $\pm$  0.35 vs. 37.60  $\pm$  4.78  $\mu$ g/mL). We next investigated the ability of DMPC-treated plasma to promote phospholipid (PL) and unesterified (free) cholesterol (FC) efflux from J774 macrophages stimulated or not with cAMP. At the ratio of 2 mg DMPC/ mL plasma, both PL and FC efflux were increased by (~ 50% and 40%, respectively) in cAMP-stimulated cells compared to unstimulated cells. Furthermore, PL and FC efflux from cAMP-stimulated cells to DMPC-treated plasma were reduced by (60% and 45%, respectively) in the presence of glyburide, an inhibitor of ABCA1 activity. Removal of apoA-I-containing lipoproteins from normolipidemic plasma drastically reduced FC efflux mediated by DMPC-treated plasma. Finally, treatment of Tangier disease (TD) plasma with DMPC affected neither the amount of pre- $\beta_1$ -LpA-I nor FC efflux. These results indicate that DMPC enrichment of normal plasma resulted in redistribution of apoA-I from  $\alpha$ -HDL to pre- $\beta$ -HDL, allowing for more efficient ABCA1-mediated cellular lipids release. Increasing plasma pre- $\beta_1$ -LpA-I level by either pharmacological agents or direct infusions might prevent foam cell formation and reduce atherosclerotic vascular disease.

**Keywords:** lipid-poor apoA-I, ABCA1, cholesterol efflux, phospholipid

## **ABBREVIATIONS**

2D-PAGGE, two-dimensional polyacrylamide non-denaturing gradient gel electrophoresis; ABCA1, ATP binding cassette A1; apo, apolipoprotein; BSA, Bovine serum albumin; BBSM, bovine brain sphingomyelin; CETP, cholesteryl ester transfer protein; DMPC, dimyristoyl phosphatidylcholine; POPC, palmitoyloleoyl phosphatidylcholine; FHD, Familial HDL deficiency; HDL, high density lipoprotein; H-TGL, hepatic lipase; LCAT, lecithin : cholesterol acyl transferase; RCT, reverse cholesterol transport; SM, sphingomyelin; SR-BI, scavenger receptor class B type I; TD, Tangier disease.

## INTRODUCTION

High-density lipoprotein (HDL) is believed to be a potent physiological protective system against atherosclerotic vascular disease. Although it has become generally accepted that this protective effect of HDL is attributable to its pivotal role in the reverse cholesterol transport (RCT) process (1;2), structural determinants of molecular interactions between circulating HDL particles and key cell proteins governing the RCT process are complex and not well understood.

A growing body of evidence indicates that the ATP binding cassette transporter (ABCA1) is a critical cell surface protein required for the transfer of cellular lipid and maintenance of HDL levels in plasma and is likely important for the first step of RCT from peripheral tissues including macrophages in the vessel wall (3;4). Furthermore, Brewer and colleagues (5) have documented that hepatic ABCA1 is a key protein for the formation and maintenance of plasma HDL levels. Moreover, the importance of ABCA1 in the lipidation of apoA-I is highlighted by the finding that over 50 mutations in the ABCA1 gene have been associated with a variety of clinically distinct HDL-deficiency diseases including Tangier Disease (TD) and Familial HDL Deficiency (FHD) (6;7). These patients are characterized by extremely low HDL-cholesterol levels, caused by defective transport of cellular cholesterol and phospholipids to the extracellular space, leading to hypercatabolism of lipid-poor nascent HDL particles (8).

Earlier studies by Fielding and colleagues (9;10) have documented that a minor subspecies of human HDL that migrates with pre- $\beta$  mobility on agarose



gel can remove free cholesterol from cultured fibroblasts at a faster rate than  $\alpha$ -migrating HDL, which comprises the bulk of plasma HDL. Furthermore, it was documented that pre- $\beta$ -HDL particles were present in the peripheral lymph of dogs (11), suggesting a key role for these particles in the initial removal of cholesterol. This is consistent with the concept of Yokoyama and colleagues (12) that lipid-free or lipid-poor apoA-I interact with a site on cell membrane, removes cellular lipids and generates nascent pre- $\beta$ -HDL particles. Subsequently, pre- $\beta$ -HDL particles become mature, spherical, and  $\alpha$ -migrating HDL by the action of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT), which converts free cholesterol to cholesteryl ester. Moreover, this concept is supported by studies demonstrating that pre- $\beta$ -HDL particles acts as an initial acceptor of cellular cholesterol and shuttles it into a series of larger pre- $\beta$  particles and ultimately to  $\alpha$ -migrating particles (13;14).

In spite of the importance of pre $\beta_1$ -LpA-I particles in RCT, very little is known about their contribution to human plasma ABCA1-dependent cholesterol efflux pathway. This is likely due to the low amount of these particles and the difficulty in their isolation. These problems were circumvented in the present study by increasing the plasma level of pre $\beta_1$ -LpA-I using dimyristoyl phosphatidylcholine multilamellar vesicles (DMPC-MLV). Therefore, experiments were directed in the present report at determining the affinity of these newly formed pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles for ABCA1 and monitoring their ability to promote cholesterol efflux from a macrophage cell culture model.

## MATERIALS AND METHODS

*Samples* — Blood samples were obtained from normolipidemic male subjects with apoE3/3 phenotype after an overnight fast. Blood was drawn from the antecubital vein into tubes containing ethylenediamine-tetraacetate (EDTA, final concentration: 1.5 mg/mL). Collection tubes were immediately placed in ice before being centrifuged (3,000 rpm, 15 min, 4°C). For experiments in which plasmas were incubated with cells, streptokinase was used as the anticoagulant at a final concentration of 150 U/mL blood. Plasma was separated from red blood cells by aspiration and was kept in ice until treatment with phospholipids or electrophoretic separation of apoA-I-containing particles. This study was approved by the Ethic committees of the institutions. Plasmas from Tangier disease subjects (TD) were provided by Dr. Arnold von Eckardstein from Institute of Arteriosclerosis Research, Münster, Germany.

*Incubation of plasma with phospholipids — phospholipid multilamellar vesicles (MLV)* containing either dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), palmitoyloleoyl phosphatidylcholine (POPC) or bovine brain sphingomyelin (BBSM) were prepared as previously described (15). Plasma from each of either 3 normolipidemic or 3 TD subjects (Table 1) was incubated with phospholipids at their phase transition temperature for 1h in the presence of 2 mM DTNB to inhibit LCAT activity. After incubation, the samples were separated by agarose gel or 2D-PAGGE. At the same time, DMPC-treated plasma samples were depleted from apoB-containing lipoprotein by precipitation with PEG 6000, as

described previously (16) before phospholipid (PL) and cholesterol (FC) efflux experiments.

*Separation of lipoproteins by two-dimensional non-denaturing gradient gel electrophoresis (2D-PAGGE)* — ApoA-I-containing particles were separated by 2D-PAGGE, as previously described (17). Briefly, samples (30-100  $\mu$ L) were separated in the first dimension (according to their charge) by 0.75% agarose gel electrophoresis (100 V, 3 h, 4°C) and in the second dimension (according to the size) by 5-23% polyacrylamide concave gradient gel electrophoresis (125 V, 24 h, 4°C). Iodinated high molecular weight protein mixture (7.1 nm to 17.0 nm, Pharmacia) was run as a standard on each gel. Electrophoretically separated samples were electrotransferred (30 V, 24 h, 4°C) onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham). ApoA-I-containing particles were detected by incubating the membranes with immunopurified polyclonal anti-apoA-I antibody (Biodesign).

*Isolation of plasma pre $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I particles* — Either native plasma pre $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I or pre $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-like particles were isolated from freshly normolipidemic plasma treated or not with DMPC under nondenaturing conditions as we have previously described (18) with the following modifications. Plasma samples were incubated or not with DMPC (2 mg/mL plasma) for 1h at 24°C in the presence of 2 mM DTNB. DMPC-treated plasma or untreated plasma was subjected to human immunopurified anti-apoA-I antibody (12171-21A, Genzyme Corp)-coupled sepharose column. ApoA-I-containing fractions were then dialyzed and concentrated. Samples were separated by agarose gel electrophoresis, and the

pre- $\beta$ -migrating region was excised out. Agarose gel pieces containing the pre- $\beta$ -migrating region were placed at the top of 3-26% non-denaturing gradient gels, as previously described (19). An immunoblot of apoA-I-containing lipoproteins separated by 2D-PAGGE gels was used as a template to localize pre- $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I, which is recovered from the gels by electroelution. Pre- $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I particles were further concentrated by ultrafiltration (spiral ultrafiltration cartridge, MWCO 50,000, Amicon) to discard any lipid-free apoA-I or proteolytic peptides. The integrity of isolated both pre- $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I and pre- $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I-like particles were verified by 2D-PAGGE. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed the presence of a single apoA-I band free of proteolytic peptides. Typically, 2 mg of pre- $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I were obtained with an overall recovery of 20%.

*Human plasma apoA-I* — Purified plasma apoA-I (Biodesign) was resolubilized in 4M guanidine HCL and dialyzed extensively against Tris buffer, (10 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8.2). Freshly resolubilized apoA-I was used within 48 h.

*Competition Binding Assays* — Competition binding assays were performed as previously described (18;20). Briefly, apoA-I was iodinated with <sup>125</sup>Iodine by IODO-GEN® (Pierce) to a specific activity of 800-1500 cpm/ng apoA-I. Normal fibroblasts were grown on 24-well plates and were stimulated with 2.5  $\mu$ g/mL 22-(R) hydroxycholesterol and 10  $\mu$ M 9-*cis*-retinoic acid for 20 h. Cells were then incubated at 37°C with <sup>125</sup>I-apoA-I in DMEM/BSA in the presence of increasing amounts of either isolated pre- $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I-like particles, HDL<sub>3</sub> or unlabeled apoA-I for 2 h. The cells were then washed rapidly two times with ice cold PBS/BSA,

two times with cold PBS and lysed with 0.1 N NaOH. The amount of bound iodinated ligand was determined by gamma counting.

*Cellular lipid efflux and lipid labeling* — J774 mouse macrophages were cultured in RPMI 1640 with 10% FCS. At confluence, cells were labeled with 4  $\mu\text{Ci}$  /mL  $^3\text{H}$ -cholesterol or 4  $\mu\text{Ci}$  /mL  $^3\text{H}$ -choline (Perkin Elmer) for 24h. After a 24h labeling period, the cells were washed and then incubated with 0.2% BSA in RPMI with or without 0.3 mM 8-Br-cAMP for 12 h. Plasma incubated or not with DMPC was depleted of apoB-containing lipoproteins with PEG 6000 and dialyzed. Plasma samples (20  $\mu\text{g}$  of apoA-I) were then incubated with cAMP-stimulated or unstimulated cells for 4h at 37°C. In some experiments, 300 $\mu\text{M}$  glyburide was added to the medium together with the acceptors. Cellular lipid efflux was determined as follow:  $^3\text{H}$  cpm in medium / ( $^3\text{H}$  cpm in medium +  $^3\text{H}$  cpm in cells); the results were expressed as % of total radiolabeled phospholipid or cholesterol.

*Lipid and Lipoprotein Assays* — Cholesterol and triglyceride concentrations were determined enzymatically on an autoanalyzer (Cobas Mira, Roche Molecular Biochemicals). HDL-cholesterol concentration was determined by measuring cholesterol in the supernatant after precipitation of apoB-containing lipoproteins with heparin-manganese from the  $d > 1.006$  g/mL fraction prepared by ultracentrifugation. Plasma apoA-I and ApoB concentrations were determined by nephelometry (Behring Nephelometer 100 Analyzer) or by ELISA. ApoE in total plasma was assayed by ELISA. The number of apoA-I molecules per particle was estimated by cross-linking with dithiobis (succinimidylpropionate)

(26). Total phospholipid was determined in native pre- $\beta_1$ -LpA-I or pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particle by the method of Sokoloff and Rothblat (31).

