

Université de Montréal

Les effets du dalcetrapib, un inhibiteur de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), sur la structure et la fonction des lipoprotéines de haute densité (HDL) dans l'étude dal-PLAQUE2

Par Marie-Lou Beaudet

Sciences biomédicales, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences
en Sciences biomédicales
option Générale

Octobre 2015

© Marie-Lou Beaudet, 2015

**Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures**

Ce mémoire intitulé :

Les effets du dalcetrapib, un inhibiteur de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), sur la structure et la fonction des lipoprotéines de haute densité (HDL) dans l'étude dal-PLAQUE2

présenté par :

Marie-Lou Beudet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guylaine Ferland, président-rapporteur

Jean-Claude Tardif, directeur de recherche

Eric Rhéaume, co-directeur

Sylvie Marleau, membre du jury

RÉSUMÉ

Introduction : Le dalcetrapib, inhibiteur de la glycoprotéine hydrophobe de transfert des esters de cholestérol (CETP), a été étudié dans le cadre de l'essai clinique de phase II dal-PLAQUE2 (DP2). L'objectif principal est d'étudier l'effet du dalcetrapib après 1 an de traitement sur la structure et la fonction des HDL dans une sous-population de la cohorte DP2.

Méthode : Les sujets de la cohorte DP2 ayant une série de mesures de cIMT et des échantillons de plasma et sérum au baseline et à 1 an de traitement furent sélectionnés (379 sujets: 193 du groupe placebo (PCB) et 186 du groupe dalcetrapib (DAL)). Des données biochimiques prédéterminées, le profil des concentrations et tailles des sous-classes de HDL et LDL en résonance magnétique nucléaire (RMN) et 2 mesures de capacité d'efflux de cholestérol (CEC) du sérum ont été explorées. Les données statistiques furent obtenues en comparant les changements à un an à partir du « baseline » avec un ANOVA ou ANCOVA. La procédure normalisée de fonctionnement d'essai d'efflux de cholestérol permet de calculer l'efflux fractionnel (en %) de ³H-cholestérol des lignées cellulaires BHK-ABCA1 (fibroblastes) et J774 (macrophages, voie ABCA1) et HepG2 (hépatocytes, voie SR-BI), vers les échantillons sériques de la cohorte DP2.

Résultats : Pour la biochimie plasmatique, un effet combiné des changements d'activité de CETP dans les 2 groupes a causé une réduction de 30% dans le groupe DAL. Après 1 an de traitement dans le groupe DAL, la valeur de HDL-C a augmenté de 35,5% ($p < 0,001$) et l'apoA-I a augmenté de 14,0% ($p < 0,001$). Au profil RMN, dans le groupe DAL après 1 an de traitement, il y a augmentation de la taille des HDL-P (5,2%; $p < 0,001$), des grosses particules HDL (68,7%; $p < 0,001$) et des grosses particules LDL (37,5%; $p < 0,01$). Les petites particules HDL sont diminuées (-9,1%; $p < 0,001$). Il n'y a aucune différence significative de mesure de cIMT entre les deux groupes après 1 an de traitement. Pour la CEC, il y a augmentation significative par la voie du SR-BI et une augmentation via la voie ABCA1 dans le groupe DAL après 1 an de traitement.

Conclusion : Après un an de traitement au dalcetrapib, on note une hausse de HDL-C, des résultats plutôt neutres au niveau du profil lipidique par RMN et une CEC augmentée mais trop faible pour affecter la valeur de cIMT chez les échantillons testés.

Mots clés : cholestérol, athérosclérose, dalcetrapib, capacité d'efflux de cholestérol, ABCA1, SR-BI, HDL, cIMT

ABSTRACT

Introduction: Dalcetrapib, an inhibitor of the hydrophobic cholesteryl ester transfer protein (CETP), was studied within the framework of the phase II clinical essay dal-PLAQUEII (DP2). The main goal is to study the effect of dalcetrapib after 1 year of treatment on the structure and function of the HDL particles in a sub-population of the DP2 cohort.

Method: DP2 subjects having a series of measurements of cIMT and samples of plasma and serum at baseline and after 1 year of treatment were selected (379 samples: 193 in the placebo arm (PCB) and 186 in the dalcetrapib arm (DAL)). Predetermined biochemical data, profile of size and subclass concentrations of HDL and LDL by nuclear magnetic resonance (NMR) and 2 different serum cholesterol efflux capacity (CEC) measures were explored. Statistical data were obtained comparing change at 1 year from baseline with ANOVA or ANCOVA. The standardized protocol of efflux assay allowed to calculate the ³H-cholesterol fractional efflux (in %) of BHK-ABCA1 (fibroblasts) and J774 (macrophages, ABCA1 pathway) and HepG2 (hepatocytes, SR-BI pathway) cell lines, to human sera samples from the DP2 cohort.

Results: Regarding the plasmatic biochemistry, a combined effect in CETP activity changes in both arms caused a reduction of 30% in the DAL arm. After 1 year in the DAL arm, HDL-C rate was increased by 35.5% ($p < 0.001$) and apoA-I value increased by 14.0% ($p < 0.001$). In the NMR lipoprofile in the DAL arm after 1 year, size of HDL particles by 5.2% ($p < 0.001$), large HDL particles by 68.7% ($p < 0.001$) and large LDL particles by 37.5% ($p < 0.01$). Small HDL particles were decreased by 9.1% ($p < 0.001$). Regarding cIMT index, there is no significant difference between the 2 arms. On the level of the CEC, we noted a significant increase of the efflux through the SR-BI pathway and a increase via the ABCA1 pathway in the DAL arm after 1 year of treatment.

Conclusion: After one year of treatment with dalcetrapib, one can note a rise of HDL-C, rather neutral results on the level of the NMR lipoprofile and a modest increased efflux capacity but too low to affect the value of cIMT in the tested samples.

Key words: cholesterol, atherosclerosis, dalcetrapib, cholesterol efflux capacity, ABCA1, SR-BI, HDL, cIMT

4.2.2	Modèles cellulaires	21
4.2.2.a	Efflux de cholestérol cellulaire <i>ex vivo</i>	21
4.2.2.b	Hépatocytes	21
4.2.2.c	Macrophages	22
4.2.2.d	Fibroblastes.....	22
4.2.2.e	Notre modèle.....	22
4.3	Mesures de la charge athérosclérotique.....	23
4.3.1	QCA et IVUS.....	23
4.3.2	cIMT.....	24
5.	Programme Dal-HEART	25
5.1	Description et objectifs	25
5.2	dal-PLAQUE2 (DP2).....	28
5.2.1	Justification	28
5.2.2	Objectifs	29
5.2.3	Mesures de la charge athérosclérotique disponibles dans DP2	29
5.2.4	Résultats non publiés de l'étude DP2	30
LA SOUS-ÉTUDE CONCERNANT LES EFFETS DU DALCETRAPIB, UN INHIBITEUR		
DE CETP, SUR LA STRUCTURE ET LA FONCTION DES HDL DANS L'ÉTUDE DP2		
1.	Objectifs et Hypothèse	31
1.1	Objectif principal	31
1.2	Objectifs secondaires	31
1.3	Hypothèse.....	32
2.	Sélection de l'échantillon	32
3.	Mesures effectuées, méthodes	34
3.1	Courbes concentration-effet	34
3.2	Essais d'efflux de cholestérol	37
3.3	Mesure de l'activité de la CETP	40
4.	Résultats	40
4.1	Description de la cohorte	40
4.2	Biochimie	42
4.3	Profil lipidique réalisé par RMN	45
4.4	Coefficients de variation globaux selon le modèle cellulaire d'efflux et effet de la normalisation avec le sérum témoin	46
4.5	Capacité d'efflux de cholestérol.....	47
4.6	Mesure de l'épaisseur de l'intima-media carotidienne	48
5.	Discussion	49
5.1	Biochimie plasmatique	50
5.1.1	Activité de la CETP.....	50
5.1.2	Protéines impliquées dans la fonction des HDL (LCAT et MPO)	50
5.1.3	Bilirubine	50
5.2	Profil des lipides plasmatiques	51
5.2.1	Augmentation des taux de HDL-C.....	51
5.2.2	Augmentation de l'apoA-I.....	52
5.2.3	RMN	52
5.2.4	Augmentation des taux de cholestérol total et de LDL-C	53
5.3	Capacité d'efflux de cholestérol du sérum humain	53
5.4	Facteurs métaboliques à considérer	60
5.5	Aspects pharmacogénomiques de la thérapie avec le dalcetrapib.....	61
RÉFÉRENCES.....		65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Programme dal-HEART selon les différentes études cliniques – dal-VESSEL, dal-PLAQUE, dal-OUTCOMES, dal-PLAQUE2 et dal-ACUTE - le composant : leurs phase, les nombres et types de patients, la période durant laquelle l'étude s'est déroulée ainsi que les évènements cliniques principaux visés par l'étude.....	26
Tableau II: Résultats des moyennes des mesures de la cIMT moyenne et maximale pour tous les segments (mm) dans la cohorte de l'étude dal-PLAQUE2 (initialement Placebo n=462 Dalcetrapib n=474) au baseline et après 1 an de traitement ainsi que les valeurs de changement absolu (n, moyennes et écart-types). Source : Roche/Rapport interne MHICC.....	30
Tableau III: Changements (% , avec moyennes et écart-types) après 1 an de traitement au dalcetrapib pour les valeurs de LDL-C, HDL-C et apoA-I pour la cohorte dal-PLAQUE 2 (Placebo n=462 Dalcetrapib n=474). Source : Roche/Rapport interne MHICC.....	31
Tableau IV: Valeurs des B_{max} et des K_D (moyennes, écarts-types et coefficients de variation) pour les cellules HepG2 lors de 3 essais d'efflux différents sur le pool de sérum #6.....	35
Tableau V: Valeurs des B_{max} et des K_D (moyennes, écarts-types et coefficients de variation) pour les cellules BHK-ABCA1 pour les conditions non-stimulée et stimulée avec mifepristone 20 nM ainsi que pour la composante ABCA1-dépendante calculée lors des 4 essais d'efflux différents sur les pools de sérum #6 et SA1..	36
Tableau VI: Valeurs des B_{max} et des K_D (moyennes, écarts-types et coefficients de variation) pour les cellules J774 pour les conditions non-stimulée et stimulée avec AMPc 0.3 mM lors de 3 essais d'efflux différents sur les pools de sérum #6 et SA1.....	37
Tableau VII: Description des différents produits utilisés pour les essais d'efflux, compagnie de provenance, numéro de catalogue et concentration initiale	39
Tableau VIII: Synthèse des conditions utilisées pour la culture cellulaire et les essais d'efflux de cholestérol pour les trois types de cellules utilisées dans le cadre de la sous-étude DP2.....	39
Tableau IX: Caractéristiques démographiques pour la cohorte de l'étude pour les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).....	40
Tableau X: Maladies concomitantes présentes chez la cohorte de la sous-étude dal-PLAQUE2 au baseline dans les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).	41

Tableau XI: Classes des différentes médications concomitantes prescrites chez la cohorte de l'étude au baseline dans les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).	42
Tableau XII: Changements après 1 an (en %) de l'activité de la CETP chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=122) et le groupe Placebo (n=142).....	43
Tableau XIII: Changements après 1 an (en %) des différents lipides mesurés chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).....	43
Tableau XIV: Changements après 1 an (en %) des différentes données biochimiques mesurées chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).....	44
Tableau XV: Changements après 1 an (en %) des masses de LCAT et MPO mesurées par ELISAs chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).....	45
Tableau XVI: Changements après 1 an (en %) de différentes valeurs mesurées du profil RMN chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=179) et le groupe Placebo (n=178).....	46
Tableau XVII: Coefficients de variation (CV) globaux de la capacité d'efflux de cholestérol des sujets de la cohorte Biobanque avant et après normalisation avec le sérum témoin selon les trois modèles cellulaires utilisés.	47
Tableau XVIII: Changements absolus après 1 an de traitement au dalcetrapib des capacités d'efflux des trois modèles cellulaires utilisés pour la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).....	48
Tableau XIX: Changements absolus après 1 an de traitement de la valeur de cIMT (tous les segments et carotides communes) pour les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).....	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Voies métaboliques des HDL et du TIC chez l'humain. Les macrophages peuvent effluer du FC via les transporteurs ABCA1, ABCG1 et SR-BI vers les différentes sous-classes de HDL. Les EC transportés par les HDL peuvent être captés par le foie via le récepteur SR-BI, constituant la voie directe du TIC. La voie indirecte du retour au foie des EC, la plus importante du TIC, se fait via les LDL captés par le LDLr au niveau hépatique, les EC étant échangés contre des TG entre les HDL et les LDL par la CETP	7
Figure 2: Étapes du développement d'une plaque athéromateuse instable à partir de la dysfonction endothéliale	10
Figure 3: Structures chimiques des inhibiteurs de CETP discutés dans cet ouvrage (tirée de Liu et al, 2012).....	15
Figure 4: Schéma simplifié de notre modèle d'efflux pour les cellules HepG2, J774 et BHK-ABCA1 avec les étapes principales.	23
Figure 5: Schéma de l'étude dal-PLAQUE2 tel que planifiée lors de la mise en place du protocole clinique. Source : Roche/Rapport interne MHICC.	28
Figure 6: Diagramme de sélection des participants à la sous-étude (PCB n=193 et DAL n=186) à partir de la cohorte dal-PLAQUE2 (n=988) selon la disponibilité des prélèvements sériques ainsi que de l'imagerie carotidienne (calcul de la cIMT) au baseline et après 1 an de traitement.	34
Figure 7: Courbe concentration-effet effectuée avec différentes concentrations du pool de sérum humain #6 déplété en apoB (0%; 1,4%; 2,8%; 4,2%; 5,6%; 7,0%; 9,8%; 14,0%) lors d'essai d'efflux de cholestérol sur les cellules HepG2 (moyenne de 3 expériences).	35
Figure 8: Courbe concentration-effet effectuée avec différentes concentrations des pools de sérum humain #6 et SA1 déplétés en apoB (0%; 0,35%; 0,7%; 1,4%; 2,8%; 5,6%; 7,0%; 9,8%) lors d'essai d'efflux de cholestérol sur les cellules BHK-ABCA1 (moyenne de 4 expériences).	36
Figure 9: Courbe concentration-effet effectuée avec différentes concentrations des pools de sérum humain #6 et SA1 déplétés en apoB (0%; 0,35%; 0,7%; 1,4%; 2,8%; 5,6%; 7,0%; 9,8%) lors d'essai d'efflux de cholestérol sur les cellules J774 (moyenne de 3 expériences).	37
Figure 10: Corrélation entre la capacité d'efflux de cholestérol des cellules HepG2 et la valeur de HDL-C au baseline (n=379, PCB et DAL).....	54

Figure 11: Corrélations entre les concentrations des sous-classes de particules HDL (grosses, moyennes et petites) et les capacités d'efflux de cholestérol des cellules HepG2 au baseline (n=379, PCB et DAL).	55
Figure 12: Corrélations entre les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules BHK-ABCA1 et les valeurs de HDL-C à baseline (n=356, PCB et DAL).	56
Figure 13: Corrélations entre les concentrations des sous-classes de particules HDL (grosses, moyennes et petites) et les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules BHK-ABCA1 au baseline (n=356, PCB et DAL).	57
Figure 14: Corrélations entre les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules J774 et les valeurs de HDL-C au baseline (n=379, PCB et DAL).	58
Figure 15: Corrélations entre les concentrations des sous-classes de particules HDL (grosses, moyennes et petites) et les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules J774 au baseline (n=379, PCB et DAL).	59
Figure 16: Incidence cumulative des événements cardiovasculaires pour les groupes dalcetrapib et placebo séparément et stratifiés par les trios génotypes du SNP rs1967309 dans le gène ADCY9 (tiré de Tardif et al, 2015).	63

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- 18F-FDG-PET : tomographie à émission de positron suivant un marquage au 18F-fluorodésoxyglucose
- ABC : *ATP-binding-cassette*
- ACAT2 : acétyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase 2
- ALT (SGPT) : alanine aminotransférase (sérum glutamopyruvate transférase)
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- Apo : apolipoprotéine
- apoA-I : apolipoprotéine A-I
- AST (SGOT) : aspartate aminotransférase (sérum glutamooxaloacétate transférase)
- CABG : *coronary artery bypass graft* (pontage coronarien)
- CAD : *coronary artery disease* (maladie coronarienne)
- CEC : capacité d'efflux de cholestérol
- CETP : *cholesterol ester transfer protein* (glycoprotéine hydrophobe de transfert des esters de cholestérol)
- CETPi : inhibiteurs de CETP
- cIMT : *carotid intima-media thickness* (épaisseur de l'intima-media carotidienne)
- CM : chylomicrons
- CML : cellules musculaires lisses
- CPK : créatine phosphokinase
- DAL : dalcetrapib
- Dal-HEART : dalcetrapib HDL Evaluation, Atherosclerosis & Reverse cholesterol Transport Program
- DP2 : dal-PLAQUE2
- EC : esters de cholestérol
- eGFR : *estimated glomerular filtration rate* (taux de filtration glomérulaire estimé)
- ET-1 : endothéline-1
- FC : *free cholesterol* (cholestérol libre)
- FMD : *flow mediated dilatation* (vasodilatation dépendante du flux sanguin)
- GC : Génome Canada
- HbA1c : hémoglobine glyquée
- HDL : *high density lipoprotein* (lipoprotéines de haute densité)
- HDL-C : *high density lipoprotein cholesterol* (cholestérol lié aux HDL)
- HDL-P : *high density lipoprotein particles* (particules de HDL)

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HMG-CoAr : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase
HTA : hypertension artérielle
IM : infarctus du myocarde
IMC : indice de masse corporelle
IRM : imagerie par résonance magnétique
IVUS : *intravascular ultrasound* (échographie intravasculaire)
 K_D : constante de dissociation
LAL : lipase acide lysosomale
LCAT : lécithine cholestérol acyl transférase
LDL : *low density lipoprotein* (LP de faible densité)
LDL-C : *low density lipoprotein cholesterol* (cholestérol lié aux LDL)
LDL-P : *low density lipoprotein particles* (particules de LDL)
LDLr : récepteur LDL
LP : lipoprotéines
LPL : lipoprotéine lipase
LXR : *liver X receptor* (récepteur nucléaire des oxystérols)
MAPA : mesure ambulatoire de la pression artérielle
MCAS : maladie coronarienne athérosclérotique
MCV : maladie cardiovasculaire
MPO : myéloperoxydase
NO : oxyde d'azote
NPC1 : *Niemann-Pick type C1 protein* (protéine membranaire intégrale Niemann-Pick type C1)
NPC1L1 : *Niemann-Pick type C1-like 1 protein* (protéine Niemann-Pick type C1-like 1)
PCB : placebo
PCSK9 : proprotéine convertase subtilisine kexine 9
PL : phospholipides
PON1 : paraoxonase-1
PPAR α : *peroxisome proliferator-activated receptor α* (récepteur α activé par les proliférateurs des péroxisomes)
RCT : *reverse cholesterol transport*
RE : réticulum endoplasmique
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROS : *reactive oxygen species* (dérivés réactifs de l'oxygène)

RXR : *retinoid X receptor* (récepteur X des rétonoïdes)
QCA : *quantitative coronary angiography* (angiographie coronarienne quantitative)
S1P : *membrane-bound serine protease* (protéase à serine liée à la membrane)
S2P : *membrane-bound zinc metalloprotease* (métalloprotéase au zinc liée à la membrane)
SCA : syndrome coronarien aigu
SCAP: *SREBP-Cleavage-Activating-Protein* (proteïn activatrice du clivage de SREBP)
SR-BI: *scavenger receptor type B class I* (récepteur éboueur de type B classe I)
SREBP : *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (proteïn liant l'élément régulateur des sterols)
TG : triglycérides
TIC : transport inverse du cholestérol
TPA : *total plaque area* (aire totale de la plaque)
TPV : *total plaque volume* (volume total de la plaque)
ULN : *upper limit of normal* (limite supérieure de la normale)
VLDL : *very low density lipoprotein* (LP de très basse densité)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Jean-Claude Tardif, ainsi que mon co-directeur, Dr Eric Rhéaume, pour leur soutien et pour avoir rendu cette étude possible. Cela m'a permis de développer mon esprit scientifique, d'élargir mes compétences professionnelles et de relier mes connaissances biologiques, scientifiques, infirmières et cliniques.