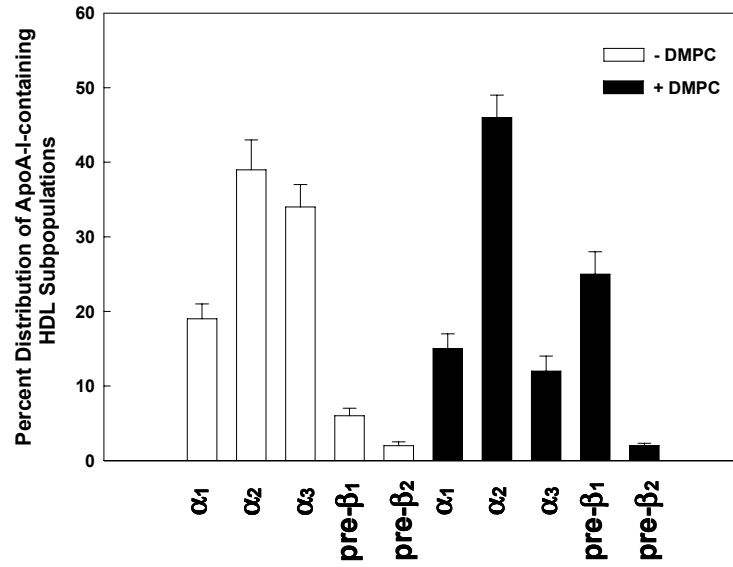
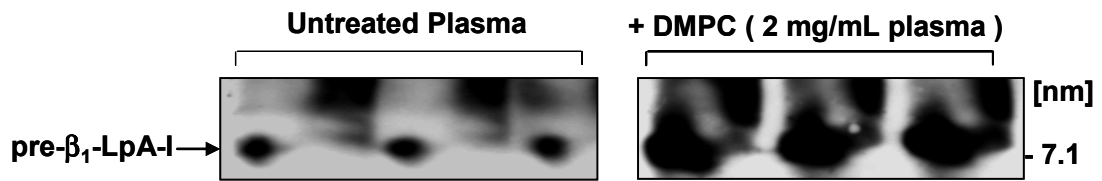
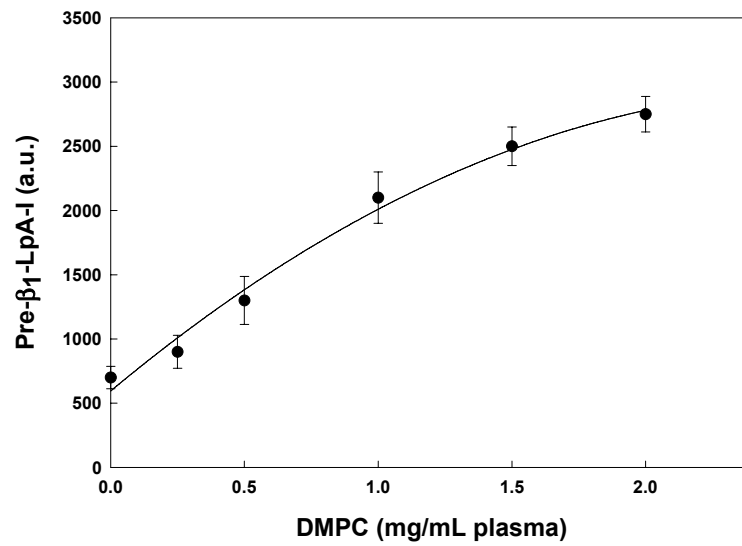
*Statistical analysis* — Statistical analyses were performed with SigmaPlot statistical software (Jandel Corporation, San Rafael, CA). Data were expressed as means  $\pm$  SD. Student's *t*-test was used for comparisons between groups.

## RESULTS

Previous studies by Swaney and others (15;21) have documented that enrichment of human serum with phospholipid promotes the formation of new HDL-like complexes. To further investigate the effect of DMPC treatment on the redistribution of apoA-I within HDL subpopulations, the relative concentration of apoA-I-containing HDL subpopulations was determined by 2D-PAGGE, as previously described by Asztalos and colleagues (30). Plasma samples from 3 normolipidemic subjects (Table 1) treated or not with dimyristoyl phosphatidylcholine multilamellar vesicles (DMPC-MLV, 2 mg /mL plasma) were separated by 2D-PGGE and different HDL subpopulations were quantified by densitometric scanning of radiographic films used to detect the presence of apoA-I associated with HDL subfractions. As shown in Fig.1A, DMPC treatment of plasma increased significantly the concentrations of pre- $\beta_1$ -LpA-I (+19%,  $P < 0.001$ ), whereas the concentrations of the small LpA-I  $\alpha_3$  particles were significantly decreased (-22%,  $P < 0.001$ ). At the same time, no significant changes were observed in  $\alpha_1$  (- 4%),  $\alpha_2$  (+7%) or pre- $\beta_2$ -LpA-I concentrations following DMPC-treatment. Interestingly, after treatment of plasma with DMPC, there was a marked shifting of  $\alpha$ -migrating HDL subpopulations towards pre- $\beta$ -mobility. Furthermore, incubation of plasma from a normolipidemic subject (Control 1, Table1) with DMPC generates pre- $\beta_1$ -LpA-I particles in a dose-dependent manner as determined by densitometric scanning of radiographic films used to detect the presence of apoA-I associated with pre- $\beta_1$ -LpA-I separated by 2D-PAGGE (Fig.1B, upper panel). The newly formed pre- $\beta$ -HDL

complexes have the size and charge similar to native plasma pre- $\beta_1$ -LpA-I (designated pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles) (Fig.1B, lower panel). In separate experiments we demonstrate that incubation of plasma with either palmitoyloleoyl phosphatidylcholine (POPC-MLV) or bovine brain sphingomyelin (BBSM-MLV) did not affect significantly plasma pre- $\beta_1$ -LpA-I levels. Analysis of isolated pre- $\beta_1$ -LpA-I and pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles by silver-stained SDS-PAGE showed a single band in the apoA-I region (28 kDa). Furthermore, cross-linking with DSP of isolated native pre- $\beta_1$ -LpA-I and pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles showed that both of these particles had one apoA-I molecules per particle (data not shown). On the other hand, the total phospholipid-to- apoA-I molar ratios of isolated native pre- $\beta_1$ -LpA-I and pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles varied with each preparation but clearly demonstrate the presence of several molecules of PL in both of these particles. Native pre- $\beta_1$ -LpA-I and pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles contained approximately 3 and 6 molecules of PL per molecule of apoA-I, respectively. However, both of these particles contained no detectable or background amounts of cholesterol, as assayed by enzymatic methods.



**A****B**

**Figure 1. The effect of DMPC treatment on the relative concentrations of plasma apoA-I-containing HDL subpopulations.** **A**, one ml of plasma from each of 3 normolipidemic subjects was preincubated or not for 1h with (2 mg DMPC-MLV/mL plasma) at 24°C in the presence of 2 mM DTNB to inhibit LCAT, and then plasma samples were separated by 2D-PAGGE. Different HDL subpopulations were quantified by densitometric scanning of radiographic films used to detect the presence of apoA-I associated with HDL subfractions. Results of triplicate measures (means  $\pm$  SD, n=3) are shown. **B (upper panel)**, one ml plasma from a normolipidemic subject (Control 1) was preincubated for 1h with increasing amounts of DMPC-MLV at 24°C in the presence of 2 mM DTNB to inhibit LCAT, and then plasma samples were separated by 2D-PAGGE. After electrophoresis all samples were electrotransferred together on the same nitrocellulose membrane for appropriate comparison and were revealed for apoA-I. ApoA-I associated with pre- $\beta_1$ -LpA-I was quantitated by densitometric scanning. Results of triplicate measures (means  $\pm$  SD) are shown. **B (lower panel)**, plasma treated or not with (2 mg DMPC-MLV/mL plasma) as described above was separated by 2D-PAGGE and apoA-I associated with pre- $\beta_1$ -LpA-I was detected by human anti-apoA-I antibody.

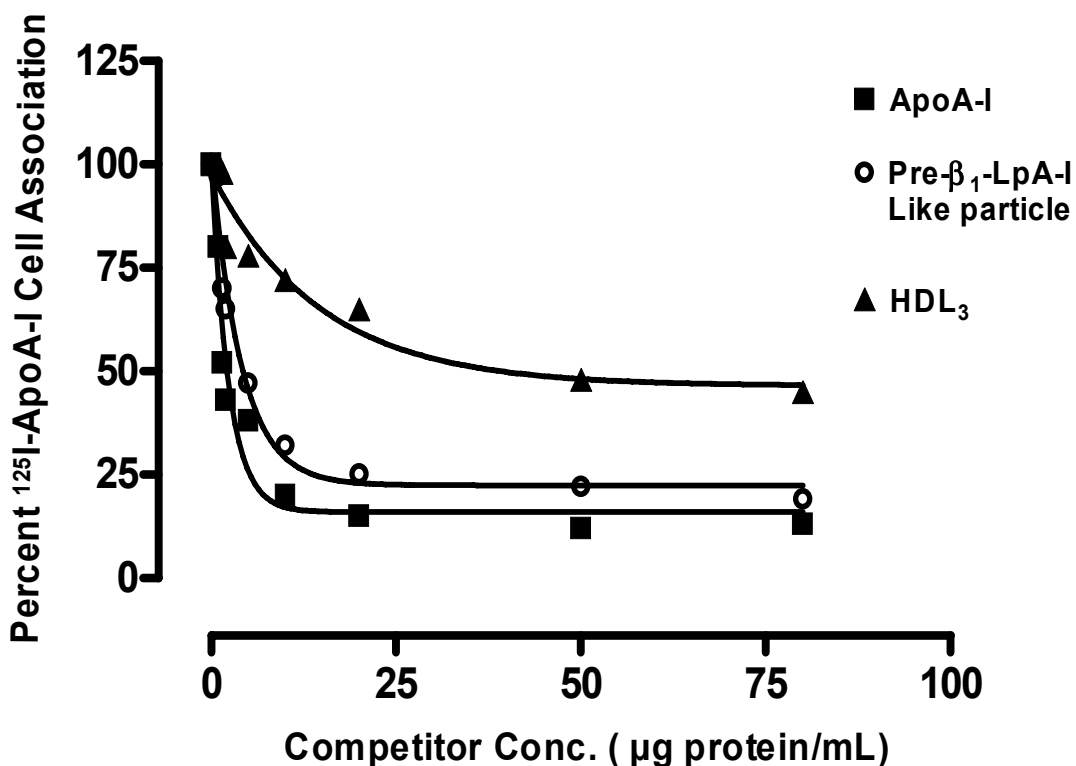
Table I. Levels of cholesterol, triglyceride and apolipoprotein in normolipidemic and ABCA1 deficiency subjects

Subjects	Plasma Concentration					
	Cholesterol	Triglycerides	HDL- Cholesterol	ApoB	ApoA- I	ApoE
	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mg/dL</i>	<i>mg/dL</i>	<i>mg/dL</i>
Controls						
1	3.41	1.12	1.35	90	140	4.14
2	3.97	0.70	1.52	85	138	3.60
3	4.30	0.90	1.65	88	153	3.90
ABCA1 Deficiency						
TD1	4.14	2.54	0.11	177	6	2.9
TD2	3.50	2.10	0.09	87	3	2.4
TD3	3.20	1.67	0.10	79	5	2.7

TD, Tangier Disease

Having determined that a significant proportion of apoA-I-containing particles were found as pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles in DMPC-treated plasma, the question was raised whether these newly formed pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles interact with the ABCA1 transporter. Competition assays were performed to determine the ability of isolated pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles, as well as native pre- $\beta_1$ -LpA-I and

spherical HDL particles (HDL<sub>3</sub>), to compete for the binding of <sup>125</sup>I-apoA-I to normal fibroblasts in which ABCA1 was induced with 22OH/9CRA. As shown in Fig. 2, isolated pre-β<sub>1</sub>-LpA-I-like particles inhibited the binding of <sup>125</sup>I-apoA-I to ABCA1 more efficiently than HDL<sub>3</sub> (IC<sub>50</sub> = 2.20 ± 0.35 vs. 37.60 ± 4.78 μg/mL, respectively), whereas lipid-free apoA-I was found to have a 1.5-fold greater capacity to bind ABCA1 compared to pre-β<sub>1</sub>-LpA-I-like particles (IC<sub>50</sub> = 1.37 ± 0.48 vs. 2.20 ± 0.35 μg/mL, respectively). At the same time, no significant differences of binding to ABCA1 were observed between isolated native pre-β<sub>1</sub>-LpA-I and pre-β<sub>1</sub>-LpA-I-like particles (IC<sub>50</sub> = 1.78 ± 0.52 vs. 2.20 ± 0.35 μg/mL, respectively). Control experiments were conducted to examine whether the apparent decrease in cell binding of the labeled apoA-I may be due to the <sup>125</sup>I-apoA-I binding to different competitors particles instead of the cells. An experiment was therefore carried out in which either isolated reconstituted HDL particles r(LpA-I) or HDL<sub>3</sub> were incubated with <sup>125</sup>I-apoA-I under similar conditions used for apoA-I binding assay, and then the samples were separated by fast protein liquid chromatography (FPLC). No significant amount of <sup>125</sup>I-apoA-I was found associated with either r(LpA-I) or HDL<sub>3</sub> (data not shown), supporting our results shown in Fig. 2. Furthermore, we have previously documented that the specific binding of <sup>125</sup>I-apoA-I to unstimulated fibroblasts was very low and totally absent in ABCA1 mutant (Q597R) fibroblasts (18).