Je remercie également Dr David Rhinds, superviseur du projet et responsable de l'équipe métabolique, pour son accompagnement durant toutes les étapes de cette aventure, sa compétence inégalée dans le domaine et ses conseils précieux. Ce fut un plaisir de travailler avec lui, il a su comment m'aider à développer des liens entre les domaines clinique et fondamental.

J'adresse encore ma grande gratitude à: Dr Joel Lavoie, pour le travail en laboratoire clinique et le traitement des échantillons plasmatiques ainsi qu'à Marie-Claude Guertin et son équipe, particulièrement Malorie Chabot-Blanchet et Clifford Ekwempe pour les analyses statistiques.

Je tiens à remercier les équipes de recherche clinique et fondamentale de Dr Jean-Claude Tardif pour leur implication respective. D'abord, un merci spécial à Colette Morin, chef d'équipe de recherche clinique, pour avoir allégé mes tâches et ma présence au bureau durant la période de manipulations au laboratoire. Également, je remercie tous les membres du laboratoire de recherche fondamentale pour leur accueil chaleureux et la disponibilité de tous pour un soutien sans égal, à tous les niveaux. Je tiens à remercier spécialement Mathieu Brodeur, qui m'a accompagnée et guidée lors des manipulations initiales au laboratoire et m'a éclairée lors de questionnements scientifiques ainsi que Marie Boulé et Sonia Alem pour leur expérience et aide inégalées au laboratoire, avec qui les manipulations principales ont été réalisées de manière très agréable et efficace et sans qui je n'aurais pu réaliser ce projet dans un délai réaliste.

Finalement, un gros merci à mon conjoint Jean-François pour sa patience et sa compréhension face aux heures passées devant l'ordinateur durant les derniers mois de rédaction; et à ma petite fille Emi qui m'a accompagnée *in* et *ex utero* durant cette même période.

INTRODUCTION

1. Cholestérol - Définition

Chez les animaux, les différents lipides jouent des rôles multifonctionnels. Par exemple, les phospholipides (PL) et le cholestérol composent la membrane cellulaire. Les acides gras, stockés et transportés majoritairement sous forme de triglycérides (TG), peuvent être oxydés dans la mitochondrie afin d'en libérer l'énergie (Lodish et al, 2003; Eberlé et al, 2004). Le cholestérol est précurseur des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes (Brown et Goldstein, 1986). Les vitamines liposolubles A, D, E et K ainsi que plus de 23 000 autres composés biologiques sont dérivées des précurseurs de la biosynthèse du cholestérol (Lodish et al, 2003). Contrairement aux autres types de lipides, le cholestérol ne peut être utilisé directement comme source d'énergie: son catabolisme implique sa conversion en d'autres molécules biologiquement actives. Il est directement ou indirectement relié à plusieurs fonctions biologiques, pour ne nommer que la signalisation cellulaire, la morphogenèse, la réponse au stress et aux métabolismes du phosphore et calcium (Cortes et al, 2013). Non seulement le cholestérol est impliqué dans diverses pathologies telles que les démences, le cancer ou le diabète, il joue un rôle indiscutable dans le développement des maladies cérébro et cardiovasculaires (Ikonen, 2008). Chez les mammifères, 60 à 80% du cholestérol cellulaire se trouve dans la membrane plasmique (où il constitue 20-25% des lipides totaux) tandis que seulement 1% compose la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Une variation de la concentration de cholestérol dans la membrane semble contrôler plusieurs fonctions reliées à cette organelle ainsi que le transport membranaire du RE vers l'appareil de Golgi (Lodish et al, 2003; Ikonen, 2008; Cortes et al, 2013).

2. Gestion cellulaire des niveaux de cholestérol

Afin d'accomplir ses activités spécifiques, la cellule doit maintenir un niveau adéquat de cholestérol intracellulaire. La gestion des niveaux de cholestérol est un processus très bien contrôlé par plusieurs protéines et mécanismes régulateurs. Les deux sources de cholestérol disponibles pour la cellule afin de combler un niveau trop bas sont l'import de cholestérol alimentaire (30%) et la synthèse *de novo* par le foie (70%) (Ikonen, 2008). Ces valeurs peuvent varier entre les individus selon leur bagage génétique et leur alimentation (Eberlé et al, 2004; Ikonen, 2008). Quand les niveaux de cholestérol intracellulaire sont trop élevés, la cellule peut stocker, exporter ou effluer le cholestérol en surplus. L'efflux de cholestérol par les macrophages (et une multitude de types cellulaires) est la première étape du transport inverse du cholestérol (TIC, ou *reverse cholesterol transport*, RCT). Ce concept, d'abord proposé par Glomset (1968), stipule que l'excès de cholesté-

rol dans les tissus périphériques est transporté vers le foie pour son excrétion biliaire par les lipoprotéines (LP) de haute densité (HDL – *high density lipoprotein*) et ses sous-fractions (voir Figure 1).

Comme les lipides sont hydrophobes, ils sont transportés dans les lipoprotéines, consistant en une coquille externe composée d'apolipoprotéines (apoA, apoB, apoC et/ou apoE) et d'une monocouche phospholipidique contenant du cholestérol. Les apolipoprotéines aident à organiser la structure de la LP et à déterminer ses interactions avec les enzymes, les protéines de transfert extracellulaires et les récepteurs de surface cellulaires. Il y a 4 classes de LP, classées ici en ordre croissant de densité et décroissant de taille : les chylomicrons (CM), les LP de très basse densité (VLDL – *very low density lipoprotein*), les LP de faible densité (LDL – *low density lipoprotein*) et les HDL. Une seule copie de l'apoB-100 se trouve sur les VLDL et LDL, une seule copie de l'apoB-48 se retrouve sur le CM, aucune copie de apoB se retrouve sur HDL, apoA est retrouvée sur CM et HDL, apoC et apoE sur CM, HDL et VLDL (Pownall et Gotto, 1999). Au centre de la LP se trouvent des centaines de lipides neutres, soit des TG, soit des esters de cholestérol (EC) ou les deux. Les CM et VLDL transportent majoritairement des TG tandis que les LDL et HDL contiennent plus d'EC, dont 70% se trouve dans les LDL (Lodish et al, 2003).

2.1 Combler des niveaux trop bas

2.1.1 Entrée de cholestérol alimentaire

Du cholestérol libre (*free cholesterol* - FC) peut être capté au niveau du foie par la protéine Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) qui possède un domaine sensible aux stérols et que l'on retrouve normalement associée à l'endosome hépatique chez les humains. Cette protéine, retrouvée aussi à la surface apicale des entérocytes, joue un rôle indiscutable dans la captation du cholestérol libre plasmatique lorsqu'elle est relocalisée à la surface des hépatocytes en situation de déplétion de cholestérol (Yu et al, 2006; Ikonen, 2008).

Le cholestérol alimentaire, une fois solubilisé par les sels et acides biliaires, est absorbé via la NPC1L1 des entérocytes. Il est ensuite empaqueté sous forme d'EC et de TG dans un CM et est libéré via la membrane basale afin d'entrer dans la circulation lymphatique puis plasmatique (Ikonen, 2008). L'enzyme lipoprotéine lipase (LPL), retrouvée à la surface luminale des cellules endothéliales capillaires, hydrolyse les CM et les VLDL et permet la libération des acides gras et du glycérol qui seront utilisés par les muscles ou stockés sous formes de TG dans le tissu adipeux (Tortora et Grabowski, 1999; Lodish et al, 2003). Les remnants des CM, soit les EC et les apoprotéines

restantes, sont captés par le foie soit de façon sélective via le *scavenger receptor type B class I* (SR-BI) ou par endocytose des LP complètes contenant apoB ou apoE via le récepteur LDL (LDLr) (Lodish et al, 2003). Ce dernier peut alors resécréter le cholestérol dans la circulation sous forme de VLDL qui seront hydrolysées par la LPL en LDL. Ce cholestérol, provenant initialement de l'alimentation, est finalement disponible pour la cellule qui en fera l'import. On parle alors d'influx ou captation de cholestérol (Ikonen, 2008).

2.1.1.a SR-BI

SR-BI, glycoprotéine membranaire intégrale exprimée par toutes les cellules mais surtout par les cellules productrices d'hormones stéroïdiennes et les hépatocytes, permet au foie d'atteindre de hauts niveaux de captation d'EC provenant des HDL circulantes (HDL-C – cholestérol lié aux HDL) matures (voie directe du retour au foie du TIC). Le mécanisme derrière ce processus n'est pas encore clair, mais pourrait impliquer l'hémifusion de la monocouche phospholipidique de la LP avec la couche externe de la membrane cellulaire, sans internalisation de la LP pour la majorité des cellules (Rigotti, Miettinen & Krieger, 2003; Leiva et al, 2011; Soran et al, 2012). Par contre, l'internalisation d'holoparticules de HDL peut être observée dans la prise d'EC sous certaines conditions par quelques types cellulaires, par exemple les cellules LdIA7-CHO surexprimant SR-BI humain (Zhang et al, 2007).

2.1.1.b Récepteur LDL

L'apport de cholestérol extracellulaire peut aussi se faire via le LDLr, protéine de 860 résidus présente sur toutes les cellules mais en majorité sur les hépatocytes (Lodish et al, 2003; Ikonen, 2008). Le LDLr peut lier l'apoB-100 contenue dans les LDL et VLDL et l'apoE contenue dans les CM et les HDL (Ikonen, 2008). Ce complexe LP/LDLr ou CM/LDLr est endocyté par l'entremise des puits tapissés de clathrine et un endosome précoce se forme. L'acidification du pH de l'endosome cause la dissociation du LDLr et de l'apoB/apoE, puis le LDLr est recyclé à la surface afin de lier d'autres apoB/apoE (Lodish et al, 2003; Goldstein et Brown, 1974). Les EC de la LP internalisée seront hydrolysés en FC par la lipase acide lysosomale (LAL). Ces FC seront dirigés vers d'autres organelles ou membranes cellulaires par l'action de la protéine membranaire intégrale Niemann-Pick C1 (NPC1), située dans la membrane du *late* endosome/lysosome et possédant aussi un domaine sensible aux stérols (Lodish et al, 2003; Cortes, 2013). Les surplus de FC seront estérifiés par l'acétyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase 2 (ACAT2) et stockés dans les gouttelettes lipidiques ou réintégrés dans les VLDL/CM chez les hépatocytes/entérocytes respectivement (Burnett et al, 1999; Rader et al, 2003; Ikonen, 2008).

2.1.2 Synthèse *de novo*

Presque toutes les cellules peuvent synthétiser *de novo* du cholestérol à partir de l'acétyl-coA (Ikonen, 2008; Cortes et al, 2013). Cette synthèse implique l'action de plus de 30 enzymes dont l'étape limitante dépend de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoAr), ancrée dans la membrane du RE, qui transforme HMG-CoA en mévalonate dans le cytosol car ils sont hydrosolubles (Lodish et al, 2003; Ikonen, 2008; Cortes et al, 2013). Cette synthèse débute par la protéolyse intramembranaire régulée, soit le clivage protéolytique du facteur de transcription SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) afin d'en générer des facteurs de transcription actifs ou nSREBP (Brown & Goldstein, 1999; Rawson, 2003; Sato, 2010). SREBP est intégré dans la membrane du RE par deux domaines transmembranaires hydrophobes unis par une boucle de 30 acides aminés se projetant dans la lumière du RE et possède un motif liant l'ADN à son extrémité N-terminale (Yokoyama et al, 1993; Sato et al, 1994; Brown & Goldstein, 1999). Son extrémité C-terminale est liée à l'extrémité C-terminale de SCAP (SREBP-Cleavage-Activating-Protein), autre protéine membranaire du RE servant d'escorte à SREBP. SCAP change de conformation suite à la liaison du cholestérol sur son domaine sensible aux stérois situé à l'extrémité N-terminale, permettant sa liaison réversible à Insig, protéine membranaire du RE comportant aussi un domaine sensible aux stérois et servant d'ancrage au complexe SREBP-SCAP, inhibant ou permettant ainsi leur déplacement vers le Golgi (Brown et Goldstein, 1999; Lodish et al, 2003; Foulle et al, 2005; Yang, 2002; Ikonen, 2008).

Quand les niveaux intracellulaires de cholestérol sont bas, le complexe SREBP-SCAP peut être intégré dans les vésicules COP-II (*coat protein complex II* – vésicules tapissées d'un complexe de protéines permettant le bourgonnement de la membrane du RE) et relocalisé vers le Golgi. La protéolyse intramembranaire régulée prend place : S1P (*membrane-bound serine protease*) coupe SREBP dans la boucle luminale, puis S2P (*membrane-bound zinc metalloprotease*) coupe l'extrémité N-terminale. nSREBP migre vers le noyau et se lie aux SRE de plus de 30 gènes cibles des synthèse et capture de cholestérol (dont LDLr), des acides gras, des TG et des PL (Brown & Goldstein, 1997; Rawson et al, 1997; Sakai et al, 1998; Eberlé et al, 2004; Sato, 2010).

2.2 Faire diminuer des niveaux trop hauts

Une accumulation de FC facilite sa transformation en oxystérois toxiques (tels 25-hydroxycholestérol and 7-kétocholestérol) qui inhibe à son tour l'efflux de FC et l'estérification par ACAT. Normalement, une des réponses adaptatives des macrophages est la production de phospholipides à partir du surplus de FC par l'enzyme limitante CTP:phosphocholine cytidyltransférase. Lorsque

ce mécanisme n'arrive plus à gérer le surplus de FC, les concentrations membranaires du RE et des mitochondries de FC augmentent. Une augmentation du ratio physiologique FC/PL diminue la fluidité membranaire et les fonctions des protéines membranaires intégrales peuvent être altérées. Certains domaines membranaires sont modifiés et la signalisation cellulaire associée s'en trouve perturbée. Lorsque ce ratio FC/PL est très élevé, des cristaux de cholestérol en forme d'aiguille se forment, dérangeant physiquement l'intégrité des structures intracellulaires. Tout ceci résulte en l'activation d'une série de voies apoptotiques chez les macrophages, particulièrement la voie mitochondriale et la voie Fas, en plus d'une accumulation de la protéine pro-apoptotique Bax. Tous ces mécanismes cytotoxiques favorisent le développement de lésions athérosclérotiques (Tabas, 2002).

2.2.1 Stockage

Le FC est estérifié en EC soit par ACAT1, exprimée par les macrophages et plusieurs autres types cellulaires, ou ACAT2 chez les entérocytes et les hépatocytes humains, puis emmagasiné dans des gouttelettes lipidiques (Chang et al, 2001; Cortes et al, 2013). Les macrophages contenant une bonne quantité de ces gouttelettes visibles sous microscope peuvent se développer en cellules spumeuses impliquées dans le développement de l'athérosclérose (Lodish et al, 2003).

2.2.2 Sécrétion

Le cholestérol peut être sécrété via ABCG5/8 situé à la membrane apicale du canalicule biliaire. ABCG5/8, formé des hémitransporteurs ABCG5 et ABCG8, fait partie de la famille ABC (*ATP-binding-cassette*). La famille des transporteurs ABC comprend plus de 250 membres. Ils sont composés de 2 domaines cytosoliques liant et hydrolysant l'ATP ainsi que de deux domaines transmembranaires, mobilisé par l'hydrolyse de l'ATP, permettant le transport de molécules au travers de la membrane (Scott et al, 2012). Le motif ABC s'étend sur environ 120 acides aminés. Ce motif est composé de trois domaines nommés Walker A, C-loop (domaine distinguant les transporteurs ABC des autres protéines liant l'ATP) et Walker B (Baldán et al, 2009). Les acides biliaires, le cholestérol et les PL s'assemblent en micelles et forment la bile qui solubilisera le cholestérol alimentaire dans l'intestin. Ultiment, une partie des acides biliaires et du cholestérol sera éliminé dans les selles (Ikonen, 2008; Khera et Rader, 2010; Cortes et al, 2013).

2.2.3 Efflux

Les transporteurs ABC sont des régulateurs-clés de l'efflux de cholestérol. Non seulement les macrophages et hépatocytes, mais aussi les autres types cellulaires, expriment ubiquitairement le

transporteur ABCA1, permettant la lipodation de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I), protéine essentielle à la formation des HDL et sécrétée majoritairement par le foie (70%) et le petit intestin (30%). Avec l'ajout de FC et de PL par ABCA1, l'apoA-I se développe en préβ-HDL discoïdale et évite ainsi d'être catabolisée par les reins. Ensuite, l'enzyme plasmatique lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) estérifie le FC en EC hydrophobes, faisant gonfler le cœur de la HDL en formation, créant ainsi un gradient unidirectionnel de FC des cellules vers les accepteurs HDL favorisant l'efflux (Ikonen, 2008; Tall et al, 2008; Calabresi et al, 2009; Santos-Gallego et al, 2011; Soran et al, 2012).