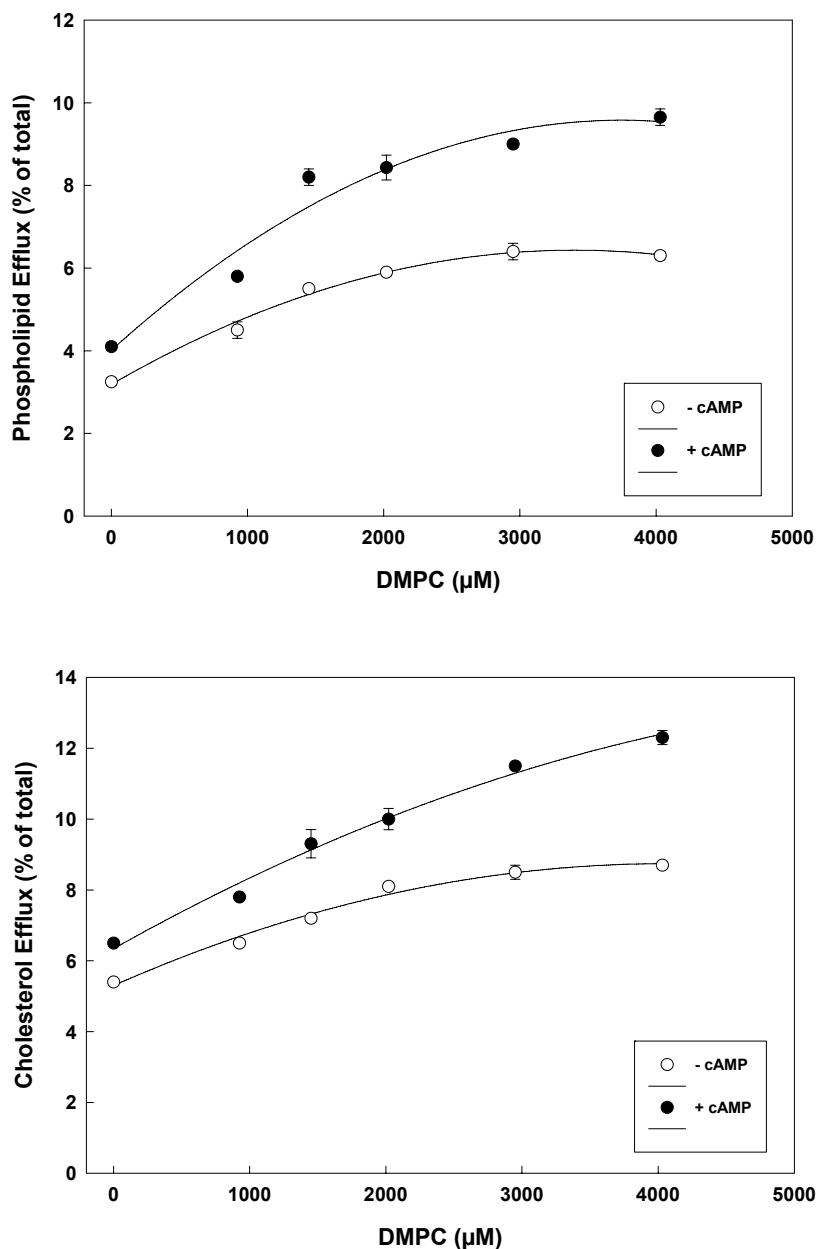


Competitor	IC <sub>50</sub> (μg protein/mL)
ApoA-I	1.37 ± 0.48
Pre-β <sub>1</sub> -LpA-I Like particle	2.20 ± 0.35
HDL <sub>3</sub>	37.60 ± 4.78

**Figure 2. Ability of preβ<sub>1</sub>-LpA-I-like particles and native HDL<sub>3</sub> to interact with ABCA1.** Fibroblasts were plated in 24-well plates and stimulated with 22OH/9CRA for 20 h. Cells were then incubated with 1.5 μg/mL of <sup>125</sup>I-apoA-I for 2 h at 37°C with increasing amounts of either isolated preβ<sub>1</sub>-LpA-I-like particles, native HDL<sub>3</sub> and unlabeled apoA-I (0, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 50 and 80 μg protein/mL). Cells were then washed rapidly three times with ice cold PBS/BSA, and then PBS alone. <sup>125</sup>I-apoA-I associated with cells was determined as described in “Methods”. The values shown represent the mean of duplicate wells. Similar results were obtained in three independent experiments. Values of IC<sub>50</sub> shown were determined using the Graph Pad Prism 4.00 software.

Because native plasma pre- $\beta_1$ -LpA-I have been proposed to be the first acceptor of cellular cholesterol (9), the question was raised whether the newly formed pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles impact the cholesterol efflux properties of plasma and to what extent this effect is mediated by ABCA1 transporter. After treatment of normolipidemic plasma (Control 2, Table 1) with increasing amounts of DMPC as described in “Methods”, plasma was depleted of apoB-containing lipoproteins with PEG 6000 precipitation, and then dialyzed. ApoB-depleted plasma samples (20  $\mu$ g of apoA-I) were incubated for 4h with either [ $^3$ H] choline or [ $^3$ H] cholesterol-labeled J774 macrophages stimulated or not with 0.3 mM cAMP. The current cell culture model has been used by many investigators to examine ABCA1-mediated lipid efflux. Indeed, it was documented that under basal conditions, J774 express low levels of ABCA1 and SR-BI and release membrane cholesterol to extracellular acceptors by passive diffusion, whereas stimulation with cAMP up-regulates ABCA1-mediated cholesterol efflux (22). As shown in Fig.3, by varying the ratio of DMPC to plasma, we found that DMPC can increase the ability of plasma to promote both PL and FC efflux in either stimulated or unstimulated cells in a dose-dependent manner. At the ratio of 2 mg DMPC/ mL plasma (saturating DMPC concentration), PL efflux to DMPC-treated plasma from cAMP-stimulated cells was increased by about ~ 50% compared to unstimulated cells ( $9.60 \pm 0.25$  % vs.  $6.30 \pm 0.10$  %,  $P < 0.001$ , respectively). Similarly, FC efflux to DMPC-treated plasma was significantly increased compared to unstimulated cells ( $12.30 \pm 0.20$  % vs.  $8.70 \pm 0.15$  %,  $P < 0.001$ , respectively). At the same time, both PL and FC efflux from stimulated

cells to either isolated native pre- $\beta_1$ -LpA-I or pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles were increased by (+48 % and +43 %, respectively) compared to unstimulated cells. In separate experiments we show that FC efflux to DMPC-MLV alone (2 mg/mL RPMI) represents less than 1% of FC efflux to DMPC-treated plasma (2 mg/mL plasma). Furthermore, there were no significant differences in FC efflux to DMPC-MLV alone between cAMP-stimulated or unstimulated cells (data not shown).



**Figure 3. Concentration dependence of phospholipid and cholesterol efflux from J774 to DMPC-treated plasma.** One ml of plasma from a normolipidemic subject (control 2) was preincubated for 1h with increasing amounts of DMPC-MLV at 24°C in the presence of 2 mM DTNB to inhibit LCAT. Plasma was depleted of apoB-containing lipoproteins by PEG 6000 and, then dialyzed. ApoB-depleted plasma samples (20  $\mu\text{g}$  of apoA-I) were incubated for 4h with either [ $^3\text{H}$ ] choline or [ $^3\text{H}$ ] cholesterol-labeled J774 stimulated or not with 0.3 mM of 8-Br-cAMP. Phospholipid and cholesterol efflux were determined as percent of total (media + cells) [ $^3\text{H}$ ] measured in the medium, and represents the mean  $\pm$  S.D. from triplicate wells.

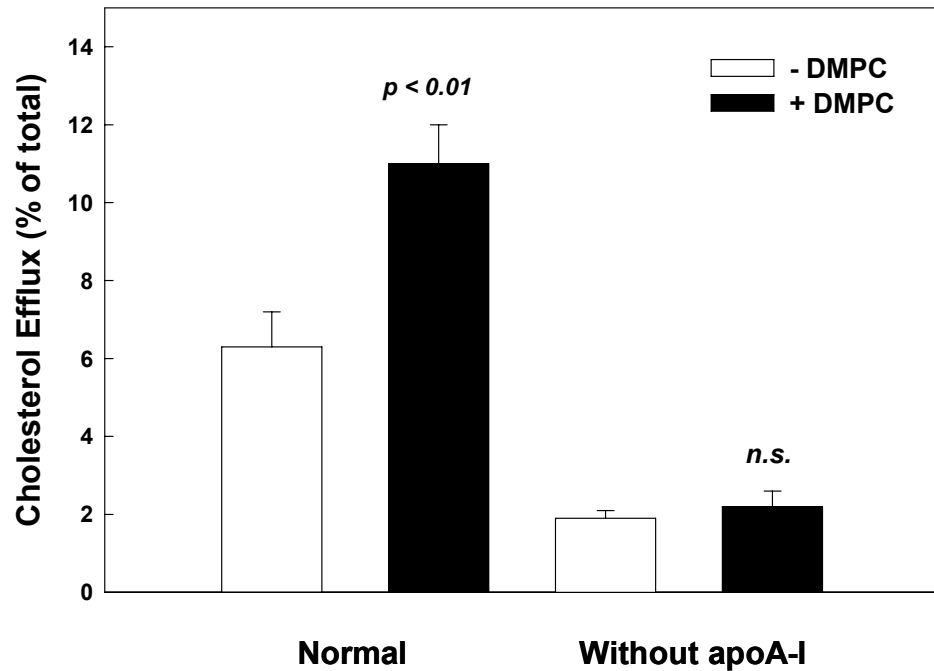


To demonstrate further that pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles present in DMPC-treated plasma were responsible for the ABCA1-mediated efflux, we examine the ability of DMPC-treated plasma to promote PL and FC efflux from cAMP-stimulated J774 cells in the absence or presence of glyburide (300  $\mu$ M), an inhibitor of ABCA1 activity. PL efflux from stimulated cells to DMPC-treated plasma was reduced by  $\sim 60\%$  ( $9.3 \pm 0.60\%$  vs.  $4.10 \pm 0.45\%$ ,  $P < 0.001$ ), whereas FC efflux was reduced by  $\sim 45\%$  ( $12.60 \pm 0.60\%$  vs.  $7.10 \pm 0.30\%$ ,  $P < 0.001$ ). At the same time, PL and FC efflux to untreated plasma were reduced only by (16% and 12%, respectively) in the presence of glyburide. Furthermore, treatment of J774 with glyburide (300  $\mu$ M) for 1h to 12 h did not cause any significant morphological changes or toxicity as measured by trypan blue exclusion

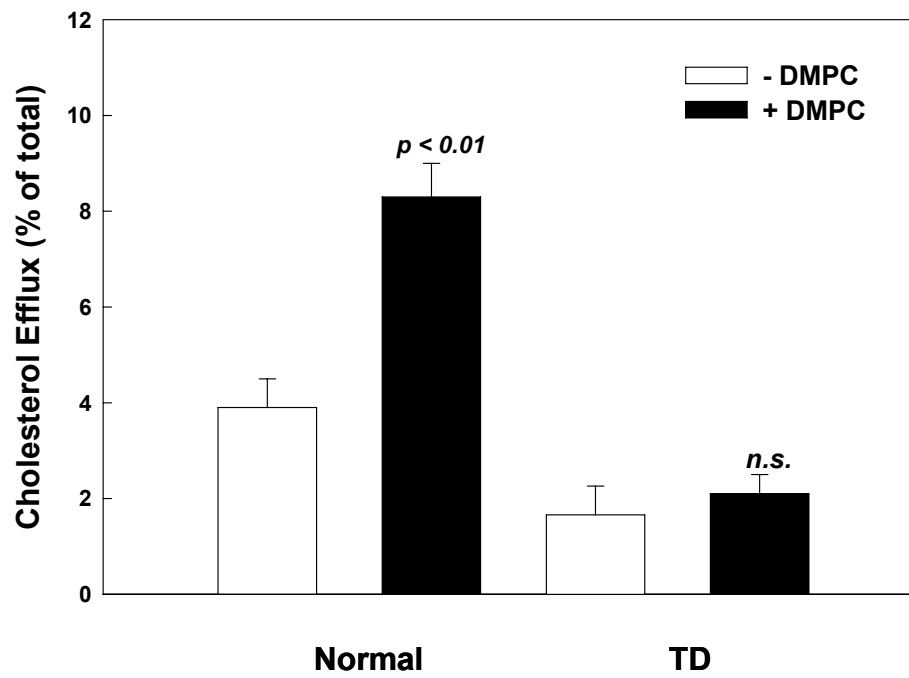
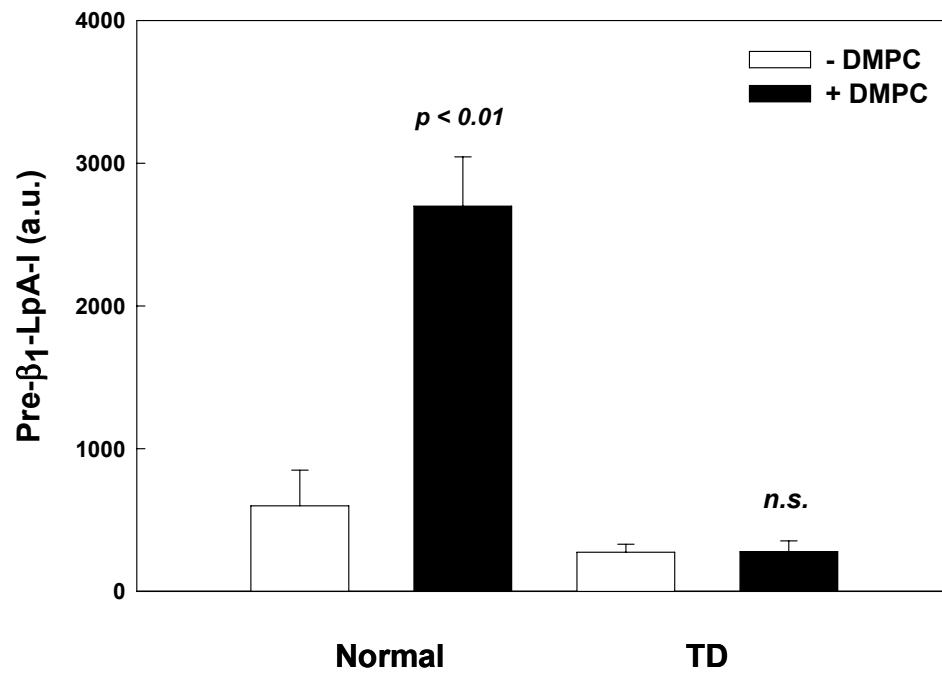
In order to verify the specificity of apoA-I-containing particles in the modification of cholesterol efflux properties of DMPC-treated plasma, plasma from a normolipidemic subject (Control 3, Table 1) was depleted from apoA-I containing lipoproteins by immunoaffinity as described in "Methods", and then treated with DMPC before cholesterol efflux experiments. As shown in Fig.4, removal of apoA-I-containing lipoproteins from plasma drastically reduced FC efflux mediated by DMPC-treated plasma.

To further confirm the role of apoA-I-containing particles in the increased ability of DMPC-treated plasma to promote FC efflux, plasma from either 3 patients with Tangier disease (TD) or controls (Table 1) were treated or not with 2 mg DMPC/mL plasma, and then samples were separated by 2D-PAGE. Pre- $\beta_1$ -

LpA-I particles were quantified as described above. As shown in Fig.5 (upper panel), despite the presence of a significant amount of pre- $\beta_1$ -LpA-I in untreated TD plasma (less than 50% of controls), DMPC treatment did not affect pre- $\beta_1$ -LpA-I levels as compared to controls. Similarly, DMPC-treatment of TD plasma did not promote additional cholesterol efflux from cAMP-stimulated cells (Fig.5, lower panel). Interestingly, despite the fact that DMPC treatment of normal plasma increased pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles by about  $\sim$  3-fold, FC efflux from cAMP-stimulated cells promoted by DMPC-treated plasma was only increased by 80 to 100% (Fig.1, Fig.4 and Fig.5). This indicates that lower concentrations of pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles are required to saturate cholesterol efflux from cAMP-stimulated cells.



**Figure 4. Effect of removal of plasma apoA-I-containing lipoproteins on DMPC-mediated [<sup>3</sup>H] cholesterol efflux from cAMP-stimulated J774.** Plasma from a normolipidemic subject (control 2) was depleted or not from apoA-I-containing lipoproteins by immunopurified anti-apoA-I antibody (12171-21A, Genzyme Corp)-coupled sepharose column as described in “Methods”. Either normal plasma or apoA-I-depleted plasma samples were preincubated or not with 2 mg of DMPC-MLV at 24°C for 1h in the presence of 2 mM DTNB to inhibit LCAT. Different plasma samples were depleted of apoB-containing lipoproteins by PEG 6000 and, then dialyzed. ApoB-depleted plasma samples (100 μL) were incubated for 4h with [<sup>3</sup>H] cholesterol-labeled J774 stimulated with 0.3 mM of 8-Br-cAMP. Cholesterol efflux was determined as percent of total (media + cells) [<sup>3</sup>H] cholesterol measured in the medium, and represents the mean ± S.D. from triplicate wells.



**Figure 5. The effect of preincubation of plasma from TD patients with DMPC-MLV on pre- $\beta_1$ -LpA-I level and [ $^3$ H] cholesterol efflux from cAMP-stimulated J774. **A**, plasma from each of 3 normolipidemic and 3 TD subjects was preincubated or not for 1h with (2 mg DMPC-MLV/mL plasma) at 24°C in the presence of 2 mM DTNB to inhibit LCAT, and then plasma samples were separated by 2D-PAGGE. After electrophoresis all samples were electrotransferred together on the same nitrocellulose membrane for appropriate comparison and were revealed for apoA-I. ApoA-I associated with pre- $\beta_1$ -LpA-I was quantitated by densitometric scanning. Results of triplicate measures (means  $\pm$  SD, n=3) are shown. **B**, apoB-depleted plasma samples (150  $\mu$ l) from TD and controls subjects were incubated for 4h with [ $^3$ H] cholesterol-labeled J774 stimulated with 0.3 mM of 8-Br- cAMP. Cholesterol efflux was determined as percent of total (media + cells) [ $^3$ H] cholesterol measured in the medium. Results (means $\pm$  S.D, n=3) are shown.**

## DISCUSSION

A growing body of evidence indicates that lipid-poor apoA-I not only play a major role in the RCT process, but have also emerged as potential targets for therapies designed to inhibit the development of atherosclerotic vascular disease (23). However, whether lipid-poor apoA-I such as plasma pre- $\beta_1$ -LpA-I has biological properties that make it even more effective than mature  $\alpha$ -HDL in preventing or regressing atherosclerosis is currently a topic of many investigations. In the present report we take advantage of a previous study by Swaney and colleagues (15) demonstrating that enrichment of human serum with phospholipid led to the formation of new HDL complexes, especially pre- $\beta$ -HDL. This allows us to further investigate the affinity of these newly formed particles for ABCA1 and their ability to promote cholesterol efflux.

Although the structural characteristics of DMPC-modified HDL has not yet been determined, the present study shows that at the ratio of 2 mg DMPC/ mL plasma, a significant proportion of the newly formed HDL complexes have the size and charge similar to native plasma pre- $\beta_1$ -LpA-I particles (designated pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles) (Fig.1). Indeed, previous studies established that the lipid composition of pre- $\beta_1$ -LpA-I species as well as the conformation of apoA-I within these particles differ from those of spherical HDL (24;25). Furthermore, pre- $\beta_1$ -LpA-I is proposed to be an initial acceptor of cell-derived cholesterol, consistent with the idea that lipid-poor apoA-I interacts preferentially with ABCA1 transporter (18;26). This concept is supported by our results showing that both isolated native pre- $\beta_1$ -LpA-I and pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles have a ~17-fold

greater capacity to bind ABCA1 compared to HDL<sub>3</sub>, in contrast, lipid-free apoA-I had only a 1.5-fold higher efficiency to interact with ABCA1 relative to pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles (Fig. 2). This is consistent with our previous results showing that the association of either lipid-free apoA-I or apoE3 with lipid decreases their affinity for ABCA1 (18;20).

Previous studies have documented that short-term efflux to plasma (1 to 5 minutes) show that approximately 50% of the cholesterol released from cells is associated with pre- $\beta$ -HDL, even though it contains only 5 to 10% of total plasma apoA-I (14). We initially hypothesized that any specific increase in pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles following treatment of plasma with DMPC would be associated with a significant increase in the ability of DMPC-treated plasma to promote cholesterol efflux through the ABCA1 transporter pathway. Our hypothesis is supported by the finding that: 1) DMPC-treated plasma stimulated greater PL and FC efflux from cAMP-stimulated cells compared to unstimulated cells (Fig.3); 2) PL and FC efflux from stimulated cells to isolated native pre- $\beta_1$ -LpA-I and pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles were increased by about (+48 % and +43 %, respectively) compared to unstimulated cells; and 4) glyburide inhibit strongly both PL and FC efflux to DMPC-treated plasma compared to untreated plasma in cAMP-stimulated cells. Based on these results we have assumed that pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles contribute significantly to the release of cholesterol through the ABCA1 pathway in our cAMP-stimulated macrophages cell culture model. However, It should be emphasized that in this system other cholesterol efflux pathways such as the passive diffusion or SR-BI may operate especially when

plasma was used as an acceptor. This is in line with recent study by Favari and colleagues (22) showing that the magnitude of the ABCA1-dependent cholesterol efflux could be modified by increasing the content of pre- $\beta$ -HDL (by PLTP treatment) or by reducing it (by chymase treatment) of HDL.

Although evidence has been presented demonstrating that pre- $\beta_1$ -LpA-I-like particles interact physically with ABCA1 and promote cholesterol efflux through the translocase activity of the same transporter, it remains unclear whether other apolipoproteins known to interact with ABCA1 such as apoE may be involved in the modification of the cholesterol efflux properties of DMPC-treated plasma. Indeed, it has been proposed that  $\gamma$ -LpE particles play a role in RCT, by acting together with pre- $\beta_1$ -LpA-I as initial acceptors of cell-derived cholesterol (27). Furthermore, we have previously documented that ABCA1 transporter mediate the lipidation of lipid-free apoE3 in a cell culture model (20). Interestingly, we observed that DMPC enrichment of plasma increased the level of plasma  $\gamma$ -LpE in a dose dependent manner (data not shown). It is possible that  $\gamma$ -LpE contribute also to the ability of DMPC-treated plasma to promote cholesterol efflux. However, despite an increase in the concentration of  $\gamma$ -LpE following DMPC enrichment of TD plasma, no significant cholesterol release from cAMP stimulated cells was observed (Fig.5). It is likely that HDL-LpE present in plasma of TD subjects as we have previously documented (16) was transformed to  $\gamma$ -LpE following DMPC enrichment, whereas the absence of DMPC effect on pre- $\beta_1$ -LpA-I is attributable to the total absence of  $\alpha$ -migrating apoA-I- containing particles in TD plasma (16;28). This is consistent with our result showing that



removal of apoA-I-containing lipoproteins from normal plasma abolished FC efflux mediated by DMPC-treated plasma (Fig.4). These conclusions support the specificity of apoA-I-containing particles in the modification of the cholesterol efflux properties of DMPC-treated plasma.

Earlier studies by Tall and colleagues (21) have documented that incubation of isolated HDL with mixture of lecithin unilamellar or multilamellar liposomes transform both HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> into lipoproteins of decreased density and increased size. Furthermore, the formation of discoidal PL/apoprotein complexes was identified by electron microscopy. It is likely that discoidal lipoproteins were formed as a result of interactions of liposomes with apoproteins released from HDL. This is consistent with our results showing that both pre- $\beta_1$ -LpA-I and  $\gamma$ -LpE particles were increased by DMPC-enrichment of plasma. Although the origin of plasma pre- $\beta_1$ -LpA-I has remained enigmatic and its role in preventing atherosclerosis is considered uncertain at this time (24), it is well accepted that HDL heterogeneity involves not only intracellular factors that control the synthesis and cell uptake of HDL but also factors that promote the assembly and remodeling of HDL in the extracellular space. Indeed, several enzymes, such as, lecithin: cholesterol acyltransferase, lipoprotein lipase, hepatic lipase, endothelial lipase, cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein have been implicated in regulating apoA-I cycles between lipid-poor and lipid associated forms as a part of a highly dynamic metabolism of HDL and consequently contributing to the formation of HDL subspecies including pre- $\beta_1$ -LpA-I (29).

The results of the present report appear reasonably consistent with the concept that pre- $\beta_1$ -LpA-I particles or lipid-poor apoA-I are the preferred substrate for ABCA1 transporter *in vitro*. Importantly, the structural alterations of plasma HDL by DMPC resulted in redistribution of plasma apoA-I in favor of lipid-poor apoA-I pool, allowing for more efficient ABCA1-mediated cholesterol release. Although this observation may have potential therapeutic implications, it remains an unanswered question as to whether lipid-poor apoA-I such as pre- $\beta_1$ -LpA-I has specific properties that result in greater antiatherogenic potential than plasma  $\alpha$ -HDL.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Dr. Arnold von Eckardstein for kindly providing TD plasma.

This work was supported by grants MOP 15042 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. J.

Genest holds the McGill University-Novartis Chair in Cardiology.

## REFERENCES

1. Brewer,H.B., Jr. and Santamarina-Fojo,S. 2003. New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. *Am.J.Cardiol.* 91:3E-11E.
2. Tall,A.R. 1993. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J.Lipid Res.* 34:1255-1274.
3. Joyce,C.W., Amar,M.J., Lambert,G., Vaisman,B.L., Paigen,B., Najib-Fruchart,J., Hoyt,R.F., Jr., Neufeld,E.D., Remaley,A.T., Fredrickson,D.S. et al. 2002. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:407-412.
4. Marcil,M., Bissonnette,R., Vincent,J., Krimbou,L., and Genest,J. 2003. Cellular phospholipid and cholesterol efflux in high-density lipoprotein deficiency. *Circulation* 107:1366-1371.
5. Basso,F., Freeman,L., Knapper,C.L., Remaley,A., Stonik,J., Neufeld,E.B., Tansey,T., Amar,M.J., Fruchart-Najib,J., Duverger,N. et al. 2003. Role of

the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J.Lipid Res.* 44:296-302.

6. Marcil,M., Brooks-Wilson,A., Clee,S.M., Roomp,K., Zhang,L.H., Yu,L., Collins,J.A., van Dam,M., Molhuizen,H.O., Loubster,O. et al. 1999. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 354:1341-1346.
7. Singaraja,R.R., Brunham,L.R., Visscher,H., Kastelein,J.J., and Hayden,M.R. 2003. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23:1322-1332.
8. Batal,R., Tremblay,M., Krimbou,L., Mamer,O., Davignon,J., Genest,J., Jr., and Cohn,J.S. 1998. Familial HDL deficiency characterized by hypercatabolism of mature apoA-I but not proapoA-I. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18:655-664.
9. Castro,G.R. and Fielding,C.J. 1988. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 27:25-29.

10. Kawano,M., Miida,T., Fielding,C.J., and Fielding,P.E. 1993. Quantitation of pre beta-HDL-dependent and nonspecific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochemistry* 32:5025-5028.
11. Lefevre,M., Sloop,C.H., and Roheim,P.S. 1988. Characterization of dog prenodal peripheral lymph lipoproteins. Evidence for the peripheral formation of lipoprotein-unassociated apoA-I with slow pre-beta electrophoretic mobility. *J.Lipid Res.* 29:1139-1148.
12. Hara,H. and Yokoyama,S. 1991. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J.Biol.Chem* 266:3080-3086.
13. Francone,O.L., Gurakar,A., and Fielding,C. 1989. Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. *J.Biol.Chem* 264:7066-7072.
14. Huang,Y., von Eckardstein,A., and Assmann,G. 1993. Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler.Thromb.* 13:445-458.