Deux autres transporteurs très présents sur les macrophages sont ABCG1, qui permet de lipider encore plus la préβ-HDL formée afin d'organiser des HDL plus grosses évoluant vers HDL₃ et HDL₂ et le SR-BI, qui joue aussi un rôle de lipodation sur les HDL matures (Rigotti, Miettinen & Krieger, 2003). Dans le plasma, les EC des HDL peuvent être échangés, par l'action de la glycoprotéine hydrophobe de transfert des esters de cholestérol (CETP), contre des TG des LP riches en TG, soit les VLDL et CM. Une fois ces transporteurs modifiés enzymatiquement par la LPL en LDL et remnants, ils sont captés par LDLr (principalement) ou SR-BI au niveau hépatique et les EC provenant initialement des HDL sont éliminés de la circulation (voie indirecte du TIC) (Santos-Gallegos et al, 2008; Soran et al, 2012).

La portée de tous ces processus de régulation est le flux net, soit la différence entre l'entrée et la sortie de cholestérol. Il en résulte soit une déplétion nette, un bilan neutre ou une accumulation nette, telle qu'observée chez les cellules spumeuses athérogènes (Kellner-Weibel et al, 2010).

haut taux de LDL-C est l'élément clé permettant aux facteurs de risque modifiables (hypertension, tabac, diabète, syndrome métabolique, inactivité physique, obésité, manque de sommeil, infection aiguë) d'amorcer le développement de l'athérosclérose (Libby, 2002; Rajendran et al, 2013). Les radicaux libres produits par ces facteurs de risque altèrent l'équilibre d'oxyde d'azote (NO) et endommagent l'endothélium, favorisant ainsi une diminution de sa vasodilatation, un état proinflammatoire, des propriétés prothrombotiques et une augmentation de sa perméabilité (Rajendran et al, 2013).

3.2 Physiopathologie

Une accumulation plasmatique de LDL-C augmente aussi son temps de circulation, favorisant les modifications chimiques naturelles athérogènes (Abifadel et al, 2012). L'oxydation des particules LDL par les ROS (*reactive oxygen species*) produites par les cellules endothéliales, entre autres, est observée dans l'athérosclérose *in vitro* et *in vivo*; on parle alors de LDLox. L'échec des thérapies antioxydantes dans la prévention de l'athérosclérose démontre que d'autres causes participent au développement de la maladie. En effet, la glycation, soit la formation d'un lien entre le glucose plasmatique et les résidus lysines exposés de l'apolipoprotéine B, est très présente sur les LDL et accompagne l'oxydation : on parle alors de glycoxydation (Soran et Durrington, 2011). Vu leur petit diamètre (18-25 nm), les particules LDL intactes traversent aisément l'endothélium artériel par transcytose (Fogelstrand et Borén, 2012). Elles seront modifiées dans l'intima (oxydation, lipolyse, protéolyse et/ou aggrégation) et seront phagocytées à leur tour, participant au phénomène inflammatoire (Lusis, 2000). Comme la captation des LDLox par le LDLr est diminuée, ces particules migrent facilement dans l'intima de la paroi artérielle (Santos-Gallego et al, 2008; Soran et al, 2012). Une fois dans la paroi, des sites chargés positivement exposés des particules LDL (modifiées ou non) se lient aux chaînes glycosaminoglycanes chargées négativement des protéoglycanes de la matrice (Santos-Gallego et al, 2008; Fogelstrand et Borén, 2012; Soran et al, 2012). Deux facteurs favorisent la phagocytose des particules LDL par les monocytes et les macrophages : 1) la liaison de l'apoB à la protéoglycane induisant un changement de conformation de la lipoprotéine et 2) les modifications des particules LDL par les résidus oxydatifs produits par les cellules environnantes (Fogelstrand et Borén, 2012). La phagocytose est médiée par des récepteurs éboueurs ayant pour mission de reconnaître les molécules détériorées, entre autres (Younis et al, 2009).

Une fois activés, les monocytes et/ou macrophages sécrètent des médiateurs de l'inflammation (IL-1, TNF- α) qui favorisent l'expression de récepteurs d'adhésion cellulaire favorisant la fixation

de la cellule à la matrice extracellulaire éboueurs reconnaissant les LDLox par les macrophages et le relâchement d'endothéline-1 (ET-1) par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML) (Lusis, 2000; Rajendran et al, 2013). L'ET-1 joue plusieurs rôles dans l'athérogenèse : 1) elle favorise la chimioattraction des monocytes, 2) elle active les macrophages qui sécrètent des médiateurs de l'inflammation à leur tour, 3) elle stimule la migration des CML, 4) elle augmente la prolifération des fibroblastes et leur production de matrice, 5) elle augmente l'adhérence plaquettaire. La dysfonction endothéliale en résultant cause l'instabilité de la plaque athéromateuse (Rajendran et al, 2013). Comme l'activité des récepteurs éboueurs n'est pas régulée à la baisse par un mécanisme de rétroaction négative puisqu'il ne joue aucun rôle exclusif dans le métabolisme cellulaire du cholestérol, il en résulte une accumulation massive d'EC dans des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques menant à la formation de cellules spumeuses. Cette accumulation d'EC stimule l'activité de CYP27A1, enzyme permettant la formation de 27-hydroxycholestérol qui active à son tour la voie du récepteur nucléaire des oxystérols (*liver X receptor* - LXR; décrit à la section 3.3.6) et donc l'expression d'ABCA1 et ABCG1, augmentant l'efflux de ce cholestérol (Denis et al, 2003; Souidi et al, 2004; Tall et al, 2008). Ce mécanisme protecteur fait son temps et on voit finalement apparaître des stries lipidiques dans la paroi artérielle, la première étape de l'athérosclérose. L'étape suivante consiste en l'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima, la prolifération des CML et la migration de ces dernières de la média vers l'intima. Les CML produisent de la matrice extracellulaire, peuvent absorber du cholestérol et développer des gouttelettes lipidiques au point de devenir cellules spumeuses à leur tour. Les stries lipidiques évoluent alors en plaques athérosclérotiques ou athéromateuses (Ross, 1993) (voir Figure 2).

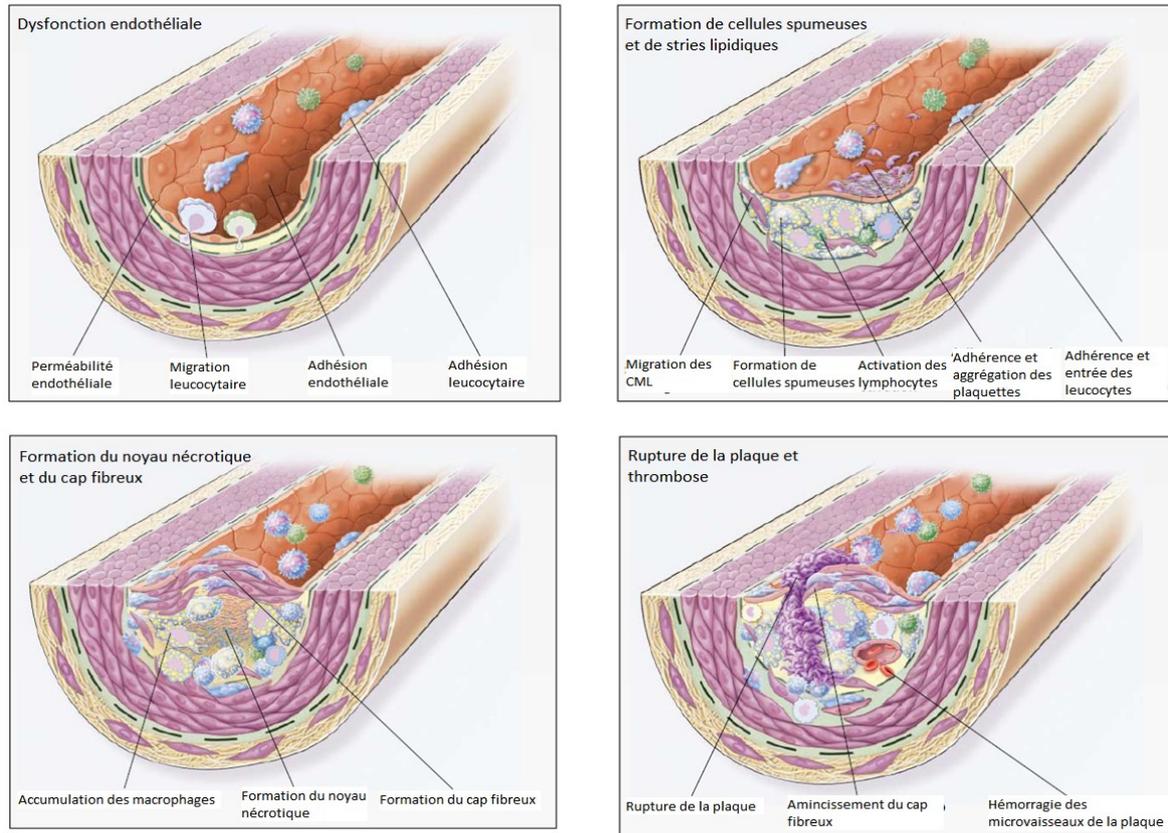


Figure 2 : Étapes du développement d'une plaque athéromateuse instable à partir de la dysfonction endothéliale. (traduit de Ross R, *The new England J Med.*, 340:115-126 (1999))

Les macrophages spumeux se trouvant au centre de la plaque meurent, par apoptose ou nécrose, n'arrivant plus à expulser le cholestérol hors de la paroi artérielle. Le cholestérol intracellulaire et des substances inflammatoires, telles que le facteur tissulaire favorisant la coagulation et des métalloprotéases digérant la matrice, sont relâchées, rendant la plaque plus vulnérable à la rupture (Santos-Gallego et al, 2008; Tabas, 2002). On parle de noyau nécrotique (Falk, 2006). La présence de cristaux de cholestérol marque le développement de la plaque vers un stade plus avancé, avec des changements au niveau de la média et de l'adventice. La lésion progresse vers le fibroathérome, éventuellement recouvert d'une chape fibreuse composé de CML ayant migrées et de collagène (Santos-Gallego et al, 2008).

À mesure que la plaque se développe, elle s'étend vers la lumière de l'artère diminuant ainsi l'aire permettant au sang de passer. Les cellules et organes situés en aval de la plaque reçoivent moins d'oxygène et de nutriments, phénomène appelé ischémie. Si le blocage est important au niveau d'une coronaire, cela cause de la douleur nommée angine. S'il y a rupture de la plaque, un caillot de plaquettes et de fibrine peut se former, obstruant partiellement ou totalement l'artère. On

parle alors d'ischémie hypoxique car les réserves de nutriments des cellules déplétées s'épuisent et l'apport d'oxygène est insuffisant, pouvant mener à la mort cellulaire et la perte de fonction du tissu. La sévérité des dommages causés dépend de la durée de l'occlusion et de la zone atteinte. L'occlusion d'une coronaire peut mener à un infarctus du myocarde (IM), l'occlusion d'une artère carotide à un accident vasculaire cérébral de type ischémique (Lusis, 2000; Lodish et al, 2003) et l'occlusion d'une artère périphérique peut mener au développement de la maladie artérielle périphérique (Smeltzer et Bare, 2004).

3.3 Normes de soins et nouvelles thérapies

D'après Statistiques Canada (2009), la valeur de cholestérol total souhaitée chez les 20-79 ans est inférieure à 5,2 mmol/L et la valeur LDL-C est de 3,5 mmol/L et moins. En 2013, l'*American Heart Association* et l'*American College of Cardiology* ont développé un outil (2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults) permettant de guider l'initiation d'un traitement aux statines selon des valeurs cibles de LDL-C afin de prévenir l'athérosclérose : les patients ≥ 21 ans présentant une valeur de LDL-C $> 4,9$ mmol/L (190 mg/dl) devraient être traités avec une forte dose de statines; les patients diabétiques (40-75 ans) présentant des valeurs entre 1,8 mmol/L et 4,9 mmol/L (70-189 mg/dl) devraient être traités avec des doses modérées de statines et les non diabétiques (40-75 ans) devraient voir leur risque de développer l'athérosclérose réévalué tous les 4-6 ans. De plus, la notion de risque résiduel implique que certains patients sont à risque de vivre un événement cardiovasculaire conséquemment à un bas taux de HDL-C ou à une hypertriglycémie, malgré un bas taux de LDL-C (Rhoads et al, 2012a).

3.3.1 Angioplastie

Lorsque les lésions athérosclérotiques causent de l'ischémie aux tissus en aval de la sténose, les interventions mécaniques largement utilisées permettant une reperfusion des tissus lésés sont la dilatation coronarienne, l'installation de tuteurs endovasculaires métalliques (*stents*) ou le pontage coronarien, selon l'avancement de la maladie. N'oublions pas que cette condition chronique progresse plus ou moins vite, selon le niveau de contrôle des facteurs de risque, et qu'il peut y avoir resténose de la lésion ou développement de nouvelles sténoses (Smeltzer et Bare, 2004; Soran et al, 2012).

3.3.2 Statines

Les statines sont les médicaments les plus efficaces et populaires dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Six différentes statines sont utilisées couramment: atorvastatine, rosuvastatine, simvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine. Elles se lient à l'enzyme HMG-CoAr et inhibent directement son activité, diminuant la synthèse *de novo* du cholestérol et conséquemment le niveau intracellulaire de cholestérol hépatique. La voie SREPB est activée et l'expression de LDLr, entre autres, est augmentée, permettant à la cellule de capter plus de cholestérol plasmatique (Lodish et al, 2003; Cortes et al, 2013). Cela permet de garder les niveaux plasmatiques de LDL-C plus bas, diminuant ainsi le temps de circulation des lipoprotéines et donc les modifications chimiques naturelles athérogènes (Abifadel et al, 2012). Avec l'utilisation des statines dans le traitement de l'athérosclérose, une diminution de 1 mmol/L de LDL-C plasmatique, peu importe la valeur initiale, est associée à une diminution d'environ 20% du risque CV, jusqu'à un maximum d'environ 63% (Lehne, 2007; Sampson et al, 2012; NHLBI, 2014).

3.3.3 Inhibiteurs de PCSK9

La proprotéine convertase subtilisine kexine 9 (PCSK9) est une protéase à sérine exprimée majoritairement au niveau du foie et des intestins faisant partie de la famille des proprotéines convertases. Elle inhibe naturellement le LDLr en augmentant sa dégradation, autant au niveau intracellulaire qu'extracellulaire. L'expression génique de PCSK9 et LDLr est activée par la voie SREBP et donc co-induite par les statines. Trois types d'inhibiteurs de PCSK9 ont été développés. D'abord, les oligonucléotides antisens (voie d'administration parentérale, intraveineuse ou sous-cutanée) diminuaient l'expression de façon notable mais les deux essais cliniques (SPC5001 et BMS-84442) ont été arrêtés sans explications en Novembre 2011 (Shen et al, 2013). Ensuite, de petits ARN interférents anti-PCSK9 encapsulés dans les liposomes (voie d'administration intraveineuse) ont été testés en phase I par deux compagnies pharmaceutiques différentes. Alnylam Pharmaceuticals n'a pas poursuivi les essais cliniques pour l'ALN-PCS malgré des baisses importantes de LDL-C et l'absence d'effets secondaires sérieux et Tekmira a suspendu l'essai en phase I pour le PRO-040201 sans donner d'explications (Shen et al, 2013). Finalement, des anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre PCSK9 (voie d'administration sous-cutanée) sont les plus avancés au niveau clinique. Les anticorps AMG145 et SAR236553/REGN727 sont présentement étudiés en essais cliniques de phase III sont présentement (Goedeke et Fernandez-Hernando, 2012; Rhinds et al, 2012b; Petrides et al, 2013).

3.3.4 Ezetimibe

L'ézetimibe, licencié par la FDA en 2002, se lie à NPC1L1 des entérocytes et bloque le transfert du cholestérol luminal vers l'intérieur de la cellule. Les baisses sériques subséquentes de LDL-C peuvent atteindre 20% lorsque l'ézetimibe est utilisé seul et jusqu'à 60% lorsqu'administré avec une statine (Taylor et al, 2009; Hayashi et Kawamura, 2013). Par contre, depuis quelques années, il est suggéré de l'utiliser prudemment car il serait associé à des dysfonctionnements du TIC par inhibition de SR-BI et à la progression de l'athérosclérose en inhibant partiellement ACAT causant une augmentation cytotoxique de FC (Kellner-Weibel et al, 1999; Taylor et al, 2009).

3.3.5 Résines

Les résines séquestrant les acides biliaires, telles que la cholestyramine, le colestipol et le colesevelam, sont non solubles et se lient aux acides biliaires dans la lumière intestinale, formant des complexes empêchant leur réabsorption par les entérocytes. Les complexes contenant du cholestérol sont excrétés dans les selles et l'arrêt du cycle entérohépatique des acides biliaires cause une diminution de niveau hépatocytaire d'acides biliaires et de cholestérol. Cette diminution favorise l'activité de l'enzyme clé dans la synthèse d'acides biliaires, 7 α -hydroxylase, et il en résulte une baisse des niveaux hépatocytaires de cholestérol et donc une activation de la voie SREBP et augmentation subséquente de l'expression de LDLr (Lehne, 2007).

3.3.6 Agoniste LXR

Le LXR, un récepteur nucléaire, s'hétérodimérise avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) pour former le complexe LXR/RXR qui se lie aux éléments de réponse LXR de l'ADN. Le LXR α , exprimé par les cellules ayant une grande activité métabolique (hépatocytes, adipocytes, macrophages), et le LXR β , exprimé de façon ubiquitaire, sont activés par des dérivés du cholestérol appelés oxystérols et induisent l'expression des gènes suivants : ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8, CETP, APOE, SREBP, CYP7A1, entre autres (Ikonen, 2008; Santos-Gallego et al, 2008; Calkin et Tontonoz, 2012; Cortes et al, 2013). Vu tous les effets sur les gènes favorisant le TIC, la mise au point d'agonistes LXR semblait une cible pharmacologique attirante dans le traitement de l'athérosclérose. Deux substances ont été l'objet d'études animales, GW3965 et T0901317 : malheureusement, comme elles ne sont pas spécifiques à l'un ou l'autre des LXR, l'hypertriglycéridémie et la lipogenèse hépatique favorisées par la stimulation du LXR α démontre la nécessité de développer des agonistes spécifiques à LXR β (Calkin et Tontonoz, 2012; Miao et al, 2004; Cortes et al, 2013).