15. Jian,B., Llera-Moya,M., Royer,L., Rothblat,G., Francone,O., and Swaney,J.B. 1997. Modification of the cholesterol efflux properties of human serum by enrichment with phospholipid. *J.Lipid Res.* 38:734-744.
16. Krimbou,L., Marcil,M., Chiba,H., and Genest,J., Jr. 2003. Structural and functional properties of human plasma high density-sized lipoprotein containing only apoE particles. *J.Lipid Res.* 44:884-892.
17. Krimbou,L., Marcil,M., Davignon,J., and Genest,J., Jr. 2001. Interaction of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT).alpha 2-macroglobulin complex with low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for an alpha 2-macroglobulin/LRP receptor-mediated system participating in LCAT clearance. *J.Biol.Chem* 276:33241-33248.
18. Denis,M., Haidar,B., Marcil,M., Bouvier,M., Krimbou,L., and Genest,J., Jr. 2004. Molecular and cellular physiology of apolipoprotein A-I lipidation by the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). *J.Biol.Chem* 279:7384-7394.
19. Krimbou,L., Tremblay,M., Jacques,H., Davignon,J., and Cohn,J.S. 1998. In vitro factors affecting the concentration of gamma-LpE (gamma-LpE) in human plasma. *J.Lipid Res.* 39:861-872.

20. Krimbou,L., Denis,M., Haidar,B., Carrier,M., Marcil,M., and Genest,J., Jr. 2004. Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *J.Lipid Res.* 45:839-848.
21. Tall,A.R., Hogan,V., Askinazi,L., and Small,D.M. 1978. Interaction of plasma high density lipoproteins with dimyristoyllecithin multilamellar liposomes. *Biochemistry* 17:322-326.
22. Favari,E., Lee,M., Calabresi,L., Franceschini,G., Zimetti,F., Bernini,F., and Kovanen,P.T. 2004. Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein. *J.Biol.Chem* 279:9930-9936.
23. Nissen,S.E., Tsunoda,T., Tuzcu,E.M., Schoenhagen,P., Cooper,C.J., Yasin,M., Eaton,G.M., Lauer,M.A., Sheldon,W.S., Grines,C.L. et al. 2003. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290:2292-2300.
24. Fielding,C.J. and Fielding,P.E. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J.Lipid Res.* 36:211-228.



25. Kunitake,S.T., Chen,G.C., Kung,S.F., Schilling,J.W., Hardman,D.A., and Kane,J.P. 1990. Pre-beta high density lipoprotein. Unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis. *Arteriosclerosis* 10:25-30.
26. Denis,M., Haidar,B., Marcil,M., Bouvier,M., Krimbou,L., and Genest,J. 2004. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J.Biol.Chem* 279:41529-41536.
27. Huang,Y., von Eckardstein,A., Wu,S., and Assmann,G. 1995. Effects of the apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma. *J.Clin.Invest* 96:2693-2701.
28. von Eckardstein,A., Huang,Y., Wu,S., Funke,H., Nosedá,G., and Assmann,G. 1995. Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15:691-703.
29. Rye,K.A. and Barter,P.J. 2004. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:421-428.

30. Asztalos,B., Roheim,P., Milani,R., Lefevre,M., McNamara,J., Horvath,K. and Schaefer,E. 2000. Distribution of apoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease..  
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 20:2670-2676.
  
31. Sokoloff,L. and Rothblat,G.H. 1974. Sterol to phospholipid molar ratios of L cells with quatitative variations of cellular sterol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146 : 1166-1172

## **Chapitre VI**

### **Discussion**

Il convient maintenant de faire un retour sur les aspects développés dans les trois chapitres précédents. La contribution à l'avancement des connaissances, une autocritique sur le travail et ses limitations ainsi que des propositions de directions futures seront respectivement discutés pour chaque chapitre. Nous allons discuter, successivement, comment nos résultats peuvent répondre (peut être partiellement) aux questions posées dans chacun des chapitres. Cette discussion permettra de mettre en lumière l'apport de ce travail à l'établissement de nouvelles avenues de recherche.

#### **VI.1 Les sites de liaison cellulaires de l'apoA-1**

La compréhension des mécanismes de la biogénèse des HDL naissantes représente une étape clé dans le développement des stratégies thérapeutiques ciblant les maladies cardiovasculaires. La relation entre l'ABCA1 et l'apoA-I constitue le pont obligatoire à traverser pour élucider les mécanismes gouvernant la biogénèse des HDL naissantes.

#### **Questions et réponses**

Dans le troisième chapitre, nous avons cherché à répondre aux trois questions majeures suivantes :

- 1- Quelles sont les sites de liaisons cellulaires de l'apoA-I et quelle est leur dépendance de l'ABCA1?
- 2- Quelles sont les composantes de chaque site et quelles sont leurs caractéristiques structurales?
- 3- Quel est le rôle joué par l'apoA-I et quel est l'effet de sa structure sur sa liaison et sa distribution cellulaires?

En premier, pour mieux comprendre l'interaction moléculaire entre l'apoA-I et l'ABCA1 qui mène à la formation des particules HDL naissantes, nous avons cherché les sites de liaison possibles de l'apoA-I au niveau cellulaire. D'une manière intéressante, la majorité de l'apoA-I est trouvée non-associée à l'ABCA1. Cependant, cette observation nécessite l'existence d'un ABCA1 fonctionnel. Ces résultats mettent en évidence **l'existence d'un nouvel site cellulaire de liaison de l'apoA-I que nous avons nommé le « High Capacity Binding Site » (HCBS)**. Cette observation importante déclenchait plusieurs questions. Quelle est la structure de ce nouveau site de liaison? Est-il une protéine ou un phospholipide? Où se situe-t-il? A la membrane plasmique ou il est intracellulaire? Quel rôle joue la structure de l'apoA-I?

Nos résultats favorisent **la phosphatidylcholine comme le composant phospholipidique principal du HCBS**. Puisque la majorité de l'apoA-I s'associe à la membrane plasmique, nous avons présumé **que le HCBS se situe à la MP**.

Cependant, la rupture des domaines membranaire *rafts* riches en sphingomyéline n'a pas diminué significativement l'association de l'apoA-I au HCBS. On suggère que les deux sites de liaisons soient dans une proximité proche, mais une analyse plus détaillée sera nécessaire en utilisant des techniques de microscopie confocale. Regardant les conditions structurales nécessaires de l'apoA-I, il semble que **la région C-terminale de l'apoA-I soit nécessaire pour la formation d'un complexe productif avec l'ABCA1 qui mène à la création du HCBS.**

Alors, nous avons fournis des évidences favorisant les 3 observations suivantes : 1) la majorité de l'apoA-I ne s'associe pas à l'ABCA1 (HCBS). 2) Le HCBS est un site phospholipidique et se situe à la membrane plasmique. 3) l'association de l'apoA-I nécessite un ABCA1 fonctionnel et le domaine c-terminal de l'apoA-I.

#### Critiques et directions futures

Le fait que la liaison transitoire et rapide de l'apoA-I à l'ABCA1 permette des interactions subséquentes avec le HCBS suggère une fonction de normalisation et stabilisation de l'ABCA1 par l'apoA-I ce qui pourrait lui fournir un environnement stable à proximité étroite de la membrane plasmique. L'existence du HCBS et sa participation à la formation des particules HDL naissantes a été confirmé par Phillips et ses collègues (39, Chap.3). Ceci est consistant avec le concept de recyclage de l'ABCA1 pour assurer la lipidation de

plusieurs molécules d'apoA-I par le même ABCA1. L'interaction initiale et primaire de l'apoA-I avec l'ABCA1 est cruciale. Il semble que l'ABCA1 peut créer des changements importants dans la structure de la membrane plasmique [183]. Ces observations favorisent le modèle en deux étapes de l'efflux du cholestérol et ouvrent la porte à des investigations regardant la lipídation intracellulaire de l'ABCA1.

Il est fort probable que **l'activité de l'ABCA1 crée un nouvel accepteur de capacité élevée nécessaire pour la formation des particules naissantes contenant l'apoA-I**. Cependant, il reste inconnu si l'ABCA1 modifie le(s) domaine(s) adjacent(s) de la bicouche de phospholipides ce qui permet l'association de l'apoA-I avec le HCBS et l'extraction des phospholipides et du cholestérol [184; 185]. Alternativement, c'est possible que l'ABCA1 puisse changer la structure de l'apoA-I pour augmenter sa capacité de se lier à une bicouche phospholipidique dans le HCBS. Des futures élucidations des interactions moléculaires entre l'apoA-I/ABCA1 et le HCBS devraient clarifier le mécanisme par lequel le transporteur ABCA1 est impliqué dans la biogénèse des HDL.

## **VI.2 La voie de retro-endocytose de l'apoA-1 par l'ABCA1**

Plusieurs études soutiennent le concept que l'internalisation et le transport de l'ABCA1 est fonctionnellement important dans le processus de la

lipidation intracellulaire de l'apoA-I. Nous avons démontré dans le troisième chapitre qu'une partie de l'apoA-I est trouvée associée aux CICs. La définition des caractéristiques structurales de la compartimentalisation, du transport, et de la ré-sécrétion cellulaire de l'apoA-I représente une étape principale et la continuité nécessaire du chapitre 3 pour mieux comprendre la genèse des HDL naissantes.

### Questions et réponses

Les questions posées dans le quatrième chapitre sont les suivantes :

- 1- Est-ce que les deux voies de lipidation de l'apoA-I existent et ont-elles les mêmes caractéristiques cinétiques?
- 2- Est-ce que la structure de l'apoA-I affecte les deux voies?
- 3- Quelle est le rôle de l'ABCA1 dans la voie de retro-endocytose de l'apoA-I?

Nos données indiquent qu'une partie importante de l'apoA-I a été trouvée associée aux compartiments intracellulaires (CICs), toujours d'une façon ABCA1 dépendante. Ceci suggère que l'internalisation de l'ABCA1 est fonctionnellement importante en assurant la lipidation intracellulaire de l'apoA-I. L'existence de deux voies de lipidation distinctes de l'apoA-I et sa ré-sécrétion des CICs et/ou sa dissociation de la MP en tant que HDL naissant représentent des observations très importantes pour la compréhension du processus de la biogénèse des HDL. Nous pouvons conclure, que les CICs représentent un site

métaboliquement actif pour la lipidation de l'apoA-I indépendant de celui de la MP.

La structure de l'apoA-I semble critique et importante : nos résultats démontrent que la délétion de la région C-terminale et la lipidation de l'apoA-I ont altéré son association avec la MP et les CICs. Aussi, la région de C-terminale de l'apoA-I est requise pour sa compartimentalisation cellulaire.

En fin, notre hypothèse était que l'apoA-I induit l'internalisation rapide et continue de l'ABCA1 de la membrane plasmique. Nous avons montré que l'apoA-I induit l'internalisation de l'ABCA-1. Ceci favorise le processus d'un transport vésiculaire bidirectionnel de l'ABCA1 soit essentiel, non seulement pour la lipidation de l'apoA-I pendant son trafic intracellulaire mais également, pour sa lipidation dans le site de capacité élevée (HCBS) situé à la MP.

### Critiques et directions futures

Nous pouvons tirer du quatrième chapitre les conclusions suivantes :

- 1) l'apoA-I assure le recyclage continu de l'endocytose de l'ABCA1.
- 2) la resécrétion de l'apoA-I à partir des CICs et de la MP montre deux cinétiques de dissociation différentes.
- 3) l'altération du transport apoA-I/ABCA1 a affecté le processus de la lipidation.

L'importance de l'apoA-I dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol est bien évidente. Cependant, c'est la première étude qui montre des données

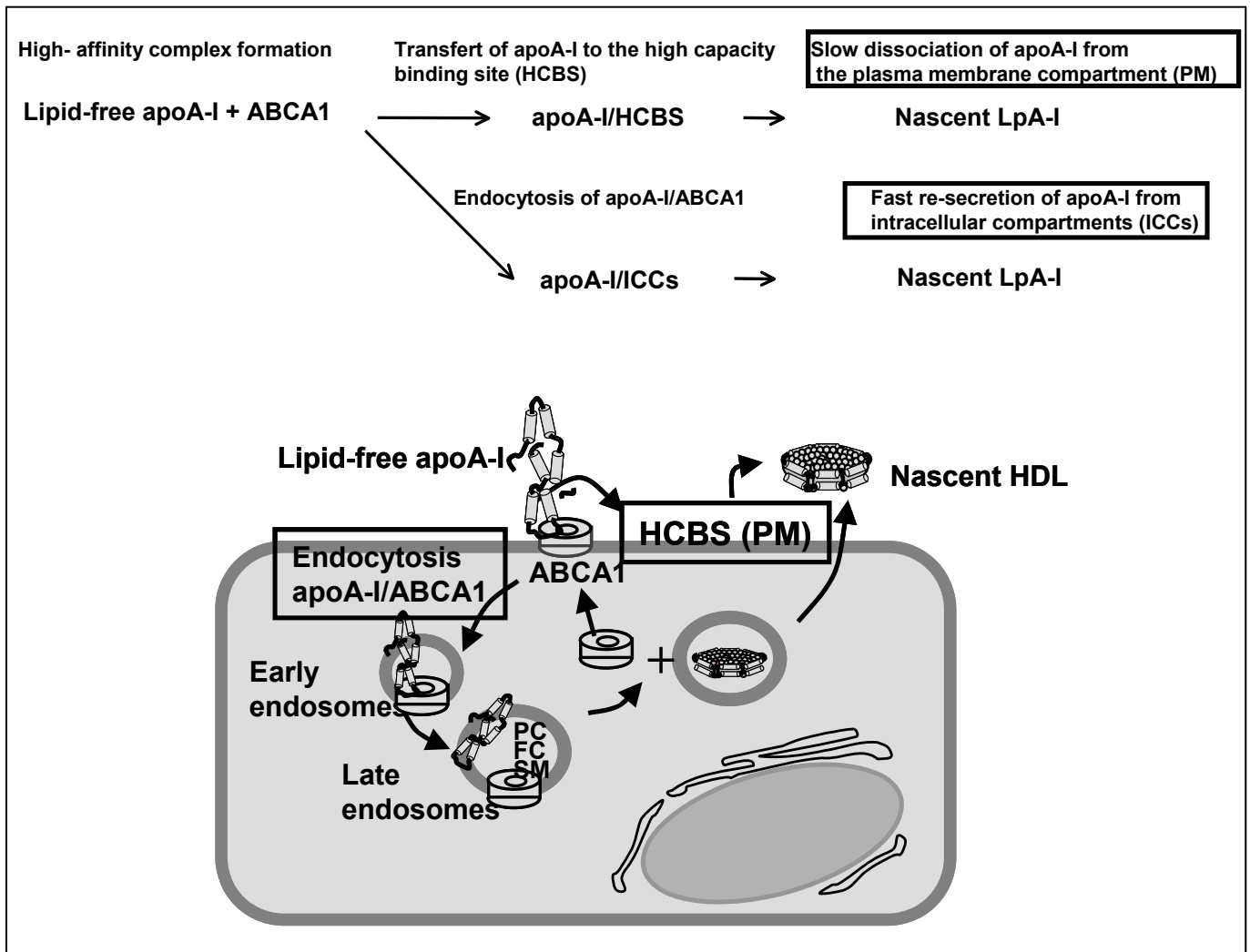


cinétiques suggérant que la voie d'endocytose joue un rôle central dans la formation des HDL naissantes. Cette étude quantitative a fournis l'évidence qu'une corrélation spécifique entre l'apoA-I et le trafic d'endocytose de l'ABCA1 joue un rôle physiologique principal dans l'étape la plus importante et compliquée du processus de l'homéostasie cellulaire du cholestérol. Nos observations peuvent avoir des implications importantes dans la prévention de la maladie cardiovasculaire artérioscléreuse. Cependant, elles soutiennent un modèle de lipidation à deux compartiments pour la genèse des HDL naissantes.