3.3.7 Niacine

La niacine (vitamine B₃), ou acide nicotinique, a plusieurs effets augmentant le taux de cholestérol HDL. D'abord, la synthèse hépatique des TG est diminuée et la dégradation post-transcriptionnelle de l'apoB est augmentée, diminuant la sécrétion de VLDL et LDL (Kamanna et al, 2013). La niacine inhibe l'expression de la chaîne β de l'ATP synthase au niveau hépatique, diminuant ainsi le catabolisme de HDL sans affecter la synthèse d'apoA-I (Jin et al, 1997). Finalement, comme la transcription de l'ABCA1 est augmentée, la lipidation d'apoA-I diminue son catabolisme prématuré lorsqu'elle est non lipidée. L'acide nicotinique peut diminuer le taux LDL-C de 5 % à 25%, les TG de 20% à 50% et augmenter le taux de HDL-C de 15% à 35% (Lehne, 2007). Les effets secondaires limitant son utilisation dans le traitement et la prévention de l'athérosclérose sont majoritairement le *flushing* (vasodilatation capillaire cutanée causant rougeur marquée et sensation de chaleur au niveau du visage et du torse) et l'hépatotoxicité, selon la formulation du composé nicotinique (Creider et al, 2012; Kamanna et al, 2013). Les deux grandes études cliniques réalisées sur la niacine, AIM-HIGH et HPS-2 THRIVE (étude dans laquelle le laropirant, antagoniste des récepteurs de prostaglandines, était combiné à la niacine dans le but d'annuler l'effet de *flushing*), n'ont démontré aucune efficacité au traitement par la niacine chez les patients déjà sous statine, malgré une augmentation de HDL-C (Wright, 2013). Le traitement niacine/laropirant utilisé dans l'étude HSP-2 THRIVE a été associé à une augmentation significative des taux de problèmes cutanés, gastro-intestinaux, musculosquelettique, de saignements et d'infection ainsi qu'une augmentation de l'incidence du diabète et de complications diabétiques (The HSP-2 THRIVE Collaborative group, 2014). Le médicament Tredaptive (niacine à libération prolongée/laropirant) n'a donc pas été approuvé aux États-Unis (Merck, 2013).

3.3.8 Fibrates

Les fibrates, ou dérivés de l'acide fibrique, tel le gemfibrozil, sont des agonistes du *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α). Ils permettent une augmentation de la synthèse hépatique d'apoA-I, se traduisant par une élévation de HDL-C (Staels et Auwerx, 1998). De plus, les fibrates augmentent la production de la LPL et diminuent la production d'apoC-III (inhibiteur important de la LPL), augmentant ainsi la clairance plasmatique des TG en diminuant les niveaux VLDL de 40% à 55% (Lehne, 2007). L'utilisation actuelle est très limitée vu les résultats plutôt neutres des études ACCORD (gemfibrozil et statines vs statines seules afin d'augmenter le HDL-C et diminuer les taux de TG) (Nilsson, 2010) et FIELD (fénofibrate vs placebo et la diminution du risque cardiovasculaire chez des patients diabétiques type 2 ne prenant pas de statines) (The FIELD study Investigators, 2005).

3.3.9 Inhibiteurs de la CETP

Les diminutions de la masse et de l'activité de la CETP ont été associées à une augmentation de la concentration plasmatique de HDL-C ainsi qu'à une diminution du risque de la maladie coronarienne (Santos-Gallego et al, 2008; Ballantyne et al, 2012). Inazu et al. (1990 et 1994) ont associé des mutations causant une déficience en CETP présentes chez plusieurs familles japonaises à une hausse de HDL-C et une absence d'athérosclérose prématurée. En 2000, Okamoto et al. ont traité des lapins avec le dalcetrapib et ont noté une diminution de 70% des lésions athérosclérotiques après six mois de traitement. Dans la cohorte de l'étude EPIC-Norfolk, des taux élevés de CETP ont été associés à un risque augmenté de MCV future chez les individus apparemment sains mais hypertriglycéridémiques (Boekholdt et al, 2004). Les inhibiteurs de CETP (CETPi) sont toujours l'objet d'études cliniques car ils augmentent les niveaux de HDL-C en diminuant le transfert des EC des HDL vers les LP contenant de l'apoB en échange de TG, favorisant ainsi la voie directe du TIC au détriment de la voie indirecte (Rhinds et al, 2012a).

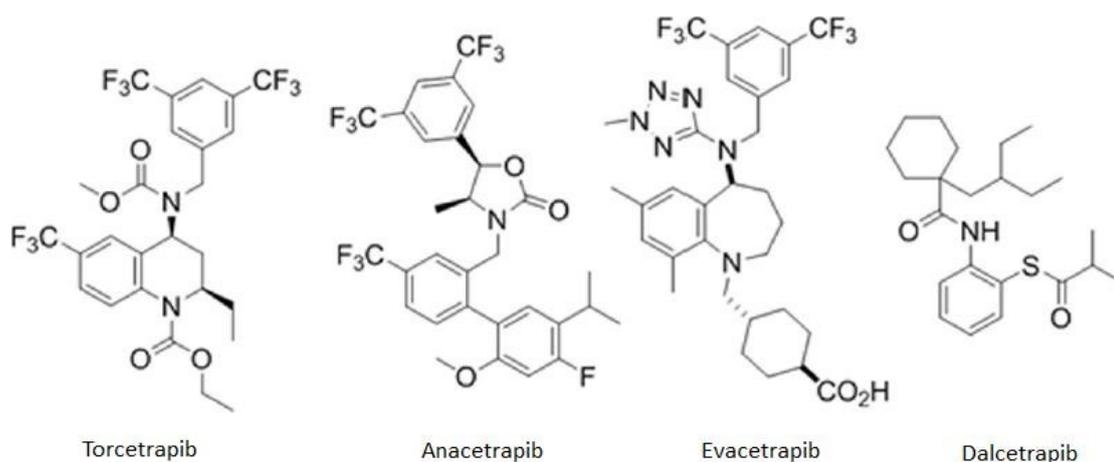


Figure 3 : Structures chimiques des inhibiteurs de CETP discutés dans cet ouvrage (tirée de Liu et al, 2012)

Le **torcetrapib**, le premier CETPi testé en phase III, fait partie du groupe des tétrahydroquinoline (Figure 3) et se lie à la poche N-terminale du tunnel hydrophobe de la CETP (Liu et al, 2012). Il a été associé à une mortalité excessive suite à l'analyse intérimaire de l'étude ILLUMINATE en 2006 et ce malgré une augmentation de HDL-C jusqu'à 60%. Les trois études d'imagerie (ILLUMINATE, RADIANCE-1 et RADIANCE-2) n'ont démontré aucun effet bénéfique sur la charge athérosclérotique coronarienne mesurée par IVUS (*intravascular ultrasound* - échographie intravasculaire) (ILLUSTRATE) (Nissen et al, 2007) ou carotidienne mesurée par échographie en mode B (RADIANCE-1 et RADIANCE-2) (Bots et al, 2007; Kastelein et al, 2007). L'effet négatif hors-cible majeur du torce-

trapib est l'augmentation de la concentration sérique d'aldostérone et des changements sériques électrolytiques (augmentation du bicarbonate et diminution du potassium (Liu et al, 2012)) causant l'activation des récepteurs minéralocorticoïdes et résultant en une augmentation de la pression artérielle (Johns et al, 2012). En 2000, la compagnie Japan Tobacco a mis au point le JTT-705 (identifié comme RO4607381 lorsqu'un partenariat avec Roche fut mis en place), maintenant appelé **dalcetrapib** (Okamoto et al, 2000). Ce CETPi contient un cœur *ortho*-thio-anilide (Figure 3) et se lie de façon covalente au résidu cystéine 13 de la CETP humaine, augmentant le HDL-C et inhibant la progression de l'athérosclérose chez les lapins de 70% (Okamoto et al, 2000; Maugeais et al, 2013). Le dalcetrapib a été le deuxième CETPi à être étudié en études cliniques de phases II et III au cours du programme Dal-HEART qui sera détaillé dans la section 5 de l'introduction. Il est le moins puissant des CETPi, amenant une augmentation modeste de HDL-C de 30 à 35% (Cannon et al, 2010; Wright, 2013). En mai 2012, suite aux résultats de l'étude dal-OUTCOMES, le programme Dal-HEART a dû être stoppé pour futilité. **Anacetrapib** est le troisième CETPi à être testé cliniquement. Il contient la triade des groupes trifluorométhyl tel le torcetrapib ainsi qu'une fraction biaryl distincte (Liu et al, 2012; Figure 3). L'étude DEFINE a démontré une augmentation de HDL-C de 138% et une baisse de près de 40% de LDL-C. L'étude de phase III REVEAL, avec près de 30 000 patients présentant des problèmes circulatoires, est présentement en cours et les résultats sont attendus en 2017 (Wright, 2013). Finalement, une augmentation de 136% des taux de HDL-C et une diminution de 22% des taux de LDL-C ont été associées à l'**evacetrapib** de manière dose-dépendante en étude de phase II (Teramoto et al, 2014). L'evacetrapib contient un cœur semblable au torcetrapib et le groupe 3,5-*bis*-trifluorométhylbenzyl ainsi qu'une chaîne latérale d'acide cyclohexanecarboxylique et méthyltétrazole (Liu et al, 2012; Figure 3). Il a été testé en phase III dans l'étude ACCELERATE, qui devait se poursuivre jusqu'à la fin 2015-début 2016 (Wright, 2013) mais, suite à la décision de la compagnie Lilly, a été arrêtée prématurément en raison d'un manque d'efficacité (Eli Lilly, 12 Octobre 2015).

4. Marqueurs de risque cardiovasculaire

4.1 Effets pléiotropiques des HDL

En 1975, Miller et Miller ont rapporté une relation inverse entre la valeur de HDL-C et la maladie coronarienne, établissant ainsi une faible valeur de HDL-C comme facteur de risque cardiovasculaire indépendant. La valeur de HDL-C demeure un élément de prédiction indépendant pour la MCV de façon générale mais aussi chez les patients traités aux statines, peu importe leur valeur de LDL-C (Rhoads et al, 2012a). Par contre, l'association inverse entre la maladie coronarienne et

la quantité de particules de HDL (HDL-P) mesurée par résonance magnétique nucléaire (RMN) est plus robuste (Soran et al, 2012; deGoma & Rader, 2012).

Les HDL sont les LP les plus abondantes dans le fluide tissulaire car leurs petites tailles de 45 à 120 Å leur permettent de traverser aisément l'endothélium vasculaire, résultant en des concentrations tissulaire et intravasculaire semblables. Les protéines les plus présentes sur les HDL sont l'apoA-I (70%) et l'apoA-II (20%). L'ApoA-I (valeur visée chez les hommes de plus de 18 ans \geq 120 mg/dl et chez les femmes de plus de 18 ans \geq 140 mg/dl (Mayo Medical Laboratories, 2016)) est présente sur presque toutes les HDL, soit 2-3 molécules sur les petites HDL discoïdales et jusqu'à 5 sur les grosses particules HDL, tandis que d'autres apolipoprotéines sont présentes sur certaines HDL seulement. Cela suggère que les sous-classes diffèrent dans leur composition physique et chimique ainsi que dans leurs propriétés fonctionnelles (Rosenson et al, 2011). En plus de leur fonction traditionnelle de transporteur dans le TIC, les HDL doivent jouer un rôle protecteur dans le processus athérosclérotique puisque leur existence même dépend de l'efflux du cholestérol et de la synthèse d'apoA-I hépatique. Ces différentes propriétés des HDL outre le TIC, soit des effets sur le stress oxydatif, l'inflammation, la thrombose, la fonction endothéliale et le métabolisme du glucose, démontrent que la qualité des HDL serait un marqueur de risque CV plus approprié que la simple quantité plasmatique de HDL-C mesurée (deGoma et al, 2008; Rosenson, 2010). Plusieurs de ces fonctions spéciales dépendraient du cargo protéique varié et abondant (dont 50 protéines identifiées seulement sur les HDL₃) (Vaisar et al, 2007).

4.1.1 Stress oxydatif

L'accumulation et la rétention des LDL dans l'intima joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. La qualité antioxydante des HDL leur permettrait de neutraliser les peroxydes lipidiques provenant des LDLox grâce à une activité enzymatique hydrolytique pour laquelle la paraoxonase-1 (PON1) semble la candidate la plus crédible (Soran et al, 2012). La PON1 est une enzyme synthétisée par le foie retrouvée sur une sous-classe de HDL contenant aussi l'apoJ et l'apoA-I avec ou sans apoA-II. Sa concentration sérique semble être inversement reliée à la MCV (deGoma et al, 2008; Besler et al, 2012; Soran et al, 2012). Une petite étude (n=14) a démontré que les patients avec un haut taux de HDL-C et une faible valeur de PON1 étaient plus susceptibles à la MCV que les patients présentant le profil inverse (Navab et al, 1997). De plus, d'autres études cliniques ont démontré que le niveau sérique de résidus d'acides gras oxydés est inversement corrélé avec l'activité de PON1 et qu'une faible activité de PON1 est associée à un développement accéléré d'athérosclérose (Bhattacharyya et al, 2008).

4.1.2 Inflammation

Les HDL ont la capacité d'inhiber et de diminuer l'expression des protéines d'adhésion de l'endothélium, soit ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, protéines qui promeuvent l'adhésion des cellules inflammatoires, dont les leucocytes, à la paroi artérielle (Chapman, 2006; de Goma et al, 2008).

4.1.3 Thrombose

Les HDL jouent un rôle antithrombotique en augmentant la capacité de la protéine C activée de clivage du facteur Va dans la cascade de coagulation, inhibant ainsi la formation de caillot (Soran et al, 2012). De plus, la liaison des HDL avec le SR-BI des plaquettes inhibe leur activation, protégeant ainsi les fonctions des cellules endothéliales et diminuant la libération de particules membranaires qui normalement favorisent la réaction prothrombotique d'adhésion entre les plaquettes et les leucocytes (Nofer et van Eck, 2011; Soran et al, 2012).

4.1.4 Fonction endothéliale

L'inactivation plaquettaire décrite ci-haut par les HDL diminue l'infiltration des monocytes et lymphocytes dans la paroi artérielle, suggérant que les plaquettes ont leur place dans l'initiation de la plaque athéromateuse. Le maintien de la fonction endothéliale par les HDL est essentiel dans la protection contre l'athérosclérose (Soran et al, 2012). Lorsque les HDL se lient au SR-BI des cellules endothéliales, il y a interaction entre les lysophospholipides associés aux HDL, particulièrement la sphingosine-1-phosphate et le récepteur des lysophospholipides S1P₃, récepteur couplé aux protéines G, probablement à cause de la promiscuité des deux récepteurs (SR-BI et S1P₃) à la surface cellulaire endothéliale (Besler et al, 2012). Cette liaison de la sphingosine-1-phosphate au S1P₃ stimule la production de NO, qui permet une relaxation des fibres musculaires lisses situées au-dessous de l'endothélium (Tortora et Grabowski, 1999; Chapman, 2006; Besler et al, 2012). Une biodisponibilité diminuée de NO est associée à une plus grande affinité des leucocytes avec l'endothélium, favorisant ainsi le développement de la plaque athéromateuse (Chapman, 2006). Il semble que la S1P liée aux HDL soit diminuée chez les patients ayant eu un IM et présentant une maladie coronarienne stable (Sattler et al, 2010).

4.1.5 Glycation des lipoprotéines

La glycation des LDL joue un rôle aussi important que l'oxydation dans le développement de l'athérosclérose (Soran et al, 2012). Une haute activité de PON1 a été associée à de faible taux de glycation des LDL. Le mécanisme proposé par Younis et al (2012) serait que PON1, en exerçant son

rôle de lactonase, protégerait d'autres protéines contenues dans les HDL, telles apoA-I ou apoM, qui seraient impliquées directement dans le rôle d'antiglycation des HDL.

4.2 La capacité d'efflux de cholestérol

Tel qu'expliqué plus haut, considérer la simple valeur de HDL-C comme marqueur du risque cardiovasculaire présente plusieurs limitations. Premièrement, la valeur de HDL-C mesurée dans certains sous-groupes, tels que les humains porteurs de la mutation apoA-I^{Milano} (Franceschini et al, 1980) et les modèles animaux surexprimant SR-BI (Kozarsky et al, 1997; Zhang et al, 2005), est faible mais n'est pas associée à un haut risque de MCV. À l'opposé, de hautes valeurs de HDL-C mesurées chez les rongeurs déficients en SR-BI (Van Eck et al, 2003) et les patients traités au torcetrapib ne sont pas associées à une protection contre l'athérosclérose (Nissen et al, 2007). Deuxièmement, la valeur de HDL-C est statique et ne reflète pas le rôle dynamique des HDL dans le TIC. Troisièmement, le HDL-C est une mesure quantitative qui ne considère pas la qualité/capacité des HDL circulantes dans l'efflux. Ainsi, la capacité des HDL d'accepter le cholestérol des macrophages ne peut être mesurée par la simple valeur de HDL-C calculée (Santos-Gallego et al, 2011; Ono, 2012). Enfin, la mesure plasmatique de HDL-C ne tient pas compte des activités pléiotropiques des HDL.

Le développement de méthodes quantifiant le TIC, surtout la première étape impliquant le flux de cholestérol vers les HDL à partir de macrophages, permettrait d'évaluer le métabolisme des HDL dans deux conditions : 1) le développement de nouvelles thérapies visant les HDL et 2) l'application de la médecine personnalisée dans l'évaluation du risque CV, par exemple évaluer la quantité et la fonctionnalité des HDL avant/après l'initiation d'un traitement. Présentement, plusieurs méthodes sont applicables pour évaluer l'efflux de cholestérol, chacune présentant ses propres limitations (Santos-Gallego et al, 2011).

4.2.1 Modèles à base d'animaux

4.2.1.a Masse de cholestérol fécal excrété

Historiquement, ce modèle a été la première méthode d'évaluation de l'efflux de cholestérol utilisée. Comme l'étape ultime du TIC est l'excrétion fécale, le calcul de l'excrétion nette du cholestérol dans les selles par chromatographie en phase gazeuse ou liquide peut représenter un marqueur du TIC (Santos-Gallego et al, 2011). Chez les souris, l'inflammation aiguë provoquée par l'injection sous-cutanée de lipopolysaccharides diminue le TIC des macrophages à plusieurs niveaux, mais l'efflux vers les selles est l'étape la plus sensible (McGillicuddy et al, 2009). En effet,

de faibles (0,3 mg/kg) et grandes (3 mg/kg) concentrations d'endotoxines (lipopolysaccharides sous-cutanés) affectent négativement l'efflux du foie vers les selles tandis que l'efflux des macrophages vers le plasma se trouve altéré seulement à de fortes concentrations d'endotoxines (McGillicuddy et al, 2009; Santos-Gallego et al, 2011; Annema et Tietge, 2012). De plus, comme l'intestin efflue aussi le cholestérol vers les selles, cette technique tient compte des deux processus. Une augmentation du contenu fécal en cholestérol est une méthode indirecte pour démontrer une augmentation du TIC et un effet athéroprotecteur de n'importe quelle intervention. Le désavantage majeur de cette technique est que la portion du TIC spécifique aux macrophages ne peut être mesurée et que certaines interventions peuvent modifier cette valeur sans pour autant changer le résultat d'excrétion fécale, par exemple chez les souris ABCA1 knock-out ayant une excrétion fécale normale tout en étant à risque de développer de l'athérosclérose (Cuchel & Rader, 2006; Santos-Gallego et al, 2011).