#### Chapitres 3 et 4/littératures

Bien que la majorité du cholestérol réside à la MP, la deuxième majeure partie de cholestérol cellulaire est dans les endosomes [174]. L'apoA-I conjuguée à des lipides naissante ( ?) a été isolée à partir des endosomes dans les hépatocytes [175], ce qui suggère que la lipidation de l'apoA-I pour former des HDL naissantes peut se produire au niveau intracellulaire. Les Hépatocytes et les cellules intestinales sont capables de synthétiser et de sécréter l'apoA-I. Dans la lignée cellulaire HepG2, ~ 20% de l'apoA-I nouvellement synthétisée est lipidée au niveau intracellulaire [176]. Les hépatocytes primaires murins n'exprimant pas l'ABCA1 montrent une réduction dramatique dans la lipidation de l'apoA-I endogène, ce qui suggère qu'il s'agit d'un processus ABCA1-dépendant [177]. Cependant, la plupart des cellules sont incapables de synthétiser l'apoA-I; La lipidation intracellulaire ne peut pas se produire si l'apolipoprotéine n'est pas endocytosée. L'apoA-I subit l'endocytose [178] dans

un processus ABCA1-dépendant [179]. Dans la lignée cellulaire de macrophages RAW 264, l'apoA-I est observée dans les puits recouverts (Clathrine coated) Lors de l'endocytose, l'apoA-I apparaît dans les endosomes où le transfert des lipides est supposé se produire, suivi par le tri et le recyclage à la MP où elle est libérée vers le domaine extracellulaire comme une particule HDL naissante. L'inhibition de l'endocytose bloque partiellement l'activité d'efflux de cholestérol [178]. En séquestrant l'ABCA1 à la MP, on augmente la liaison de l'apoA-I à la surface cellulaire, mais on diminue l'efflux de cholestérol, probablement dû à une réduction dans l'internalisation de l'apoA-I [179]. Dans ce modèle de retroendocytose pour la sécrétion des lipides, l'ABCA1 génère un microenvironnement biophysique favorable pour l'apoA-I à se lier à la MP en fournissant une disposition particulière des phospholipides sur la couche externe de la membrane [181]. Une fois que l'apoA-I est liée à ces sites distincts de la surface cellulaire, elle subit une endocytose vers les réserves lipidiques intracellulaires où l'ABCA1 assure l'efflux de cholestérol et des phospholipides. La particule de HDL naissante qui en résulte est recyclée à la MP pour ré-sécrétion [180].



**Un model proposé, à deux compartiments de lipidation, pour la genèse des HDL naissantes par la voie de l'ABCA1 :** Le développement d'un modèle cinétique représente une approche efficace pour disséquer la voie de trafic intracellulaire du complexe apoA-I/ABCA1 qui joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol et la genèse des particules HDL naissantes.

### VI.3 Le pré- $\beta$ -HDL

Plusieurs lignes d'évidences indiquent que l'apoA-I pauvre en lipide représente une cible potentielle pour des thérapies pour empêcher le développement de la maladie d'athérosclérose vasculaire. Cependant, le fait que l'apoA-I pauvre en lipide, tel que le pré $\beta_1$ -LpA-I plasmatique, a les propriétés biologiques qui le rendent même plus efficace que l' $\alpha$ -HDL mature dans la prévention ou la régression de l'athérosclérose représente le sujet de plusieurs d'investigations afin de développer des nouvelles approches thérapeutiques.

#### Questions et réponses

Il est bien établi que la composition lipidique des pré $\beta_1$ -LpA-I aussi bien que la conformation de l'apoA-I dans ces particules diffèrent de ceux des HDL sphériques. Cependant, le pré $\beta_1$ -LpA-I a été proposé comme le premier accepteur du cholestérol dérivé des cellules.

Dans le cinquième chapitre, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- 1- Est-ce que les particules pré $\beta_1$ -LpA-I ont l'affinité de lier l'ABCA1?
- 2- Est-ce que les pré $\beta_1$ -LpA-I efflux les phospholipides et le cholestérol par la voie de l'ABCA1?

Pour répondre à la première question, nous avons montré que les pré $\beta_1$ -LpA-I natives et les pré $\beta_1$ -LpA-I-Like ont une plus grande capacité (semblable à l'apoA-I libre) de lier l'ABCA1 que le HDL<sub>3</sub>. Ceci est conforme au concept que l'ABCA1 favorise l'efflux du cholestérol en utilisant l'apoA-I libre comme substrat. Concernant l'implication des particules pré $\beta_1$ -LpA-I-Like dans les efflux du cholestérol et de phospholipides par la voie de l'ABCA1, nos observations indiquent que l'augmentation spécifique des particules pré $\beta_1$ -LpA-I-Like soit associée à une augmentation significative de la capacité du plasma de favoriser l'efflux de cholestérol et de phospholipides par la voie de l'ABCA1. Ceci indique que **les particules pré $\beta_1$ -LpA-I-Like contribuent d'une manière significative au relâchement du cholestérol par la voie de l'ABCA1**. Il n'est pas encore établi que d'autres apolipoprotéines (que l'apoA-I) connues pour interagir avec l'ABCA1, peuvent être impliquées dans la modification des propriétés de l'efflux de cholestérol du plasma traité avec le DMPC. Une telle investigation sera bien utile.

#### Critiques et directions futures

Selon nos rapports précédents, l'ABCA1 ne semble pas être impliquée dans la formation des pré $\beta_1$ -LpA-I plasmatique parce qu'elles sont présentes dans le plasma des TD. Cependant plusieurs lipases sont impliqués dans la régulation des cycles d'apoA-I entre les formes appauvries en lipides et celles associées aux lipides. Il serait fort intéressant de vérifier le rôle de ces lipases

dans l'hétérogénéité des HDL. Ceci peut impliquer des facteurs thérapeutiques qui favorisent l'assemblage et le remodelage des HDL.

Récemment, Favari et ses collègues [182], ont démontré que le pré $\beta$ -HDL favorise l'efflux du cholestérol par la voie de l'ABCA1 et, d'une manière intéressante aussi par la voie de l'ABCG1 et non celle de SRB1.

Il semble bien établi que les particules pré $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I ou l'apoA-I pauvre en lipide sont le substrat préféré pour le transporteur ABCA1 *in vitro*. Cette observation peut avoir des implications thérapeutiques potentielles. Cependant, il reste une question sans réponse est de savoir si l'apoA-I pauvre en lipide tel que les pré $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I a des propriétés spécifiques qui ont comme conséquence un plus grand potentiel anti-athérogénique que les  $\alpha$ -HDL plasmatiques.

#### **VI.4 Conclusions générales**

Les deux premiers articles présentés et discutés dans cet ouvrage représentent des avancements assez importants dans la compréhension du fonctionnement de l'ABCA1 et son rôle majeur dans la biogénèse des HDL.

Nous avons fourni des évidences de :

- 1- L'existence d'un nouveau site de liaison cellulaire de l'apoA-I.
- 2- L'existence de deux voies de lipidation de l'apoA-I, extra et intracellulaire indépendantes.
- 3- La nécessité d'un ABCA1 fonctionnel pour les deux voies.

- 4- L'importance de la structure de l'apoA-I pour sa liaison cellulaire et compartimentalisation.
- 5- L'importance de la voie de la retro-endocytose de l'ABCA1 dans la biogénèse des HDL.

Le troisième article met en lumière l'importance des pré $\beta$ -HDL dans le processus du transport du cholestérol à rebours. Nous avons montré les aspects suivants :

- 1- La capacité de produire des quantités importantes de pré $\beta$ -HDL.
- 2- Le pré $\beta$ -HDL efflux le cholestérol des cellules par la voie de l'ABCA1.
- 3- Le pré $\beta$ -HDL peut représenter une des stratégies thérapeutiques prometteuses contre l'athérosclérose.

Pour finir sur une conclusion générale, cet ouvrage a mis des bases solides pour la compréhension fondamentale de la biogénèse des HDL par la voie de l'ABCA1. La grande conclusion de ma recherche est que : rien est certain dans la science, chaque matin il y a du nouveau!

## Références

1. Corti R, Fuster V, Badimon JJ, Hutter R, Fayad ZA. (2001). New understanding of atherosclerosis (clinically and experimentally) with evolving MRI technology in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 947:181-95.
2. Emmerich, J., and Bruneval, P. (2000). *L'athérosclérose*.
3. Murray, K. H., Granner, D. K., Mayes, P. A., and Rodwell, V. W. (2000). *Harper's Biochemistry*.
4. Voet, D., and Voet, J. G. (2005). *Biochemistry*, John Wiley and Sons, Inc.
5. Schaefer, E. J., and Levy, R. I. (1985). Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N Engl J Med.* 312 : 1300-1310.
6. Gagné C, Gaudet, D. (2007). *Les dyslipoprotéïnémies l'approche clinique*. 3ième ed,
7. Schaefer E. (1990). *Lipoprotéines de haute densité et insuffisance coronarienne*. 1<sup>st</sup> ed, Gower Medical Publishing,
8. Barter P, Rye, K. (2007). *High Density Lipoprotein Cholesterol: A Handbook for Clinicians*. 3rd ed: Sherborne Gibbs.
9. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. (2005). Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 5:1431-45.



10. Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, Roheim PS. (1993). Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochim Biophys Acta*. 1169:291-300.
11. Pownall HJ, Ehnholm C. (2006). The unique role of apolipoprotein A-I in HDL remodeling and metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 17:209-13.
12. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. (2009). The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res*. 50. Suppl:S195-200.
13. Lewis GF, Rader DJ. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 96:1221-32.
14. Roheim P.S. and Asztalos B.F. (1995). Clinical significance of lipoprotein size and risk for coronary atherosclerosis. *Clin Chem*. 41: 147-152.
15. Lewis GF. (2006). Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol*. 21: 345-352.
16. Guyard-Dangremont, V., Lagrost, L., and Gambert, P. (1994). Comparative effects of purified apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV on cholesteryl ester transfer protein activity. *J Lipid Res*. 35: 982- 992
17. Kuivenhoven, J. A., Pritchard, H., Hill, J., Frohlich, J., Assmann, G., and Kastelein, J. (1997). The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res*. 38: 191-205
18. Lagrost, L. (1994). Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta*. 121:, 209-236

19. Van Tol, A. (2002). Phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol.* 13: 135-139
20. Bolanos-Garcia, V. M., Soriano-Garcia, M., and Mas-Oliva, J. (1997). CETP and exchangeable apoproteins: common features in lipid binding activity. *MCB.* 175: 1-10
21. Stein, O., and Stein, Y. (2005). Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 178: 217-230
22. Wong, H., and Schotz, M. C. (2002). The lipase gene family. *J Lipid Res.* 43: 993-999
23. Huuskonen, J., and Ehnholm, C. (2000). Phospholipid transfer protein in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 11: 285-289
24. Bruce, C., Chouinard, R. A., Jr., and Tall, A. R. (1998). Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr.* 18: 297-330
25. Glomset, J. A., and Verdery, R. B. (1977). Role of LCAT in cholesterol metabolism. *Expos Annu Biochim Med.* 33: 137-142
26. Dobiasova, M., and Frohlich, J. J. (1999) Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clin Chim Acta.* 286: 257-271
27. Jonas, A. (1998). Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *Prog Lipid Res.* 37: 209-234