4.2.1.b Modèles cinétiques de dilution d'isotope

Cette méthode permettant de quantifier le TIC chez l'humain se base sur deux idées : 1) le cholestérol est distribué dans deux pools différents, soit non hépatique (entre autres les macrophages spumeux de la paroi artérielle) versus plasmatique/hépatique et 2) un traceur intraveineux (^3H ou ^{13}C) est rapidement distribué dans le pool plasmatique/hépatique mais n'est pas retrouvé dans le pool non-hépatique. Une fois l'équilibre du traceur atteint, le cholestérol périphérique passe dans le plasma et dilue le traceur : il y a donc une relation inverse entre l'efflux et la concentration du traceur. La limitation majeure de ce modèle est qu'encore une fois, l'efflux périphérique total est mesuré et la portion effluée par les macrophages ne peut être quantifiée. De plus, la synthèse de cholestérol de novo hépatique peut toujours diluer la concentration plasmatique du marqueur et doit être estimée. Finalement, cette technique doit permettre de relier les valeurs d'efflux aux mesures cliniques d'intérêt (mesure de l'épaisseur de l'intima-média carotidienne, progression de la plaque athéromateuse mesurée par IVUS) (Santos-Gallego et al, 2011).

4.2.1.c Flux de cholestérol centripète estimé à partir de la prise et de la synthèse de cholestérol périphériques

Avec cette méthode, on assume que le flux net de cholestérol centripète - soit des organes périphériques vers le foie - est égal à la somme des taux de flux centrifuge – soit d'acquisition de LDL-C – et de synthèse de novo dans ces organes. Il faut aussi prétendre que la concentration en cholestérol de ces organes ne change pas, ce qui cause problème car l'athérosclérose est associée à une diminution de l'efflux et une augmentation de l'influx de cholestérol dans la paroi artérielle.

De plus, les facteurs affectant l'efflux des macrophages ne sont pas nécessairement les mêmes facteurs modifiant de façon générale le transport du cholestérol de tous les tissus vers le foie (Santos-Gallego et al, 2011).

4.2.1.d TIC *in vivo* spécifique aux macrophages

Le modèle mis au point par Zhang et al (2003) consiste en l'injection de macrophages J774 rendus spumeux suite à une incubation avec des LDL acétylés et marqués au cholestérol ^3H dans la cavité péritonéale de souris et permet de répondre aux limitations des techniques décrites plus haut : l'excrétion fécale dosée de stéroïdes ^3H est une mesure directe de l'efflux spécifique aux macrophages injectés. Le résultat principal obtenu par Zhang et al (2003) était que le TIC des macrophages *in vivo* est augmenté lorsque l'apoA-I est surexprimée chez le modèle de souris. Plusieurs variations de la technique sont possibles, telles que l'utilisation d'adipocytes ou l'injection sous-cutanée des cellules. Les désavantages majeurs sont que l'injection de produit radioactif chez l'humain est éthiquement non acceptable dans un contexte non curatif ou diagnostique et que la collecte des selles et du foie est nécessaire afin de quantifier le cholestérol s'y trouvant (Zhang et al, 2003; Santos-Gallego et al, 2011).

4.2.2 Modèles cellulaires

4.2.2.a Efflux de cholestérol cellulaire *ex vivo*

Cette technique, initialement développée par Fielding et al (1983), permet de quantifier l'efflux de cholestérol de cellules donneuses (originellement des fibroblastes) vers des sérums entiers provenant de différents individus. De la Llera-Moya et al. (1994) ont affiné la technique afin de permettre le screening de sérums à grande échelle. Les cellules donneuses, telles les hépatocytes, macrophages ou fibroblastes, sont incubées avec une quantité définie de ^3H -cholestérol. Une fois le cholestérol bien distribué dans les cellules (équilibre), elles sont mises en contact avec un milieu contenant un "accepteur" de cholestérol (apoA-I délipidée, HDL isolées, sérum déplété en apoB ou sérum humain dilué) et la radioactivité présente dans les cellules donneuses ainsi que dans le milieu est calculée. L'efflux est défini par la quantité de traceur (^3H -cholestérol) dans le milieu divisé par le signal total (milieu + cellules). On parle alors de capacité d'efflux (Santos-Gallego et al, 2011).

4.2.2.b Hépatocytes

Les hépatocytes de rat Fu5AH expriment de hauts niveaux du récepteur SR-BI et n'expriment pas d'ABCA1 fonctionnel, ce qui permet de mesurer l'efflux dépendant de SR-BI (Miwa et al, 2009).

L'utilisation d'hépatocytes humains HepG2, cellules de carcinome hépatocellulaire, permet aussi de quantifier l'efflux dépendant de SR-BI (O'Connell et al, 2004).

4.2.2.c Macrophages

Les macrophages utilisés dans les essais d'efflux peuvent être les J774 de souris qui expriment très peu le récepteur SR-BI. L'expression du transporteur ABCA1 peut être augmentée suite à un traitement par un agoniste LXR et par d'autres facteurs indépendants de la voie LXR/RXR, tel l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) afin de quantifier l'efflux dépendant d'ABCA1 (Bortnick et al, 2000; Oram et al, 2000; Oram & Heinecke, 2005). La vitesse d'efflux des cellules J774 est lente, soit 3% par heure (de la Llera-Moya et al, 1994). À partir de ce modèle d'efflux, de la Llera-Moya et al. (2010) ont démontré que des sérums humains présentant des valeurs semblables de HDL-C ou d'apoA-I différaient dans leur capacité de stimuler l'efflux de cholestérol de macrophages J774 à cause de la variation de leur concentration en pré β -1 HDL. Khera et al. (2011) ont établi deux liens importants indépendants du niveau de HDL-C mesuré: 1) un élément de prédiction inverse entre l'efflux de cholestérol de macrophages J774 vers des sérums humains de volontaires sains et la cIMT (*carotid Intima Media Thickness*) ainsi que 2) une association inverse entre la capacité d'efflux de macrophages J774 et la présence d'athérosclérose confirmée par angiographie. Ces études, ainsi que plusieurs autres réalisées à partir de ce modèle de macrophages, suggèrent que la mesure de capacité d'efflux de cholestérol (CEC) serait un biomarqueur prometteur pour la maladie athérosclérotique (Rohatgi, 2015).

4.2.2.d Fibroblastes

Les cellules BHK-ABCA1 sont des fibroblastes provenant de reins de hamster et ont intégré dans leur génome un vecteur d'expression portant un ADN complémentaire codant pour l'ABCA1 humain, dont l'expression est inductible suite à un traitement avec la mifépristone (Vaughan & Oram, 2003). Les cellules L, soit des fibroblastes de souris, ont une vitesse d'efflux d'environ 12% à l'heure (de la Llera-Moya et al, 1994). Les fibroblastes GM3468A proviennent de peau humaine. Dans ces cellules, l'efflux vers l'apoA-I via le transporteur ABCA1 peut être induit avec un traitement par des analogues de l'AMPC (Bielicki et al, 1992; Haidar et al, 2002).

4.2.2.e Notre modèle

Le modèle d'efflux utilisé dans la présente étude est basé sur le modèle développé par de la Llera-Moya et al. (1994). Le protocole établi permet de calculer l'efflux fractionnel de ³H-cholestérol des lignées cellulaires BHK-ABCA1, HepG2 et J774, vers des échantillons sériques humains sélection-

nés et déplétés en apoB. La déplétion de sérum en apoB permet d'exposer les cellules à toutes les fractions de HDL présentes et d'éliminer la participation des lipoprotéines contenant de l'apoB à l'influx et l'efflux de cholestérol (Asztalos et al, 2005), dont les LDL qui font surtout de l'influx via le récepteur SR-BI (Rothblat et al, 2002).

Les cellules confluentes sont marquées avec du ^3H -cholestérol radioactif comme traceur de cholestérol. Une période d'équilibration permet au ^3H -cholestérol de se distribuer dans les différents pools intracellulaires de cholestérol libre. L'utilisation d'un inhibiteur d'ACAT permet d'empêcher l'estérification du cholestérol et son stockage dans les gouttelettes lipidiques cytosoliques. À la fin de l'essai, le pourcentage d'efflux est calculé comme les comptes de traceur dans le milieu de culture divisé par le nombre de comptes total (milieu + cellules) (GC, SOP-001, v3jan2014, voir Annexe 1).

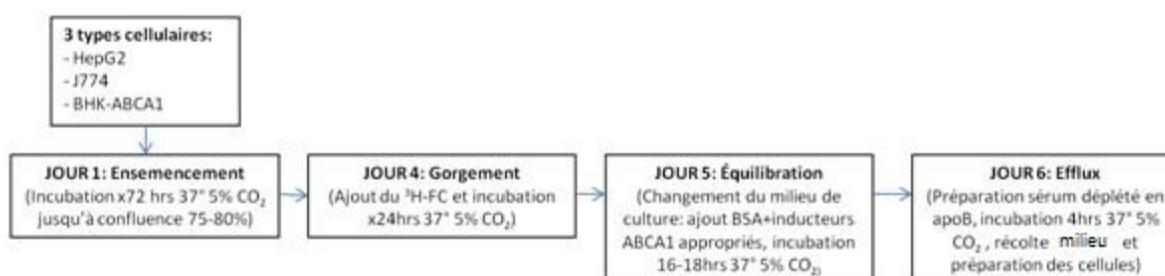


Figure 4: Schéma simplifié de notre modèle d'efflux pour les cellules HepG2, J774 et BHK-ABCA1 avec les étapes principales (voir la section 3. Mesures effectuées, méthodes de la sous-étude).

4.3 Mesures de la charge athérosclérotique

Trois techniques permettant de mesurer la charge athérosclérotique artérielle seront décrites. D'abord, au niveau coronarien, l'angiographie coronarienne quantitative (*quantitative coronary angiography* - QCA) et l'IVUS permettent d'identifier, mesurer et qualifier l'étendue de la plaque athéromateuse. Ensuite, au niveau carotidien, l'échographie de la paroi artérielle permet d'identifier et de mesurer l'athérosclérose sous-clinique sous la forme de l'indice de l'épaisseur de l'intima-média ou cIMT.

4.3.1 QCA et IVUS

L'angiographie des coronaires, ou coronarographie, est une étude radiologique consistant en l'injection d'un produit de contraste iodé dans la coronaire, par accès artériel radial ou fémoral, afin de visualiser sa lumière (lumen) et la présence de plaques en deux dimensions sur le plan longitudinal (Szwarc et Vignaux, 2013). Comme une analyse humaine amène toujours une variabi-

lité inter-individuelle et/ou intra-individuelle, le développement de logiciels informatiques avec algorithmes réduit la variation de la mesure de la plaque. On parle alors d'analyse QCA. Finalement, puisque la coronarographie permet la visualisation de l'espace intracoronaire restant, elle sous-estime la présence d'athérosclérose diffuse et a mené au développement de l'IVUS (Rees et Zijlstra, 2009), une mesure tridimensionnelle.

L'IVUS consiste en une sonde échographique placée au bout distal d'un cathéter permettant de visualiser l'intérieur de la coronaire en coupe transversale, soit les couches circulaires distinctes telles que l'adventice, la média et l'intima ainsi que la lumière du vaisseau (Rees et Zijlstra, 2009; angioplasty.org, 2013; Szwarc et Vignaux, 2013). Ce cathéter peut être glissé sur le même guide que celui utilisé lors de l'angiographie. L'avantage majeur de cette technique est de permettre une analyse plus précise de la plaque athéromateuse, puisque 1) l'épaisseur de l'intima, pouvant être irrégulière au sein d'une même plaque, est visualisée transversalement et 2) le phénomène compensatoire de progression de la plaque vers l'extérieur du vaisseau (effet Glagov) est identifiable. Les plaques instables, qui semblent non significatives à l'étude coronarographique, peuvent alors être identifiées. Les désavantages sont le coût élevé du cathéter, l'augmentation de la durée d'intervention et les risques vasculaires accrus comparativement à la coronarographie seule (angioplasty.org, 2013).

4.3.2 cIMT

La mesure de l'épaississement de la paroi artérielle carotidienne a été introduite et validée dans les années 80 comme méthode de détection de la maladie athérosclérotique chez les humains. La plaque carotidienne se définit par un épaississement focal d'au moins 50% par rapport à l'IMT adjacente ou d'un épaississement absolu supérieur à 1,5 mm (Herder et al, 2012; Kuo et al, 2012; Polonsky et Ward, 2011). Traditionnellement, la technique en deux dimensions (Doppler, 2D-US) permet de quantifier la TPA (*total plaque area*) ainsi que la cIMT. La combinaison des épaisseurs des interfaces lumière-intima et intima-média donne la valeur de cIMT (Al-Shali et al, 2005; Polonsky et Ward, 2011; Johri et al, 2014). Récemment, l'avenue de l'échographie en trois dimensions (*3 dimensions ultrasound* - 3DUS) permet de quantifier le volume total de la plaque (*total plaque volume* – TPV) (Ainsworth et al, 2005; Al-Shali et al, 2005). Aujourd'hui, la cIMT 2DUS (*2 dimensions ultrasound*) combinée avec 3DUS est utilisée comme un marqueur du fardeau athérosclérotique global ainsi qu'un élément de prédiction d'événements cardiovasculaires futurs (Polonsky et Ward, 2011).

Concernant les facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels, les valeurs de cIMT, de TPA ainsi que de TPV semblent toutes associées à l'âge et au sexe masculin. Par contre, pour les autres facteurs de risque, la cIMT est significativement associée à l'hypertension, la TPA à l'usage du tabac et à la valeur de cholestérol total sérique et le TPV au diabète (Al-Shali et al, 2005; Herder et al, 2012). La mesure de cIMT, plutôt reliée à l'hypertrophie hypertensive de la média, serait plus un élément prédictif de l'accident vasculaire cérébral que de l'IM (Spence, 2006; Rundek et al, 2013). Malgré tout, il est accepté que les facteurs de risque traditionnels n'expliquent qu'environ 50% de la variance dans ces mesures (Al-Shali et al, 2005; Herder, 2012; Kuo et al, 2012). L'échographie carotidienne percutanée présente l'avantage d'être non invasive (Spence, 2006). Par contre, plusieurs sources d'erreurs sont possibles telles que les variations inter-individuelles et/ou intra-individuelles ou le point de mesure variant aussi peu que de quelques fractions de millimètre (Herder, 2012).

5. Programme Dal-HEART

5.1 Description et objectifs

dal-HEART (**dal**cetrapib **HDL** Evaluation, **A**therosclerosis & **R**everse cholesterol Transport Program) est un programme de développement global qui avait été mis sur pied par la compagnie pharmaceutique Roche, comportant 6 études cliniques : **dal-VESSEL**, **dal-PLAQUE**, **dal-OUTCOMES**, **dal-PLAQUE2**, **dal-ACUTE** et **dal-OUTCOMES 2** (Tableau I). Le but ultime de ce programme était de tester la capacité du dalcetrapib à réduire les événements cardiovasculaires en augmentant le HDL-C (Rhainds et al, 2012a). Les études dal-ACUTE, dal-VESSEL et dal-PLAQUE ont été complétées. Suite à une analyse intérimaire, dal-OUTCOMES a été arrêtée en mai 2012 pour manque d'efficacité clinique et de ce fait dal-PLAQUE 2 a dû être stoppée prématurément, alors que la moyenne de temps de traitement était de 14 mois. Dal-OUTCOMES 2 n'a donc jamais dépassé la phase de recrutement et le programme dal-HEART a été abandonné (Roche, 2012).

Tableau I: Programme dal-HEART selon les différentes études cliniques – dal-VESSEL, dal-PLAQUE, dal-OUTCOMES, dal-PLAQUE2 et dal-ACUTE - le composant : leurs phases, les nombres et types de patients, la période durant laquelle l'étude s'est déroulée ainsi que les événements cliniques principaux visés par l'étude.

	dal-VESSEL	dal-PLAQUE	dal-OUTCOMES	dal-PLAQUE 2	dal-ACUTE
Phase	2	2	3	3	3
Nombre de patients	450	130	15 600	936	300
Type de patients	CAD et FRE	CAD	SCA récent	CAD	SCA récent ≤ 1 semaine
Période	Février 2008-mai 2010	Mars 2008-Novembre 2010	Avril 2008-Mai 2012	Janvier 2010-Mai 2012	Mars 2011-Mars 2012
Événements cliniques principaux	FMD et MAPA	Taille et fardeau de la plaque athéro-sclérotique	Temps écoulé au premier événement cardio-vasculaire	% changement de volume athérome coronarien/taux changement cIMT	% changement de HDL-C de la valeur de base après 4 semaines de Tx

Légende :

CAD : *coronary artery disease* (maladie coronarienne); **FRE** : facteurs de risque équivalents; **SCA** : syndrome coronarien aigu; **FMD** : *flow mediated dilatation* (vasodilatation dépendante du flux sanguin); **MAPA** : mesure ambulatoire de la pression artérielle; **cIMT** : *coronary intima-media thickness* (épaisseur de l'intima-média carotidienne); **HDL-C** : *high density lipoprotein cholesterol* (cholestérol lié aux lipoprotéines à haute densité).

dal-VESSEL

Cette étude européenne (Allemagne, Autriche, France, Italie, Pays-Bas, Royaume-Uni et Suisse) de phase II randomisée à double insu a évalué l'innocuité, la tolérabilité et l'efficacité du dalcetrapib 600 mg *per os die* (par la bouche, une fois par jour) versus un placebo sur la fonction endothéliale chez des patients avec une maladie coronarienne (CAD – *coronary artery disease*) ou des facteurs de risques équivalents pour une durée de 36 semaines. La fonction endothéliale a été évaluée par FMD (*flow mediated dilatation* – vasodilatation dépendante du flux sanguin) par échographie mode-B et il y a eu mesure ambulatoire de la pression artérielle (MAPA) (Kastelein et al, 2011; clinical-trials.gov, 2014). D'après les résultats obtenus, le dalcetrapib réduit l'activité de la CETP et augmente les niveaux de HDL-C sans affecter la fonction endothéliale dépendante de NO, la pression artérielle ou les marqueurs de l'inflammation et le stress oxydatif chez ces patients (Lüscher et al, 2012).

dal-PLAQUE

C'est une étude de phase II randomisée à double insu comparant l'efficacité du dalcetrapib 600 mg *per os die* versus un placebo sur la progression ou la régression de l'athérosclérose chez des

patients avec CAD et avec facteurs de risque équivalents pour une durée de 24 mois qui s'est déroulée aux États-Unis et à Montréal. Le fardeau de la plaque a été évalué par imagerie par résonance magnétique (IRM) au niveau carotidien et l'inflammation de la plaque carotidienne et au niveau de l'aorte thoracique ascendante mesurée par tomographie à émission de positron suivant un marquage au 18F-fluorodésoxyglucose (18F-FDG-PET). Les résultats principaux de cette étude étaient l'absence d'effets pathologiques sur la paroi artérielle ainsi que de possibles effets bénéfiques au niveau vasculaire incluant une diminution de l'élargissement total du segment carotidien étudié (Fayad et al, 2011; clinicaltrials.gov, 2014).

dal-OUTCOMES

Cette étude de phase III randomisée à double insu a évalué le potentiel du dalcetrapib 600 mg *per os die* versus un placebo à diminuer la morbidité et mortalité cardiovasculaire chez des patients CAD stables ayant subi un syndrome coronarien aigu (SCA) – IM ou angine instable - récent. Les pays participants étaient l'Afrique du Sud, l'Allemagne, l'Argentine, l'Autriche, l'Australie, la Belgique, le Brésil, le Canada, la Chine, le Danemark, l'Espagne, les États-Unis, la Finlande, la France, la Grenade, la Hongrie, l'Irlande, Israël, l'Italie, la Nouvelle-Zélande, les Pays-Bas, la Pologne, Puerto Rico, la République de Corée, la République Tchèque, le Royaume-Uni, la Slovaquie, la Suède et la Suisse. Aussi, cette étude évaluait la sécurité à long terme de dalcetrapib. La durée planifiée était supérieure à 2 ans, mais a été stoppée le 7 mai 2012 suite à une recommandation du *drug safety monitoring board* par Roche, pour cause de futilité clinique (Roche, 2012; clinicaltrials.gov, 2013).

dal-PLAQUE2

Cette étude de phase III multicentrique (Allemagne, Canada, États-Unis, Pologne et Suisse) randomisée à double insu avait pour but d'évaluer l'effet du dalcetrapib 600 mg *per os die* versus un placebo sur la progression athérosclérotique des patients avec CAD par IVUS, coronarographie/QCA et cIMT sur une période planifiée de 24 mois (Figure 5). Suite à l'arrêt de dal-OUTCOMES, cette étude a aussi été terminée en mai 2012 pour futilité (Roche, données non publiées, 2013; clinicaltrials.gov, 2012; apps.who.int, 2014)

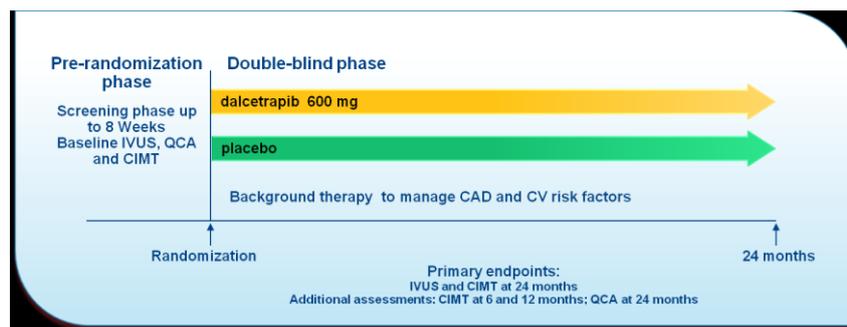


Figure 5: Schéma de l'étude dal-PLAQUE2 telle que planifiée lors de la mise en place du protocole clinique. Source : Roche/Rapport interne MHICC (Montreal Heart Institute Coordinating Center)

dal-ACUTE

C'est une étude de phase III multicentrique (États-Unis, Pays-Bas, République Tchèque et Royaume-Uni) randomisée à double insu évaluant l'innocuité et la sécurité du dalcetrapib 600 mg *per os* versus un placebo ainsi que les effets à court et moyen termes de l'inhibition de la CETP sur le HDL-C, l'apoA-I, la fonction des HDL et certains biomarqueurs inflammatoires chez des patients hospitalisés pour un syndrome coronarien aigu. Le traitement a été débuté au plus une semaine après l'événement pour une durée de 20 semaines (clinicaltrials.gov, 2014). Les résultats n'ont pas été publiés car le programme dal-HEART a été arrêté mais des essais d'efflux et des mesures biochimiques ont été effectués par Ray et al. (2014). Les élévations de HDL-C (environ 30%) suite au traitement au dalcetrapib ont été associées à une augmentation (environ 10%) des taux d'apoA-I et de l'efflux de cholestérol, principalement via les voies non-ABCA1. Ces résultats laissent supposer qu'une dissociation existe bien entre l'augmentation du HDL-C et les fonctions des HDL.

5.2 dal-PLAQUE2 (DP2)

5.2.1 Justification

Malgré la disponibilité de plusieurs agents hypocholestérolémiants, la maladie cardiovasculaire demeure responsable d'une incidence importante de mortalité et morbidité au niveau mondial, autant dans les pays industrialisés qu'en développement (Protocole Dal-Plaqué2, numéro NC22703, version B). De nouvelles stratégies thérapeutiques visant à déjouer l'athérosclérose sont donc nécessaires. L'effet attendu du dalcetrapib (tel que décrit dans la section 3.3.9, soit augmenter la quantité sanguine de HDL-C) permettrait possiblement de ralentir la progression de l'athérosclérose au niveau coronarien et carotidien chez des patients à haut risque CV (Protocole Dal-Plaqué2, numéro NC22703, version B).

5.2.2 Objectifs

L'objectif primaire de cette étude est d'évaluer l'effet d'un traitement au dalcetrapib d'une durée planifiée de deux ans sur la progression de l'athérosclérose, analysée par IVUS et échographie carotidienne, chez des patients atteints de maladie coronarienne.

Les objectifs secondaires sont: 1) évaluer l'effet d'un traitement au dalcetrapib d'une durée planifiée de deux ans sur la progression de l'athérosclérose, analysée par QCA, chez des patients atteints de CAD, 2) explorer les effets du dalcetrapib sur le métabolisme des lipides et sur les biomarqueurs d'inflammation, d'oxydation et de risque CV, 3) évaluer le profil de sécurité à long terme du dalcetrapib, 4) corrélérer le statut et le taux de progression de l'athérosclérose coronarienne avec le taux de progression de l'athérosclérose carotidienne, évalués par IVUS et échographie carotidienne chez des patients atteints de CAD, et finalement 5) évaluer les effets du dalcetrapib sur les événements cliniques afin d'effectuer une analyse combinée des résultats provenant du programme entier des phases IIB et III (Protocole Dal-Plaque2, numéro NC22703, version B).

5.2.3 Mesures de la charge athérosclérotique disponibles dans DP2

Les seules mesures de la charge athérosclérotique disponibles à 1 an de traitement sont celles de cIMT, soit la mesure moyenne et la mesure maximale (moyenne pour tous les segments mesurés), telles que décrites dans le Tableau II. Les mesures de IVUS et de QCA n'ont pas été réalisées pour tous les patients vu l'arrêt prématuré de l'étude. La mesure intéressante présentée est celle du changement entre le début du traitement et après 1 an de traitement au dalcetrapib. On peut voir qu'au niveau des changements moyens de cIMT, autant pour les mesures moyennes et maximales de la moyenne de tous les segments, il n'y a pas de différences significatives entre les groupes placebo (PCB) et dalcetrapib (DAL). Le dalcetrapib ne semble donc pas avoir d'effet sur les mesures de cIMT après 1 an de traitement.

Tableau II: Résultats des moyennes des mesures de la cIMT moyenne et maximale pour tous les segments (mm) dans la cohorte de l'étude dal-PLAQUE2 (initialement Placebo n=462 Dalcetrapib n=474) au baseline et après 1 an de traitement ainsi que les valeurs de changement absolu (n, moyennes et écart-types). Traduit de : Roche/Rapport interne MHICC (Montreal Heart Institute Coordinating Center).

	cIMT Moyenne Moyenne sur tous les segments [mm]		cIMT Maximum Moyenne sur tous les segments [mm]	
	Placebo N=462	Dalcetrapib 600 mg N=474	Placebo N=462	Dalcetrapib 600 mg N=474
<i>Moyenne et maximum au Baseline</i>				
n	396	411	396	411
Moyenne	0,874	0,858	1,029	1,008
SD	0,1549	0,1495	0,1765	0,1659
<i>1 an</i>				
n	365	377	365	377
Moyenne	0,875	0,858	1,031	1,010
SD	0,1549	0,1498	0,1737	0,1673
<i>Changement du baseline à 1 an</i>				
n	356	363	356	363
Moyenne	0,003	0,003	0,005	0,005
SD	0,0568	0,0588	0,0659	0,0679

5.2.4 Résultats non publiés de l'étude DP2

Le Tableau III illustre les pourcentages de changements des différents lipides mesurés entre le début du traitement au dalcetrapib ou placebo et 1 an de traitement. L'augmentation de LDL-C est environ 3% plus grande dans le groupe DAL que dans le groupe PCB, l'augmentation de HDL-C est beaucoup plus importante dans le groupe DAL (32,27 %) que dans le groupe PCB (5,77 %) et l'augmentation de l'apoA-I est plus de cinq fois plus grande dans le groupe DAL (11,29 %) que dans le groupe PCB (2,15 %).

Tableau III: Changements en pourcentage après 1 an de traitement au dalcetrapib pour les valeurs de LDL-C, HDL-C et apoA-I pour la cohorte dal-PLAQUE 2 (Placebo n=462 Dalcetrapib n=474). Traduit de : Roche/Rapport interne MHICC.

	% de changement du baseline à 12 mois	
	Placebo N=462 Moyenne (SD)	Dalcetrapib 600 mg N=474 Moyenne (SD)
LDL-C	10,7 (32,7)	13,8 (54,3)
HDL-C	5,8 (17,3)	32,3 (27,4)
ApoA-I	2,2 (12,0)	11,3 (15,3)

LA SOUS-ÉTUDE CONCERNANT LES EFFETS DU DALCETRAPIB, UN INHIBITEUR DE CETP, SUR LA STRUCTURE ET LA FONCTION DES HDL DANS L'ÉTUDE DP2

1. Objectifs et Hypothèse

1.1 Objectif principal

L'objectif principal de cette étude était d'étudier l'effet du dalcetrapib après 1 an de traitement avec 600 mg *per os die* sur la structure et la fonction des HDL dans une sous-population de la cohorte DP2 dont les mesures de la cIMT prises au baseline et après 1 an de traitement étaient disponibles, et ce en considération des effets attendus d'une hausse des HDL, qui n'a pas eu d'impact sur la cIMT.

1.2 Objectifs secondaires

Trois objectifs secondaires viennent préciser l'étude :

- 1) Étude de différentes données biochimiques (baseline vs 1 an de traitement) : valeurs de lipides et d'apolipoprotéines, glycémie, protéines reliées aux HDL, telles LCAT et la myéloperoxidase (MPO);
- 2) Profil lipidique réalisé par RMN : taille moyenne ainsi que concentration totale des HDL et LDL, concentration des petites, moyennes et larges HDL;
- 3) Étude de 2 différentes capacités d'efflux de cholestérol du sérum des participants: SR-BI avec les cellules HepG2 ainsi que la voie ABCA1 avec les cellules BHK-ABCA1 et J774.

1.3 Hypothèse

L'inhibiteur de CETP dalcetrapib cause une hausse du cholestérol relié aux HDL, ce qui aura des effets positifs sur la structure et la fonction des particules HDL, plus précisément une augmentation des capacités d'efflux étudiées, du nombre de particules HDL et augmenter la masse de LCAT.

2. Sélection de l'échantillon

La population de l'étude DP2 a été sélectionnée selon les critères d'inclusion et d'exclusion suivants : les participants, hommes et femmes âgés de plus de 18 ans étant cliniquement stables selon l'investigateur, devaient avoir une angiographie coronarienne cliniquement indiquée prévue et une possible intervention coronaire percutanée *ad hoc*. Un des critères lipidiques suivants devait être rencontré : a) une prise en charge médicale et diététique du LDL-C selon les données probantes ayant pour cible une valeur <100 mg/dl (<2.6 mmol/L) à la randomisation (visant idéalement une cible de <70 mg/dl (<1.8 mmol/L)) ou b) des participants présentant une valeur de LDL-C ≥ 100 mg/dl (≥ 2.6 mmol/L) pouvaient être sélectionnés s'ils n'atteignaient pas une cible inférieure à 100 mg/dl malgré un traitement par dose élevée ou maximale tolérée de statine déterminée par l'investigateur ou présentant une intolérance aux statines documentée.

De plus, les participants ne devaient rencontrer aucun des critères d'exclusion suivants. Au niveau carotidien, les participants présentant une valeur maximale de cIMT >3.0 mm et/ou cliniquement symptomatique et/ou présentant une sténose importante dans n'importe quel segment carotidien évalué par Doppler étaient exclus. Au niveau cardiovasculaire, les participants ayant eu un pontage coronarien (CABG – *coronary artery bypass graft*) ou pour lesquels un CABG était prévu dans les 24 mois suivants le screening, les participants présentant un IM dans la coronaire ciblée pour l'IVUS entre l'IVUS initial et la randomisation, les participants insuffisants cardiaques (Classe III ou IV de la New York Heart Association [NYHA]) ou les participants présentant une condition valvulaire cardiaque significative nécessitant une réparation ou un remplacement chirurgical durant la période de l'étude étaient exclus.

Au niveau clinique, une hypertension artérielle (HTA) non contrôlée (pression systolique ≥ 180 mmHg et/ou pression diastolique ≥ 110 mmHg lors de n'importe quelle visite pré-randomisation malgré un traitement antihypertenseur), des valeurs d'aspartate aminotransférase (sérum glutamoxaloacétate transférase) (AST [SGOT]), d'alanine aminotransférase (sérum glutamopyruvate transférase) (ALT [SGPT]) ou de bilirubine ≥ 1.5 x la limite normale supérieure (ULN) au screening, une valeur inexplicquée de créatine phosphokinase (CPK) > 3 x ULN (*upper limit of normal* – limite

supérieure de la normale) au screening, une valeur d'hémoglobine glyquée (HbA1c) >10% au screening, un taux de filtration glomérulaire estimé (eGFR) <30 mL/min au screening ou une valeur de TG >400mg/dl (4,52 mmol/L) au screening étaient des facteurs d'exclusion. Aussi, une histoire de malignité (sauf pour carcinome baso-cellulaire ou cellulaire squameux traité) durant les 3 années précédant le screening, une hypercholestérolémie familiale homo- ou hétérozygote, une histoire de problèmes obstructifs biliaires, pathologie biliaire active, pancréatite, collagénopathie ou maladie auto-immune étaient des facteurs d'exclusion de l'étude.

Finalement, les participants antérieurement hypersensibles à un autre CETPi, ayant reçu un vaccin contre la CETP ou qui avaient déjà participé à n'importe quel essai clinique sur le dalcetrapib ou autre CETPi, qui étaient traités avec une substance augmentant la valeur de HDL-C autre que le dalcetrapib (niacine ou fibrates, mais l'ézetimibe et les huiles de poisson étaient permis), qui avaient une espérance de vie inférieure à 2 ans, ayant une histoire de dépendance à l'alcool ou aux drogues dans les 3 années précédant le screening et les participantes enceintes ou allaitant ont été exclus.

Pour cette présente sous-étude de l'étude principale DP-2 (n=988) des biomarqueurs reliés aux HDL, nous avons recherché tous les sujets inclus ayant :

- 1) Une mesure de cIMT obtenue au *baseline* et après 1 an (n=511), dont les comparaisons ont été faites en comparant le changement du *baseline* (avec ajustement pour égaliser les groupes) à 1 an.

et

- 2) Un prélèvement de sang au *baseline* et après 1 an (n=421)
 - a. 2 tubes de plasma traités avec EDTA de sodium: 1 pour la biochimie et valeurs des lipides (tests refaits en pairé par le laboratoire de biochimie de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour *baseline* et 1AN) et 1 pour le profil lipidique réalisé par résonance magnétique nucléaire (RMN) par la compagnie Liposcience, maintenant partie de Quest Diagnostics.
 - b. 1 tube de sérum : pour les essais d'efflux de cholestérol.

Au final, nous avons eu un total de n=379, soit 38% des participants de l'étude principale DP2, avec n=193 dans le groupe PCB et n=186 dans le groupe DAL tel qu'illustré dans la Figure 6.

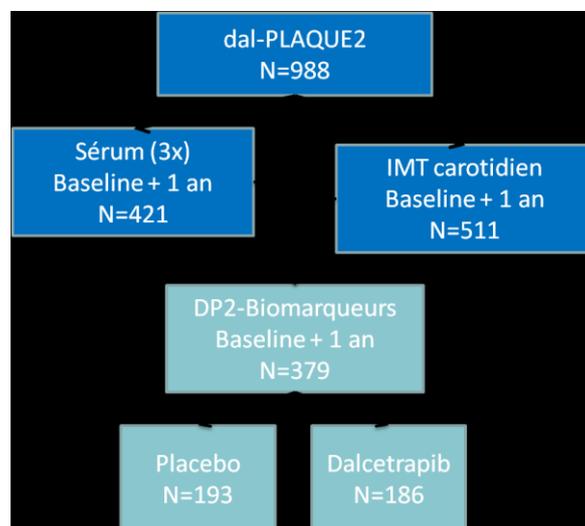


Figure 6: Diagramme de sélection des participants à la sous-étude (PCB n=193 et DAL n=186) à partir de la cohorte dal-PLAQUE2 (n=988) selon la disponibilité des prélèvements sériques ainsi que de l'imagerie carotidienne (calcul de la cIMT) au baseline et après 1 an de traitement.

3. Mesures effectuées, méthodes

3.1 Courbes concentration-effet

Afin d'identifier les concentrations de sérum à utiliser selon le type cellulaire, des courbes de concentration-effet ont été obtenues à partir d'essais d'efflux sur les trois types cellulaires (J774, BHK-ABCA1 et HepG2) vers des concentrations prédéterminées de différents pools de sérums humains déplétés en apoB. Ces essais ont été faits à partir de pools de sérums humains commerciaux (pool #6, SA1 et SB1, réalisés à partir de 20 sujets normolipidémiques) obtenus de la compagnie Bioreclamation (Huntsville, NY) et à partir d'un pool de sérums de la cohorte DP-2.

HepG2

Pour HepG2, il y a eu 3 essais d'efflux avec les différentes concentrations de pool de sérum humain #6 (0%; 1,4%; 2,8%; 4,2%; 5,6%; 7,0%; 9,8%; 14,0%) (voir Figure 7). Le K_D moyen obtenu était de 3,41%, donc nous avons choisi la concentration finale de sérum de 2,8% pour les essais d'efflux (voir Tableau V).

Tableau IV: Valeurs des B_{\max} et des K_D (moyennes, écarts-types et coefficients de variation) pour les cellules **HepG2** lors de 3 essais d'efflux différents sur le pool de sérum #6.