28. De Grooth, G. J., Klerkx, A. H., Stroes, E. S., Stalenhoef, A. F., Kastelein, J. J., and Kuivenhoven, J. A. (2004). A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J Lipid Res.* 45: 1967-1974
29. Boekholdt, S. M., Kuivenhoven, J. A., Hovingh, G. K., Jukema, J. W., Kastelein, J. J., and van Tol, A. (2004). CETP gene variation: relation to lipid parameters and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol.* 15: 393-398
30. Morton, R. E. (1999). Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr Opin Lipidol.* 10: 321-327
31. Dumont, L., Gautier, T., de Barros, J. P., Laplanche, H., Blache, D., Ducoroy, P., Fruchart, J., Fruchart, J. C., Gambert, P., Masson, D., and Lagrost, L. (2005). Molecular mechanism of the blockade of plasma cholesteryl ester transfer protein by its physiological inhibitor apolipoprotein CI. *J Biol Chem.* 280: 38108-38116
32. Huuskonen, J., Olkkonen, V. M., Jauhiainen, M., and Ehnholm, C. (2001). The impact of phospholipids transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis.* 155: 269-281
33. Jiang, X. C. (2002). The effect of phospholipid transfer protein on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Front Biosci.* 7: 1634-1641
34. Fan, J., and Watanabe, T. (1998). Hepatic lipase. *J Atheroscler Thromb.* 5: 41-45
35. Thuren, T. (2000). Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 11: 277-283

36. Zambon, A., Bertocco, S., Vitturi, N., Polentarutti, V., Vianello, D., and Crepaldi, G. (2003). Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans.* 31: 1070-1074
37. Perret, B., Mabile, L., Martinez, L., Terce, F., Barbaras, R., and Collet, X. (2002). Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res.* 43: 1163-1169
38. Connelly, P. W. (1999). The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta.* 286: 243-255
39. Santamarina-Fojo, S., Gonzalez-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., and Nong, Z. (2004). Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *A.T.V.B.* 24: 1750-1754
40. Reschly, E. J., Sorci-Thomas, M. G., Davidson, W. S., Meredith, S. C., Reardon, C. A., and Getz, G. S. (2002). Apolipoprotein A-I alpha -helices 7 and 8 modulate high density lipoprotein subclass distribution. *J Biol Chem.* 277: 9645-9654
41. Breslow, J. L. (1993). Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *PNAS.* 90: 8314-8318
42. Frank, P. G., and Marcel, Y. L. (2000). Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res.* 41: 853-872
43. Cho, K. H., and Jonas, A. (2000). A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* 275: 26821-26827

44. Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 36: 211-228
45. Liu, T., Krieger, M., Kan, H. Y., and Zannis, V. I. (2002). The effects of mutations in helices 4 and 6 of ApoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. *J Biol Chem.* 277: 21576-21584
46. Arakawa, R., and Yokoyama, S. (2002). Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem.* 277: 22426-22429
47. Bruckert, E., von Eckardstein, A., Funke, H., Beucler, I., Wiebusch, H., Turpin, G., and Assmann, G. (1997). The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-IMilano. *Atherosclerosis.* 128: 121-128
48. Weisgraber, K. H., Bersot, T. P., Mahley, R. W., Franceschini, G., and Sirtori, C. R. (1980). A-Imilano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J Clin Invest.* 66: 901-907
49. Shah, P. K., Yano, J., Reyes, O., Chyu, K. Y., Kaul, S., Bisgaier, C. L., Drake, S., and Cercek, B. (2001). High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation.* 103: 3047-3050

50. Bielicki, J. K., and Oda, M. N. (2002). Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*. 41:2089-2096
51. Sviridov D, Nestel PJ. (2007). Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol*. 18:157-63.
52. Chiesa G, Sirtori CR. (2003). Apolipoprotein A-I(Milano): current perspectives. *Curr Opin Lipidol*. 14:159-63.
53. Dean M, Hamon Y, Chimini G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 42:1007-17.
54. Oram JF, Vaughan AM. (2006). ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*. 99:1031-43.
55. Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR, Attie AD. (2003). ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem*. 278:13356- 66.
56. Oram JF, Heinecke JW. (2005). ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 85:1343-72.
57. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 116:1052-62.

58. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, Tansey T, Amar MJ, Fruchart-Najib J, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. (2003). Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res.* 44:296-302.
59. Sahoo D, Trischuk TC, Chan T, Drover VA, Ho S, Chimini G, Agellon LB, Agnihotri R, Francis GA, Lehner R. (2004). ABCA1-dependent lipid efflux to apolipoprotein A-I mediates HDL particle formation and decreases VLDL secretion from murine hepatocytes. *J Lipid Res.* 45:1122-31.
60. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. (2003). Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *A.T.V.B.* 23: 1322-32.
61. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. (2003). Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *A.T.V.B.* 23: 712-719.
62. Yancey PG, Kawashiri MA, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA, Rader DJ, Rothblat GH. (2004). In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 45:337-346.
63. Dean M, Hamon Y, Chimini G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 42:1007-1017.
64. Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffe P, Brewer HB, Jr. (1999). Human ATP-binding

- cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *PNAS*. 96:12685-12690.
65. Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HB, Jr. (2001). Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res*. 42:1339-1345.
  66. Tall AR. (2008). Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med*. 263: 256-273.
  67. Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Denèfle P, Fredrickson DS, Brewer HB Jr. (2000). Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *PNAS*. 97: 7987-92.
  68. Barth N, Langmann T, Schölmerich J, Schmitz G, Schäffler A. (2002). Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 (apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF-alpha as regulatory pathways. *Diabetologia*. 10:1425-33
  69. Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer LJ, McNeish J, Francone OL. (2000). The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem*. 275: 28634-40.



70. Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun.* 274: 794-802.
71. Liao H, Langmann T, Schmitz G, Zhu Y. (2002). Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells. *A.T.V.B.* 22: 127-132
72. Pullinger CR, Hakamata H, Duchateau PN, Eng C, Aouizerat BE, Cho MH, Fielding CJ, Kane JP. (2000). Analysis of hABC1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 271: 451-455.
73. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* 7: 53-58.
74. Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *PNAS.* 98: 5306-11.
75. Porsch-Ozcurumez M, Langmann T, Heimerl S, Borsukova H, Kaminski WE, Drobnik W, Honer C, Schumacher C, Schmitz G. (2001). The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux. *J Biol Chem.* 276: 12427-33.

76. Panousis CG, Zuckerman SH. (2000). Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *A.T.V.B.* 20: 1565-71.
77. Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X, Langer C, Schachtrup C, Wiekowski J, Lorkowski S, Assmann G, von Eckardstein A. (2002). Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. *Diabetes.* 10:2922-8.
78. Tall AR, Wang N, Mucksavage P. (2001). Is it time to modify the reverse cholesterol transport model? *J Clin Invest.* 108: 1273-5.
79. Becq F, Hamon Y, Bajetto A, Gola M, Verrier B, Chimini G. (1997). ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem.* 272: 2695-9.
80. See RH, Caday-Malcolm RA, Singaraja RR, Zhou S, Silverston A, Huber MT, Moran J, James ER, Janoo R, Savill JM, Rigot V, Zhang LH, Wang M, Chimini G, Wellington CL, Tafuri SR, Hayden MR. (2002). Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem.* 277: 41835-42.
81. Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, Tall AR. (2003). A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest.* 111: 99-107.

82. Schmitz G, Langmann T. (2005). Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta*.1735: 1-19.
83. McNamara, D.J. (2000). "Dietary cholesterol and atherosclerosis." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1529: 310-320.
84. Castelli W.P. (1988). "Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease: the Framingham Heart Study." *Can J Cardiol* 4: 5A-10A.
85. Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, W.B., and Dawber, T.R.(1977). "High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham study." *The American Journal of Medicine* 62: 707-714.
86. Voet, D and Voet, J. G. (1990). "Biochemistry.": 304-311.
87. Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H.(2000). "Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters." *Science* 290: 1771-1775.
88. Stein, Y. and Stein, O. (2003). "Lipoprotein lipase and atherosclerosis." *Atherosclerosis* 170: 1-9.
89. Zannis, V.I., Chroni, A., Kypreos, K.E., Kan, H-Y., Cesar, T.B., Zanni, E.E., and Kardassis, D. (2004). "Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer." *Curr.Opin.Lipidol*. 15: 151-166.

90. Kang, S. and Davis, R.A.(2000). "Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1529: 223-230.
91. White, D.A., Bennett, A.J., Billet, M.A., and Salter, A.M. (1998). "The assembly of triacylglycerol-rich lipoproteins: an essential role for the microsomal triacylglycerol transfer protein." *British J Nut* 80: 219-229.
92. Fisher, E.A., Zhou, M., Mitchell, D.M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A.L., and Ginsberg, H.N. (1997). "The Degradation of Apolipoprotein B100 Is Mediated by the Ubiquitin-proteasome Pathway and Involves Heat Shock Protein 70." *J. Biol. Chem*. 272: 20427-20434.
93. Istvan, E.S. and Deisenhofer, J. (2000). "The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase." *Biochimica et Biophysica Acta*.1529: 9-18.
94. Buhman, K.F., Accad, M., and Robert, V. (2000). "Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1529: 142-154.
95. Fisher, E.A., Pan, M., Chen, X., Wu, X., Wang, H., Jamil, H., Sparks, J.D., and Williams, K.J. (2001). "The Triple Threat to Nascent Apolipoprotein B. Evidence for multiple, distinct degradative pathways." *J. Biol. Chem*. 276: 27855-27863.
96. Harris, W. S. (1989). "Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review." *J. Lipid Res*. 30: 785-807.
97. Gordon, D.A. and Jamil, H. (2000). "Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1486: 72-83.

98. Carmena, R., Duriez, P., and Fruchart, J-C. (2004). "Atherogenic Lipoprotein Particles in Atherosclerosis." *Circulation* 109: III-2.
99. Sniderman, A. D., Blank, D., Zakarian, R., Bergeron, J., and Frohlich, J. (2003). "Triglycerides and small dense LDL: the twin Achilles heels of the Friedewald formula." *Clin.Biochem.* 36: 499-504.
100. Russell, D. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1989). "Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins." *J.Biol.Chem.* 264: 21682-21688.
101. Fielding, P. E. and Fielding, C. J. (1996). "Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae." *Biochemistry* 35: 14932-14938.
102. Brousseau, M. E., Schaefer, E. J., Wolfe, M. L., Bloedon, L. T., Digenio, A. G., Clark, R. W., Mancuso, J. P., and Rader, D. J. (2004). "Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol." *N.Engl.J.Med.* 350: 1505-1515.
103. Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K. L., Schultz, R. A., Parker, K. L., and Hobbs, H. H. (1997). "Structure and Localization of the Human Gene Encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1." *J. Biol. Chem.* 272: 33068-33076.
104. Hirano, K., Yamashita, S., Nakagawa, Y., Ohya, T., Matsuura, F., Tsukamoto, K., Okamoto, Y., Matsuyama, A., Matsumoto, K., Miyagawa, J., and Matsuzawa, Y. (1999). "Expression of Human Scavenger

- Receptor Class B Type I in Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages and Atherosclerotic Lesions." *Circulation Research* 85: 108-116.
105. Rodriguez, A. and Wee, S.B. (1999). "The HDL Receptor Protein, SR-BI/CLA1, Does Not Mediate Cholesterol Efflux from Human Macrophage Foam Cells." *Circ.Suppl.* 100.
  106. Stangl, H., Hyatt, M., and Hobbs, H.H. (1999). "Transport of Lipids from High and Low Density Lipoproteins via Scavenger Receptor-BI." *J. Biol. Chem.* 274: 32692-32698.
  107. Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., and Krieger, M. (1997). "A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism." *PNAS.* 94: 12610-12615.
  108. Chen, W., Silver, D. L., Smith, J. D., and Tall, A. R. (2000). "Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages." *J.Biol.Chem.* 275: 30794-30800.
  109. Marcil, M., Yu, L., Krimbou, L., Boucher, B., Oram, J. F., Cohn, J. S., and Genest, J., Jr. (1999). "Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency." *A.T.V.B.* 19: 159-169.
  110. Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J., Jr. (2004). "Molecular and cellular physiology of apolipoprotein A-I lipidation by the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)." *J. Biol. Chem.* 279: 7384-7394.

111. Tricerri, M. A., Behling A., Andrea K., Sanchez, SA., Bronski, J., and Jonas, A. (2001). "Arrangement of Apolipoprotein A-I in Reconstituted High-Density Lipoprotein Disks: An Alternative Model Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Experiments." *Biochemistry* 40: 5065-5074.
112. Segrest J.P., Li, L., Anantharamaiah, G.M., Harvey, S.C., Liadaki, K.N., and Zannis, V. I. (2000). "Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein." *Curr.Opin.Lipidol.* 11: 105-115.
113. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Hayden, M. R., (1999). "Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial highdensity lipoprotein deficiency." *Nat.Genet.* 22: 336-345.
114. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., and Schmitz, G. (1999). "The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease." *Nat.Genet.* 22: 347-351.
115. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Deneffe, P., and Assmann, G. (1999). "Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1." *Nat.Genet.* 22: 352-355.