HepG2	B_{\max} (% d'efflux)	K_D (%)
	SR-B1-dépendant	SR-B1-dépendant
Moyenne	19,68	3,41
SD	0,87	1,06
%CV	4	31

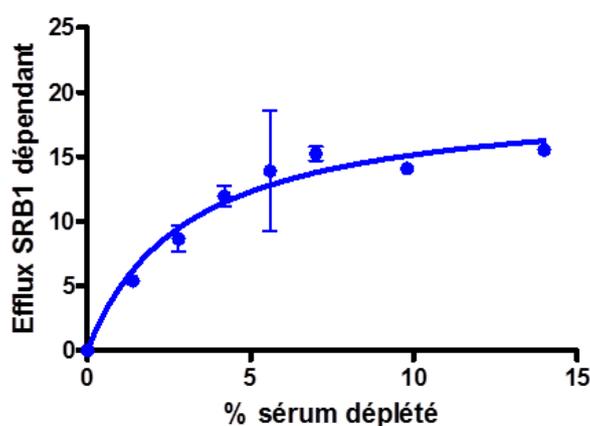


Figure 7: Courbe concentration-effet effectuée avec différentes concentrations du pool de sérum humain #6 déplété en apoB (0%; 1,4%; 2,8%; 4,2%; 5,6%; 7,0%; 9,8%; 14,0%) lors d'essai d'efflux de cholestérol sur les cellules HepG2 (moyenne de 3 expériences).

BHK-ABCA1

Pour les cellules BHK-ABCA1, il y a eu 4 essais d'efflux avec des concentrations de pool de sérum humain (0%; 0,35%; 0,7%; 1,4%; 2,8%; 5,6%; 7,0%; 9,8%) (voir Figure 8). La concentration finale choisie était en fonction des conditions stimulées afin d'éviter la saturation d'efflux de cholestérol durant l'essai lorsque les valeurs sont les plus élevées. Comme le K_D moyen pour la condition stimulée était de 1,01%, la concentration finale choisie était de 0,7% (voir Tableau VI).

Tableau V: Valeurs des B_{max} et des K_D (moyennes, écarts-types et coefficients de variation) pour les cellules **BHK-ABCA1** pour les conditions non-stimulée et stimulée avec mifepristone 20 nM ainsi que pour la composante ABCA1-dépendante calculée lors des 4 essais d'efflux différents sur les pools de sérum #6 et SA1.

BHK-ABCA1	B_{max} (% d'efflux)			K_D (%)		
	Non-stimulé	Stimulé	ABCA1-dépendant	Non-stimulé	Stimulé	ABCA1-dépendant
Moyenne	15,29	29,48	18,82	5,60	1,01	0,54
SD	4,63	2,39	2,09	1,77	0,46	0,46
%CV	30	8	11	32	45	85

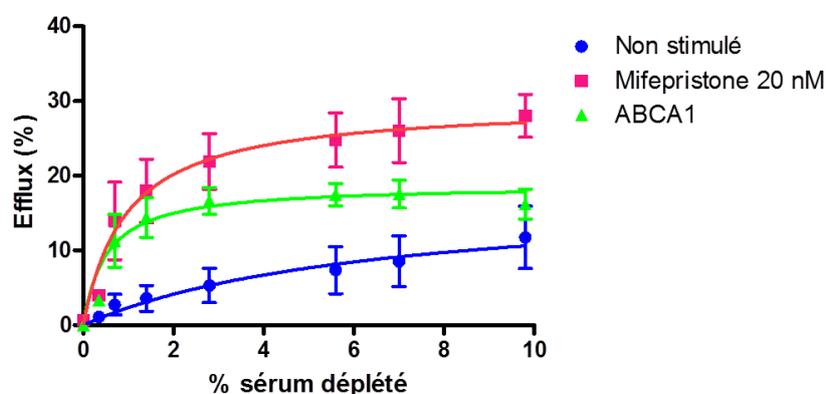


Figure 8: Courbe concentration-effet effectuée avec différentes concentrations des pools de sérum humain #6 et SA1 déplétés en apoB (0%; 0,35%; 0,7%; 1,4%; 2,8%; 5,6%; 7,0%; 9,8%) lors d'essai d'efflux de cholestérol sur les cellules BHK-ABCA1 (moyenne de 4 expériences).

J774

Pour J774, il y a eu 3 essais d'efflux avec différentes concentrations de pool de sérum humain (0%; 0,35%; 0,7%; 1,4%; 2,8%; 5,6%; 7,0% et 9,8%) (voir Figure 9). La concentration finale choisie était en fonction des conditions stimulées afin d'éviter la saturation d'efflux de cholestérol durant l'essai. Le K_D moyen est de 1,15%, donc nous avons choisi la concentration finale de 1,4%.

Après analyse des résultats, les concentrations choisies étaient de 2,8% pour les HepG2, de 0,7% pour les BHK-ABCA1 et finalement 1,4% pour les J774. En plus de la valeur de K_D obtenue, la sélection de la concentration de sérum dépendait de la quantité d'efflux obtenue, qui devait être mesurable facilement, donc distincte de la valeur obtenue après avoir soustrait la valeur d'efflux basale (en absence de sérum ou 0%) (voir Tableau VII).

Tableau VI: Valeurs des B_{max} et des K_D (moyennes, écarts-types et coefficients de variation) pour les cellules J774 pour les conditions non-stimulée et stimulée avec AMPc 0,3 mM lors de 3 essais d'efflux différents sur les pools de sérum #6 et SA1.

J774	B_{max} (% d'efflux)			K_D (%)		
	Non-stimulé	Stimulé	ABCA1-dépendant	Non-stimulé	Stimulé	ABCA1-dépendant
Moyenne	28,07	23,07	na	5,18	1,15	na
SD	8,54	3,62	na	1,77	0,14	na
%CV	30	16	na	34	12	na

Légende :

na : non applicable - les paramètres ABCA1-dépendant ne peuvent être obtenus car les deux courbes se croisent aux concentrations élevées et le B_{max} ne peut être calculé.

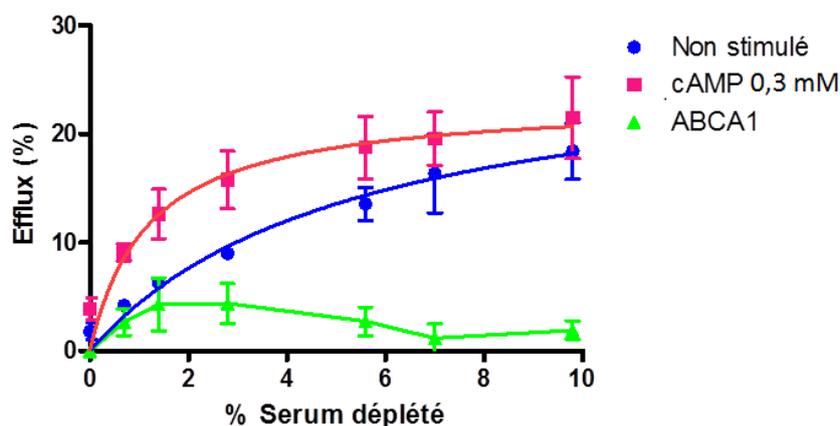


Figure 9: Courbe concentration-effet effectuée avec différentes concentrations des pools de sérum humain #6 et SA1 déplétés en apoB (0%; 0,35%; 0,7%; 1,4%; 2,8%; 5,6%; 7,0%; 9,8%) lors d'essai d'efflux de cholestérol sur les cellules J774 (moyenne de 3 expériences).

3.2 Essais d'efflux de cholestérol

Le protocole standardisé permet de calculer l'efflux fractionnel de ^3H -cholestérol libre des lignées cellulaires HepG2 (hépatocytes exprimant SR-BI humain endogène), BHK-ABCA1 (cellules de reins de jeunes hamsters exprimant l'ABCA1 humain inductible avec la mifepristone par le système GeneSwitch) et J774 (lignée macrophagique de souris Balbc n'exprimant pas l'apoE) vers les échantillons sériques sélectionnés de la cohorte DP2. À la fin de l'essai, le pourcentage d'efflux est calculé en divisant les comptes de ^3H dans le milieu par le nombre total de comptes (cellules et milieu). Un contrôle négatif (seulement du milieu de culture) est utilisé pour calculer l'efflux background en l'absence d'accepteurs. Le sérum témoin est un mélange de sérum de 30 volontaires sains et les calibrateurs HDL niveaux 2 et 3 sont 2 contrôles de qualité provenant de la compagnie

Siemens avec des quantités de HDL calculées. Le pool de sérums témoin est utilisé pour tous les types cellulaires afin d'établir le ratio Sujet X / Sérum témoin. De plus, vu la présence de HDL dans le sérum témoin, il permet de valider l'efflux avec les cellules HepG2. Comme le sérum témoin utilisé est toujours le même durant les séries d'essais, les valeurs d'efflux calculées sont de ce fait normalisées dans le temps. Le fait de rapporter les valeurs obtenues pour chacun des sujets au sérum témoin réduit la variabilité inter-essai, pour ces expériences qui se sont étalées sur 6 mois. L'utilisation de l'apoA-I comme contrôle de qualité avec les cellules J774 et BHK-ABCA1 permet de valider chaque essai. Tous les échantillons sériques ainsi que les contrôles sont déplétés en apoB immédiatement avant l'essai. Le tableau IV décrit les produits utilisés ainsi que les informations qui y sont reliées. Les trois souches cellulaires sontensemencées le Jour 1 dans des plaques 48 puits et incubées à 37°C avec 5% CO₂ jusqu'à obtention de la confluence requise, soit 72 heures (voir Tableau V pour les détails de conditions de cultures et d'essais d'efflux). Les cellules sont marquées avec le ³H-cholestérol libre le Jour 4. Le Jour 5, il y a équilibration des cellules et stimulation de l'ABCA1 avec ajout de mifepristone pour les cellules BHK-ABCA1 et cAMP pour les J774. La différence entre les valeurs d'efflux stimulé et non-stimulé permet d'obtenir l'efflux ABCA1-dépendant, donc de suivre spécifiquement l'induction de l'ABCA1 dans ces cellules. Après 16-18 heures d'incubation, l'essai d'efflux débute : les sérums et calibrateurs sont dilués selon les valeurs prédéterminées, les cellules sont mises en contact avec ces sérums et calibrateurs et incubées pour 4 heures. À la fin de cette incubation, les milieux sont récoltés et les cellules sont lysées avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH). Le calcul de pourcentage d'efflux peut être effectué. Pour l'apoA-I ainsi que pour le sérum témoin tous les résultats d'efflux ont été compilés et la moyenne ainsi que l'écart type ont été déterminés. Ensuite, pour que les essais soient considérés valides, les valeurs maximales et minimales des contrôles de qualité devaient être incluses dans la moyenne \pm 2 fois l'écart type. Les essais dans lesquels les valeurs obtenues pour l'un ou les deux contrôles étaient hors de cette limite ont été rejetés.

Tableau VII: Description des différents produits utilisés pour les essais d'efflux, compagnie de provenance, numéro de catalogue et concentration initiale.

Description du produit	Compagnie	Catalogue #	Concentration initiale
EMEM	MultiCell	350-005-CL	
DMEM	MultiCell	319-005-CL	Glucose 11 mM
DMEM sans phénol rouge	MultiCell	319-051-CL	Glucose 11 mM
FBS	Wisent	80150	Lot 115662
Pénicilline/Streptomycine	Sigma	P0781	100X
BSA sans acides gras, endotoxine faible	Sigma	A8806-5	
³ H-Cholestérol	Perkin Elmer	NET139005MC	1 mCi/mL (ethanol)
S58-035	Santa Cruz	Sc-215839A	5 mg/mL (DMSO)
Mifepristone	Sigma	M8046	50 µM (ethanol)
cAMP	Sigma	B7880	30 mM (water)
Calibrateur AHDL	Siemens	DC48B	
Cocktail de scintillation	MBio	882475	
Vials	Perkin Elmer	6008117	
Plaque de 48 puits	Costar	3548	
Plaque de 96 puits profonds	Greiner	VWR82051-228	

Tableau VIII: Synthèse des conditions utilisées pour la culture cellulaire et les essais d'efflux de cholestérol pour les trois types de cellules utilisées dans le cadre de la sous-étude DP2.

		HepG2	BHK-ABCA1	J774
Type de plaque		<i>plaque à 48 puits</i>		
Milieu de culture et suppléments		MEM 10% FBS+PS	MEM 10% FBS+PS	MEM 10% FBS+PS
Densité et volume des cellules sur plaques 72 h avant le marquage		38 000 cellules/cm ² 0,3 mL	14 000 cellules/cm ² 0,3 mL	10 000 cellules/cm ² 0,5 mL
Marquage avec ³ H-FC 2 µCi/mL		24 h à 37°C		
		0,3 mL MEM 1% FBS	0,3 mL in MEM 1% FBS +ACATi (S-58035) 2 µg/ml	0,5 mL in MEM 1% FBS + ACATi (S-58035) 2 µg/ml
Équilibration		18 h à 37°C		
		0,3 mL MEM 0,2% BSA	0,3 mL MEM 0,2% BSA + ACATi (S-58035) 2 µg/ml ± Mifepristone 20nM	0,5 mL MEM 0,2% BSA + ACATi (S-58035) 2 µg/ml ± cAMP 0,3mM
Efflux	% serum déplété	2,8% (K _D 4%)	0,7% (K _D 0,1%)	1,4% (K _D 1,4%)
	4 h à 37°C dans MEM sans rouge phénol + accepteur			
	Compter la radioactivité dans les surnageants			
	Compter la radioactivité dans les cellules			
Contrôles Internes				
Pool de sérum humain		2,8%	0,7%	1,4%
ApoA-I		na	10 µg/mL	10 µg/mL

Légende :

MEM : Minimal Essential Medium; **FBS** : Fetal bovine serum; **PS** : Penicillin-Streptomycin; **BSA** : bovine serum albumin; **ACATi** : inhibiteur de ACAT; **FC** : cholestérol libre (free cholesterol); **cAMP** : AMP cyclique; **K_D** : constante de dissociation; **na** : non applicable

3.3 Mesure de l'activité de la CETP

L'activité de la CETP a été mesurée avec l'ensemble Roar Biomedical (Cat. No. RB-EVAK version C100). En chambre noire, des particules de donneur (Réactif A) et d'accepteur (Réactif B) sont incubées avec une source de CETP (soit les sérums) résultant au transfert médié par la CETP de lipides neutres fluorescents du donneur vers l'accepteur. Ce transfert est déterminé par l'augmentation de l'intensité de la fluorescence lorsque le lipide est déplacé vers l'accepteur. Une solution de LPDS (*lipoprotein deficient serum* – sérum déficient en lipoprotéines) et un sérum témoin incubés avec du dalcetrapib sont utilisés comme contrôles de qualité afin de réaliser une courbe de référence. Une quantité de puits prédéterminée sert de blancs. L'activité nette de la CETP (une fois le blanc soustrait) est calculée pour chaque échantillon, permettant ainsi de démontrer l'inhibition de l'activité de la CETP avec le dalcetrapib. La détection de la fluorescence a été faite avec un lecteur multiplaque Multi-Mode Synergy H1 Hybrid de Bio Tek Instruments La normalisation des données se fait d'après les calculs suivants : Ratio d'activité de la CETP (LPDS ou sérum témoin, sans dalcetrapib) = Activité nette de la CETP de l'échantillon / Activité nette de la CETP (LPDS ou sérum témoin, sans dalcetrapib).

4. Résultats

4.1 Description de la cohorte

L'âge moyen du groupe DAL était de $61,2 \pm 8,4$ ans et de $59,9 \pm 8,9$ ans pour le groupe PCB. Les caractéristiques suivantes décrivaient les deux groupes: 73,3% d'hommes pour DAL vs 79,2% pour PCB; 95,7% de caucasiens DAL vs 95,9% pour PCB; indice de masse corporelle (kg/m^2) de $29,4 \pm 4,8$ pour DAL vs $30,4 \pm 5,7$ pour PCB; 62,9% de fumeurs actuels ou anciens pour DAL et 67,9% pour PCB. Bref, les deux groupes sont comparables au niveau statistique en termes démographiques (voir Tableau VIII).

Tableau IX: Caractéristiques démographiques pour la cohorte de l'étude pour les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).

Caractéristiques Démographiques	Dalcetrapib n=186	Placebo n=193
Âge, années (SD)	61,2 (8,4)	59,9 (8,9)
Homme, %	73,3	79,2
Caucasiens, %	95,7	95,9
Indice de masse corporelle, kg/m^2 (SD)	29,4 (4,8)	30,4 (5,7)
Fumeurs (actuels ou anciens), %	62,9	67,9

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

Certaines maladies concomitantes ciblées étaient présentes chez les deux groupes au baseline de façon équivalente (voir Tableau IX): CAD 78,5% pour DAL vs 74,6% pour PCB; maladie cérébrovasculaire 2,2% DAL vs 3,6% PCB; maladie artérielle carotidienne 2,2% DAL vs 5,7% PCB; maladie artérielle périphérique 2,7% DAL vs 2,1% PCB; anévrisme de l'aorte abdominale 1,1% DAL vs 2,1% PCB; insuffisance cardiaque 2,7% DAL vs 2,6% PCB; dyslipidémie 93,0% DAL vs 93,3% PCB et HTA 65,6% DAL vs 71,5% PCB.

Tableau X: Maladies concomitantes présentes chez la cohorte de la sous-étude dal-PLAQUE2 au baseline dans les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).

Histoire Médicale - baseline	Dalcetrapib n=186	Placebo n=193
Maladie coronarienne athérosclérotique, %	78,5	74,6
Maladie cérébrovasculaire, %	2,2	3,6
Maladie artérielle carotidienne, %	2,2	5,7
Maladie artérielle périphérique, %	2,7	2,1
Anévrisme de l'aorte abdominale, %	1,1	2,1
Insuffisance cardiaque, %	2,7	2,6
Dyslipidémie %	93,0	93,3
Hypertension, %	65,6	71,5

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

La médication concomitante était prise de la façon équivalente dans les deux groupes (voir Tableau X): antihypertenseurs (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II : 43,5% DAL vs 34,4% PCB; antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II : 22,0% DAL vs 19,2% PCB; bêta-bloqueurs : 72,6% DAL vs 71,5% PCB et bloqueurs des canaux calciques : 26,9% DAL vs 28,0% PCB); les agents anti-angineux étaient pris par 54,8% DAL vs 48,7% PCB; les agents antiplaquettaires par 78,0% DAL vs 71,0% PCB; l'acide acétylsalicylique par 97,3% DAL vs 92,7% PCB et finalement les statines par 95,7% DAL vs 96,9% PCB.

Tableau XI: Classes des différentes médications concomitantes prescrites chez la cohorte de l'étude au baseline dans les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).