116. Remaley, A. T., Rust, S., Rosier, M., Knapper, C., Naudin, L., Broccardo, C., Peterson, K.M., Koch, C., Arnould, I., Prades, C., Duverger, N., Funke, H., Assman, G., Dinger, M., Dean, M., Chimini, G., Santamarina-Fojo, S., Fredrickson, D. S., Deneffe, P., and Brewer, H. B., Jr. (1999). "Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): Genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred." *Proc. Nat. Acad. Sciences* 96: 12685-12690.
117. Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S. M., Roomp, K., Zhang, L. H., Yu, L., Collins, J. A., van Dam, M., Molhuizen, H. O., Loubster, O., Ouellette, B. F., Sensen, C.W., Fichter, K., Mott, S., Denis, M., Boucher, B., Pimstone, S., Genest, J., Jr., Kastelein, J. J., and Hayden, M. R. (1999). "Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux." *Lancet* 354: 1341-1346.
118. Rosenberg, Mark F., Callaghan, Richard, Ford, Robert C., and Higgins, Christopher F. (1997). "Structure of the Multidrug Resistance P-glycoprotein to 2.5nm Resolution Determined by Electron Microscopy and Image Analysis." *J. Biol. Chem.* 272: 10685-10694.
119. Eskandari, S., Wright, E. M., Kreman, M., Starace, D. M., and Zampighi, G. A. (1998). "Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy." *PNAS*. 95: 11235-11240.
120. Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., and Zhang, J. T. (2004). "Characterization of Oligomeric Human Half-ABC Transporter ATP-binding Cassette G2." *J. Biol. Chem.* 279: 19781-19789.
121. Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J. (2004). "Characterization of oligomeric human ATP-binding cassette



- transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent HDL particles." *J. Biol. Chem.* 279: 41529-41536.
122. Oram, J. F., Lawn, R. M., Garvin, M. R., and Wade, D. P. (2000). "ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages." *J.Biol.Chem.* 275: 34508-34511.
  123. Denis, M., Bissonnette, R., Haidar, B., Krimbou, L., Bouvier, M., and Genest, J. (2003). "Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines." *Mol.Genet.Metab* 78: 265-274.
  124. Singaraja, R. R., Brunham, L. R., Visscher, H., Kastelein, J. J., and Hayden, M. R. (2003). "Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene." *A.T.V.B.* 23: 1322-1332.
  125. Fitzgerald, M.L., Morris, A.L., Rhee, J. S., Andersson, L.P., Mendez, A. J., and Freeman, M. W. (2002). "Naturally Occurring Mutations in the Largest Extracellular Loops of ABCA1 Can Disrupt Its Direct Interaction with Apolipoprotein A-I." *J. Biol. Chem.* 277: 33178-33187.
  126. Tanaka, A. R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K., Ikeda, Y., Kano, F., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Murata, M., Yokoyama, S., and Ueda, K. (2003). "Effects of Mutations of ABCA1 in the First Extracellular Domain on Subcellular Trafficking and ATP Binding/Hydrolysis." *J. Biol. Chem.* 278: 8815-8819.
  127. Rigot, V., Hamon, Y., Chambenoit, O., Alibert, M., Duverger, N., and Chimini, G. (2002). "Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids." *J. Lipid Res.* 43: 2077-2086.

128. Szakacs, G., Langmann, T., Ozvegy, C., Orso, E., Schmitz, G., Varadi, A., and Sarkadi, B. (2001). "Characterization of the ATPase Cycle of Human ABCA1: Implications for Its Function as a Regulator Rather Than an Active Transporter." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 288: 1258-1264.
129. Wang, N, Chen, W., Linsel-Nitschke, P, Martinez, Laurent O., Agerholm-Larsen, Birgit, Silver, D. L., and Tall, A. R. (2003). "A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I." *J Clin Invest* 111: 99-107.
130. Martinez, L.O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W., and Tall, A.R. (2003). "Phosphorylation of a Pest Sequence in ABCA1 Promotes Calpain Degradation and Is Reversed by ApoA-I." *J. Biol. Chem.* 278: 37368-37374.
131. Haidar, B., Denis, M., Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J., Jr. (2002). "cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts." *J.Lipid Res.* 43: 2087-2094.
132. See, R.H., Caday-Malcolm, R. A., Singaraja, R. R., Zhou, S., Silverston, A., Huber, M.T., Moran, J., James, E. R., Janoo, R., Savill, J. M., Rigot, V., Zhang, L. H., Wang, M., Chimini, G., Wellington, C., Tafuri, S. R., and Hayden, M. R. (2002). "Protein Kinase A Site-specific Phosphorylation Regulates ATP-binding Cassette A1 (ABCA1)-mediated Phospholipid Efflux." *J. Biol. Chem.* 277: 41835-41842.
133. Haidar, B., Denis, M., Marcil, M., Krimbou, L., and Genest, J., Jr. (2004). "Apolipoprotein A-I activates cellular cAMP signaling through the ABCA1 transporter." *J. Biol. Chem.* 279: 9963-9969.

134. Short, D.B., Trotter, K.W., Reczek, D., Kreda, S.M., Bretscher, A., Boucher, R.C., Stutts, M. J., and Milgram, S.L. (1998). "An Apical PDZ Protein Anchors the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to the Cytoskeleton." *J. Biol. Chem.* 273: 19797-19801.
135. Buechler, C., Boettcher, A., Maa B., Salim, P., Mario C. O., and Schmitz, G. (2002). "The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a [beta]2-syntrophin/utrophin complex." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293: 759-765.
136. Munehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S., Amachi, T., Matsuo, M., Kioka, N., and Ueda, K. (2004). "{alpha}1-Syntrophin Modulates Turnover of ABCA1." *J. Biol. Chem.* 279: 15091-15095.
137. Smith, J. D., Waelde, C., Horwitz, A., and Zheng, P. (2002). "Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux." *J.Biol.Chem* 277: 17797-17803.
138. Wang, N., Silver, D. L., Costet, P., and Tall, A. R. (2000). "Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1." *J.Biol.Chem.* 275: 33053-33058.
139. Takahashi, Y. and Smith, J. D. (1999). "Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway." *Proc. Natl. Acad. Sciences* 96: 11358-11363.
140. Neufeld, E. B., Remaley, A. T., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Cooney, A. M., Comly, M., Dwyer, N. K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2001). "Cellular localization

- and trafficking of the human ABCA1 transporter." *J.Biol.Chem.* 276: 27584-27590.
141. Neufeld, E. B., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Jr., Knapper, C. L., Combs, C. A., Cooney, A., Comly, M., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Remaley, A.T., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B. Jr. (2004). "The ABCA1 Transporter Modulates Late Endocytic Trafficking: Insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease." *J. Biol. Chem.* 279: 15571-15578.
  142. Smith, J. D., Le Goff, W., Settle, M., Brubaker, G., Waelde, C., Horwitz, A., and Oda, M.N. (2004). "ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I." *J. Lipid Res.* 45: 635-644.
  143. Fielding, P. E., Nagao, K., Hakamata, H., Chimini, G., and Fielding, C. J. (2000). "A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1." *Biochemistry* 39: 14113-14120.
  144. Marcil, M., Bissonnette, R., Vincent, J., Krimbou, L., and Genest, J. (2003). "Cellular phospholipid and cholesterol efflux in high-density lipoprotein deficiency." *Circulation* 107: 1366-1371.
  145. Remaley, A. T., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Neufeld, E. B., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Eggerman, T. L., Patterson, A. P., Duverger, N. J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2001). "Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 280: 818-823.

146. Krimbou, L., Denis, M., Haidar, B., Carrier, M., Marcil, M., and Genest, J., Jr. (2004). "Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation." *J. Lipid Res.* 45: 839-848.
147. Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R. A., Dietschy, J. M., and Mangelsdorf, D. J. (2000). "Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers." *Science* 289: 1524-1529.
148. Oliver, W. R., Jr., Shenk, J. L., Snaith, M. R., Russell, C. S., Plunket, K. D., Bodkin, N. L., Lewis, M. C., Winegar, D. A., Sznaidman, M. L., Lambert, M. H., Xu, H. E., Sternbach, D. D., Kliewer, S. A., Hansen, B. C., and Willson, T. M. (2001). "A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 5306-5311.
149. Steinberg D. (1997). "Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance". *J Biol Chem* 272 : 20963-20966.
150. Banka CL. (1996). "High density lipoproteins and lipoprotein oxidation". *Curr Opin Lipidol* 7: 139-142.
151. Shih DM, Gu L, Xia Y-R, Navab M, Li W-F, Hama S, et al. (1998). "Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis". *Nature* 394: 284-287.
152. Blatter Garin M-C, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, et al. (1997). "Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes". *J Clin Invest* 99 : 62-66.

153. Fruchart J-C, Duriez P, Staels B. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis". *Curr Opin Lipidol* 10: 245-257.
154. Ross R. (1999). "Atherosclerosis: an inflammatory disease". *N Engl J Med* 340: 115-126.
155. Lee RT, Libby P. (1997). "The unstable atheroma". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1859-1867.
156. Wu Z, Gogonea V, Lee X, Wagner MA, Li XM, Huang Y, Undurti A, May RP, Haertlein M, Moulin M, Gutsche I, Zaccai G, Didonato JA, Hazen SL. (2009). "Double Superhelix Model of High Density Lipoprotein". *J Biol Chem*. 284: 36605-36619.
157. Wu Z, Wagner MA, Zheng L, Parks JS, Shy JM 3rd, Smith JD Gogonea V, Hazen SL. (2007). "The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction" *Nat Struct Mol Biol*. 14: 861-868.
158. Lefevre,M., Sloop,C.H., and Roheim,P.S. (1988). Characterization of dog prenodal peripheral lymph lipoproteins. Evidence for the peripheral formation of lipoprotein-unassociated apoA-I with slow pre-beta electrophoretic mobility. *J.Lipid Res*. 29:1139-1148.
159. Hara,H. and Yokoyama,S. (1991). Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J.Biol.Chem* 266:3080-3086.

160. Huang, Y., von Eckardstein, A., and Assmann, G. (1993). Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *A.T.V.B.* 13:445-458.
161. Krimbou L, Hajj Hassan H, Blain S, Rashid S, Denis M, Marcil M, Genest J. (2005). Biogenesis and speciation of nascent apoA-I-containing particles in various cell lines. *J Lipid Res.* 46: 1668-77.
162. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, Byun J, Vuletic S, Kassim S, Singh P, Chea H, Knopp RH, Brunzell J, Geary R, Chait A, Zhao XQ, Elkon K, Marcovina S, Ridker P, Oram JF, Heinecke JW. (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 117: 746-56.
163. Miller YI, Choi SH, Fang L, Tsimikas S. (2010). Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem.* 51:229-51.
164. Cyrus T, Praticò D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA, Funk CD. (2001). Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* 103: 2277-82.
165. Pirillo A, Uboldi P, Kuhn H, Catapano AL. (2006). 15-Lipoxygenase-mediated modification of high-density lipoproteins impairs SR-BI- and ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 292-300.

166. Niesor EJ, Magg C, Ogawa N, Okamoto H, von der Mark E, Matile H, Schmid G, Clerc RG, Chaput E, Blum-Kaelin D, Huber W, Thoma R, Pflieger P, Kakutani M, Takahashi D, Dernick G, Maugeais C. (2010). Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre- $\beta$ -HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 51: 3443-54.
167. Barkowski RS, Frishman WH. (2008). HDL metabolism and CETP inhibition. *Cardiol Rev.* 16: 154-62.
168. Olofsson SO, Wiklund O, Borén J. (2007). Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 3: 491-502.
169. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. (2004). Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 95: 764-72.
170. Yvan-Charvet L, Pagler TA, Seimon TA, Thorp E, Welch CL, Witztum JL, Tabas I, Tall AR. (2010). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. *Circ Res.* 106: 1861-9.



171. Lowenstein CJ, Cameron SJ. (2010). High-density lipoprotein metabolism and endothelial function. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 17: 166-70.
172. Castro, GR and Fielding, C. J. (1988). "Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein." *Biochemistry* 27: 25-29.
173. Francone, O. L., Gurakar, A., and Fielding, C. (1989). "Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol." *J. Biol. Chem.* 264: 7066-7072.
174. Denis M, Landry YD & Zha X. (2008). ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments. *J Biol Chem* 283:16178–16186.
175. Hamilton RL, Moorehouse A & Havel RJ. (1991). Isolation and properties of nascent lipoproteins from highly purified rat hepatocytic Golgi fractions. *J Lipid Res* 32: 529–543.
176. Chisholm JW, Burleson ER, Shelness GS & Parks JS. (2002). ApoA-I secretion from HepG2 cells: evidence for the secretion of both lipid-poor apoA-I and intracellularly assembled nascent HDL. *J Lipid Res* 43: 36–44.
177. Kiss RS, McManus DC, Franklin V, et al. (2003). The lipidation by hepatocytes of human apolipoprotein A-I occurs by both ABCA1-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 278:10119–10127.

178. Takahashi Y & Smith JD. (1999). Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *PNAS*. 96: 11358–11363.
179. Lorenzi I, von Eckardstein A, Cavelier C, et al. (2008). Apolipoprotein A-I but not high density lipoproteins are internalised by RAW macrophages: roles of ATP-binding cassette transporter A1 and scavenger receptor BI. *J Mol Med* 86:171–183.
180. Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L & von Eckardstein A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* 1761: 655–666 (Review).
181. Chambenoit O, Hamon Y, Marguet D, et al. (2001). Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 276: 9955–9960.
182. Favari E, Calabresi L, Adorni MP, Jessup W, Simonelli S, Franceschini G, Bernini F. (2009). Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry*. 48: 11067-74.
183. Storey SM, Gallegos AM, Atshaves BP, McIntosh AL, Martin GG, Parr RD, Landrock KK, Kier AB, Ball JM, Schroeder F. (2007). Selective cholesterol dynamics between lipoproteins and caveolae/lipid rafts. *Biochemistry*. 46: 13891-906.
184. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to

apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 282: 25123-30.

185. Landry YD, Denis M, Nandi S, Bell S, Vaughan AM, Zha X. (2006). ATP-binding cassette transporter A1 expression disrupts raft membrane microdomains through its ATPase-related functions. *J Biol Chem.* 281: 36091-101.