Classes de Médications concomitantes - baseline	Dalcetrapib n=186	Placebo n=193
Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, %	43,5	34,4
Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, %	22,0	19,2
Bêta-bloqueurs, %	72,6	71,5
Bloqueurs des canaux calciques, %	26,9	28,0
Agents antiangineux, %	54,8	48,7
Agents antiplaquettaires, %	78,0	71,0
Acide acétylsalicylique, %	97,3	92,7
Statines, %	95,7	96,9

* Il n'y a aucune différence significative avec un test de Chi carré

4.2 Biochimie

L'activité de la CETP a été mesurée avec le kit Roar Biomedical (Cat. No. RB-EVAK version C100), par une méthode utilisant un substrat fluorescent en calculant l'activité CETP nette (une fois le blanc soustrait) pour chaque échantillon, qui permet ainsi de démontrer l'inhibition de l'activité de la CETP avec le dalcetrapib. Dans chaque essai, du dalcetrapib a été ajouté à un échantillon de sérum normal à titre de contrôle positif de l'inhibition de la CETP. Il y a eu normalisation des essais avec un sérum témoin pour l'ensemble de la cohorte. Le nombre d'échantillon testé pour l'activité de la CETP est plus petit ici car plusieurs échantillons n'atteignaient pas le volume minimal essentiel pour exécuter la mesure. Dans notre étude, l'activité de la CETP est diminuée de 19,2% (voir Tableau XI) dans le groupe DAL après 1 an de traitement. Un effet combiné des changements d'activité de CETP dans les 2 groupes (DAL vs PCB) cause une réduction de 30% de l'activité de la CETP dans le groupe DAL par rapport au groupe PCB. Comme le dalcetrapib est un CETPi, ce résultat était attendu. De ce fait, une augmentation du HDL-C devrait en découler car les EC demeurent un peu dans la fraction HDL. En effet, l'activité de la CETP est inversement corrélée avec la valeur de HDL-C dans le groupe DAL ($r=-0,29$, $p=0,0016$) mais non dans le groupe PCB ($p=0,39$).

Tableau XII: Changements après 1 an (en %) de l'activité de la CETP chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=122) et le groupe Placebo (n=142).

Activité CETP	Dalcetrapib n=122	Placebo n=142
	Changement à 1 an (%)	
Activité CETP (ratio du sérum contrôle)	-19,2 ***	13,2

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

Au niveau du profil des lipides plasmatiques, trois augmentations sont très significatives dans le groupe DAL vs PCB (voir Tableau XII). D'abord, la valeur de HDL-C est augmentée de 35,5% ($p < 0,001$) après 1 an, tel qu'attendu avec la diminution d'activité de la CETP décrite plus haut. Aussi, l'apoA-I est augmentée de 14,0% ($p < 0,001$) après 1 an ainsi que le cholestérol total de 15,9% ($p < 0,001$). De manière moins significative, Lp(a) a subi une légère diminution de 0,6% ($p < 0,05$), la valeur de TG a augmentée de 1,5% ($p < 0,05$) après 1 an dans le groupe DAL et la valeur de LDL-C calculée a augmentée de 10,8% ($p < 0,05$). Notons que la valeur de LDL-C calculée à partir de l'équation de Friedewald dans un contexte d'inhibition de CETP et lorsque le LDL est maintenu bas (tel qu'avec un traitement aux statines) peut être biaisée (Sniderman et al, 2003). De fait, si on considère le LDL-C mesuré directement, on constate que l'augmentation obtenue de 4,8% n'est pas significative.

Tableau XIII: Changements après 1 an (en %) des différents lipides mesurés chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).

Profil des lipides et des apolipoprotéines	Dalcetrapib n=186	Placebo n=193
	Changement à 1 an (%)	
Apolipoprotéine A-I	14,0 ***	3,0
Apolipoprotéine B	5,9	2,5
Lipoprotéine (a)	-0,6 *	-0,2
Cholestérol total	15,9 ***	3,2
HDL-cholestérol	35,5 ***	3,3
Non-HDL-cholestérol	7,5	3,2
LDL-cholestérol, mesuré	4,8	2,3
LDL-cholestérol, calculé	10,8 *	2,4
Triglycérides	1,5 *	8,9

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

Concernant la biochimie, la seule différence significative observée entre les deux groupes de traitement (DAL vs PCB) est une diminution de 14,5% ($p < 0,001$) de la bilirubine après 1 an de traitement au dalcetrapib, tel qu'illustré dans le Tableau XIII. Cette différence n'était pas prévisible au vu des connaissances sur la CETP et le dalcetrapib. Les autres concentrations de substances mesurées ne semblent pas différer entre les deux groupes. Les données n'ont pas été log-transformées.

Tableau XIV: Changements après 1 an (en %) des différentes données biochimiques mesurées chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).

Biochimie	Dalcetrapib n=186	Placebo n=193
	Changement à 1 an (%)	
Bilirubine totale	-14,5 ***	-1,6
Créatinine	-1,4	-0,6
Glucose	-0,4	2,3
Insuline	3,0	6,5
Protéine C réactive (hsCRP)	-11,9	-39,5
Fructosamine (albumine glyquée)	-0,6	1,2

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

Tel qu'illustré dans le Tableau XIV, on ne note aucun changement significatif au niveau de la masse de LCAT et de la masse de myéloperoxydase (MPO) entre les deux groupes DAL et PCB. Rappelons que l'enzyme LCAT est responsable de l'augmentation de la taille des particules HDL en estérifiant le FC de leur surface en EC hydrophobes, qui migrent vers le centre de la particule HDL (Ikonen, 2008; Tall et al, 2008; Calabresi et al, 2009; Santos-Gallego et al, 2011; Soran et al, 2012). Le dalcetrapib ne semble pas avoir d'effet sur la concentration de LCAT. La MPO est une enzyme sécrétée par les leucocytes activés lors de l'inflammation et est un marqueur du risque cardiovasculaire. La MPO se lie à l'apoA-I des particules HDL et favorise des modifications oxydatives covalentes et l'inactivation fonctionnelle de celle-ci (Smith, 2010; Huang et al, 2013). Le dalcetrapib ne semble pas jouer sur les concentrations de MPO car le changement en % à 1 an de MPO n'est pas significatif entre les deux groupes.

Tableau XV: Changements après 1 an (en %) des masses de LCAT et MPO mesurées par ELISAs chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).

Biochimie (suite)	Dalcetrapib n=186	Placebo n=193
ELISAs	Changement à 1 an (%)	
LCAT, masse	5,7	2,4
MPO, masse	4,3	1,7

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

4.3 Profil lipidique réalisé par RMN

Le profil lipidique réalisé par RMN permet d'obtenir un portrait de la distribution des tailles (en nanomètre) et de la concentration (μM ou $\mu\text{mol/L}$) des classes et sous-classes de lipoprotéines (Rosenson et al, 2011; Matyus et al, 2015). On peut remarquer une petite augmentation de la concentration des particules HDL totales de 5,3% ($p < 0,01$) après 1 an dans le groupe DAL, causée majoritairement par une augmentation des grosses HDL (68,7%; $p < 0,001$) aux dépens des petites HDL (-9,1%; $p < 0,001$). La concentration des particules de taille moyenne semble être demeurée sensiblement la même, l'augmentation notée n'étant pas significative. En moyenne, la taille des HDL-P a augmenté de 5,2% ($p < 0,001$) après 1 an dans le groupe DAL. Aussi, le traitement au dalcetrapib résulte en une diminution potentiellement bénéfique des LDL-P (*low density lipoprotein particles* - particules de LDL) car on observe clairement une diminution des petites particules LDL (-19,7%; $p < 0,001$) et une augmentation des grosses particules LDL (37,5%; $p < 0,01$) (Williams et al, 2014) (voir Tableau XV).

Tableau XVI: Changements après 1 an (en %) de différentes valeurs mesurées du profil lipidique réalisé par RMN chez la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=179) et le groupe Placebo (n=178).

Profil lipidique réalisé par RMN	Dalcetrapib n=179	Placebo n=178
	Changement à 1 an (%)	
Concentration totale des particules HDL	5,3 **	2,1
Grosses particules HDL	68,7 ***	9,7
Moyennes particules HDL	4,5	2,0
Petites particules HDL	-9,1 ***	0,4
Diamètre moyen des particules HDL	5,2 ***	0,4
Concentration totale des particules LDL	-3,1 **	2,1
IDL	16,1	7,5
Grosses particules LDL	37,5 **	11,2
Petites particules LDL	-19,7 ***	-1,5
Diamètre moyen des particules LDL	1,2 ***	0,4

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

4.4 Coefficients de variation globaux selon le modèle cellulaire d'efflux et effet de la normalisation avec le sérum témoin

Les coefficients de variation globaux (CV) en pourcentage (illustrés dans le Tableau XVI) ont été calculés à partir des valeurs d'efflux sur une cohorte différente de celle utilisée pour la présente étude, soit sur des sujets de la Biobanque de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM) (1000 témoins et 1000 cas, ces derniers ayant eu un infarctus). Nous voulions démontrer que les mesures obtenues avec des plasmas humains présentaient des valeurs inférieures de CV lorsqu'une normalisation avec le sérum témoin était faite, pour chaque modèle cellulaire. On observe que pour les modèles cellulaires HepG2 et J774, le CV (%) après ajustement est plus petit (de plus de 3%) qu'avant la normalisation. Puisque les valeurs d'efflux ABCA1-dépendant sont obtenues par soustraction de l'efflux basal à l'efflux stimulé, il est normal que les CV (%) d'ABCA1-dépendant soient plus élevés que les CV (%) basal et stimulé. Par contre, lorsque l'on regarde les valeurs associées aux cellules BHK en situation basale, on peut voir que les CV (%) varient beaucoup plus que chez les autres types cellulaires, qui sont comparables entre les cas et les témoins (avant et après normalisation). Aussi, chez BHK, les CV (%) ne sont pas plus faibles après la normalisation

avec le sérum témoin (valeurs en rouge), elles sont en effet plus élevées. Même si la culture cellulaire est facile avec le modèle BHK, ces cellules sont moins stables pour les essais d'efflux dans la situation basale, et la normalisation avec le sérum ne parvient pas à réduire cette caractéristique. Cependant, l'effet recherché est obtenu avec les cellules BHK stimulées pour exprimer l'ABCA1, et comme cette variable influence beaucoup le calcul de la composante ABCA1-dépendante, la normalisation est effectuée pour cette lignée cellulaire aussi.

Tableau XVII: Coefficients de variation (CV) globaux de la capacité d'efflux de cholestérol des sujets de la cohorte Biobanque avant et après normalisation avec le sérum témoin selon les trois modèles cellulaires utilisés.

Modèle cellulaire	CV (%) ¹		CV (%) après Normalisation ²	
	Cas	Contrôles	Cas	Contrôles
HepG2, non stimulée	19,7	18,1	15,3	16,0
J774, basale	18,7	19,4	14,6	15,7
J774, stimulée (avec AMPc)	18,8	18,5	13,3	13,6
J774, ABCA1-dépendant	30,9	30,8	24,1	24,8
BHK, basale	17,7	19,2	19,7³	23,6³
BHK, stimulée (avec mifepristone)	24,4	23,8	21,6	22,2
BHK, ABCA1-dépendant	32,2	31,5	28,0	28,1

¹ Basé sur des valeurs de coefficients d'efflux de cholestérol (CEC) non normalisées

² Basé sur des valeurs CEC normalisées (ratio de sérum témoin)

³ **%CV plus élevé après la normalisation**

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

4.5 Capacité d'efflux de cholestérol

Les capacités d'efflux ont été calculées en augmentation absolue, soit en soustrayant les ratios 1AN – baseline. Il n'y a donc pas d'unité associée à ces augmentations. Pour les cellules HepG2, on obtient une augmentation absolue dans le groupe DAL (0,089; $p < 0,001$) de la capacité d'efflux de cholestérol de plus de trois fois la valeur du groupe PCB (0,023) (augmentation relative de 2,4% dans le groupe PCB vs 9,2% dans le groupe DAL). Comme les cellules HepG2 expriment le SR-BI humain (Rhainds et al, 2003) et que les grosses HDL-P ont augmenté de près de 70% ($p < 0,001$) avec le traitement au dalcetrapib, ce résultat est attendu, mais est plus modeste que la hausse du taux de HDL-C.

Pour les cellules J774, les changements absolus de CEC sont augmentés significativement pour l'efflux total (0,066; $p < 0,001$) et l'efflux basal (0,162; $p < 0,001$), mais l'augmentation absolue

pour l'efflux ABCA1-dépendant n'est pas significative. Par contre, la valeur d'augmentation absolue dans le groupe DAL est presque le double de celle du groupe PCB pour l'efflux ABCA1-dépendant (0,024 vs 0,013), ce qui suggère une tendance d'augmentation d'efflux par ABCA1.

Le même schéma se dessine pour les cellules BHK-ABCA1. Les valeurs absolues de CEC après 1 an de traitement sont toutes augmentées de manière significative. Les valeurs relatives sont par contre toutes les mêmes (légèrement supérieures à 16%) pour les efflux total, basal et ABCA1-dépendant. Cette augmentation semble dépendante de l'augmentation de l'apoA-I (14,90%; $p < 0,001$) et de HDL-C (35,5%; $p < 0,001$). Comme dans le cas de J774, la valeur absolue d'efflux ABCA1-dépendant est le double dans le groupe DAL vs le groupe PCB (0,051, $p < 0,01$ vs 0,025), ce qui suggère aussi une tendance d'augmentation d'efflux via ABCA1. Dans le cas de BHK, cette augmentation est significative, ce qui suggère que la hausse avec J774 est peut-être réelle.

Tableau XVIII: Changements absolus après 1 an de traitement au dalcetrapib des capacités d'efflux de cholestérol des trois modèles cellulaires utilisés pour la cohorte de l'étude dans le groupe Dalcetrapib (n=186) et le groupe Placebo (n=193).

Capacités d'efflux de cholestérol	Dalcetrapib n=186	Placebo n=193
Type cellulaire, voie (ratio du sérum contrôle)	Changement absolu à 1 an	
HepG2, efflux SR-BI-dépendant	0,089 ***	0,023
J774, efflux total	0,066 ***	0,023
Efflux basal	0,162 ***	0,048
Efflux ABCA1-dépendant	0,024	0,013
BHK-ABCA1, efflux total	0,072 ***	0,027
Efflux basal	0,194 ***	0,043
Efflux ABCA1-dépendant	0,051 **	0,025

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

4.6 Mesure de l'épaisseur de l'intima-média carotidienne

Concernant les valeurs de cIMT mesurées pour les patients de la cohorte après 1 an de traitement, il n'y a aucun changement absolu significatif au niveau des épaisseurs de l'intima-media (voir Tableau XVIII). Une analyse dans le temps confirme cette absence de changement pour les 4 valeurs de cIMT mesurées, soit les cIMT moyennes pour la valeur composite et carotides communes ainsi que les cIMT maximales pour la valeur composite et carotides communes. La valeur composite est une moyenne des valeurs de tous les segments mesurés (Stein et al, 2004). Donc, une baisse de l'activité de CETP, suivie d'une hausse de HDL-C, n'a pas d'effet sur la valeur de

cIMT en présence d'une thérapie selon les normes de soins. De plus, le dalcetrapib ne semble pas avoir d'effet sur cette variable lorsqu'il n'y a pas de stratification sur la base de certains variants génétiques, tel que démontré par Tardif et al (2015) et détaillé plus bas dans la Discussion (section 5 de mon étude).

Tableau XIX: Changements absolus après 1 an de traitement de la valeur de cIMT (tous les segments et carotides communes) pour les groupes Dalcetrapib (n=186) et Placebo (n=193).

Épaisseur de l'intima-media carotidienne (cIMT)	Changement absolu de cIMT à 1 an (mm ²)		T test
	Placebo (n=186) ± SD	Dalcetrapib (n=193) ± SD	Valeur-p
cIMT Moyenne (composite)	-0,0005 ± 0,0531	0,0015 ± 0,0608	0,98
cIMT Maximale (composite)	0,0012 ± 0,0614	0,0028 ± 0,0691	0,85
cIMT Moyenne (carotides communes)	0,0016 ± 0,0545	0,0006 ± 0,0666	0,78
cIMT Maximale (carotides communes)	0,0009 ± 0,0693	0,0002 ± 0,0737	0,89

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

5. Discussion

L'objectif principal de cette étude était de décrire l'effet du dalcetrapib sur la fonction et la structure des HDL dans un sous-groupe de sujets représentatifs de la cohorte DP2. Rappelons que les deux groupes DAL et PCB de cette cohorte sont équivalents en termes de données sur l'histoire médicale, la médication concomitante prescrite et la biochimie au baseline. Trois objectifs secondaires ont été atteints afin de décrire l'effet du dalcetrapib. Premièrement, une étude des données biochimiques sélectionnées, telles le profil des lipides et apolipoprotéines, la biochimie plasmatique générale et les protéines reliées aux HDL, a été réalisée. Ensuite, les concentrations des sous-classes de lipoprotéines de la cohorte ont été étudiées en RMN. Le profil lipidique réalisé par RMN permet d'obtenir un portrait de la distribution des tailles et de la concentration des classes et sous-classes de HDL en additionnant les signaux de 26 sous-populations de HDL. Comme la précision des mesures est limitée pour plusieurs des sous-populations, elles sont souvent classées en « grosses », « moyennes » et « petites » particules HDL (Rosenson et al, 2011; Matyus et al, 2015). Comme les préβ-HDL sont qualifiées de très petites et qu'elles ne contiennent pas beaucoup de lipides, leur signal ne semble pas être détecté par la RMN (Rosenson et al, 2013). Finalement, la compétence du sérum à accepter le cholestérol de deux voies d'efflux, soit via les HDL (avec les cellules HepG2 et les efflux basaux de J774 et BHK-ABCA1) et vers les préβ-HDL (avec les

cellules J774 et BHK-ABCA1 stimulées pour l'ABCA1), a été étudiée comme marqueur de la fonction des HDL dans le TIC.

5.1 Biochimie plasmatique

5.1.1 Activité de la CETP

L'activité de la CETP était diminuée de 19,2% ($p < 0,001$) dans le groupe DAL après 1 an de traitement. Un effet combiné des changements d'activité de CETP dans les 2 groupes cause une réduction de 30% dans le groupe DAL par rapport au groupe PCB. Le changement d'activité de CETP est plutôt faiblement corrélé avec le changement de HDL-C dans le groupe DAL ($r=-0,29$, $p=0,0016$), mais pas de manière significative dans le groupe PCB ($p=0,39$). Dans les études cliniques de phase II synthétisées par Rhainds et al. (2012a), l'activité de la CETP diminue de 13 à 51%. Donc, on peut conclure que le dalcetrapib diminue l'activité de la CETP de manière significative et ce, selon les valeurs attendues dans le cadre de notre sous-étude.

5.1.2 Protéines impliquées dans la fonction des HDL

Au niveau des protéines impliquées dans la fonction des HDL, les masses de LCAT et MPO sont demeurées semblables dans les deux groupes. L'augmentation de la concentration des grosses particules HDL n'est donc pas causée par une augmentation de la quantité de la LCAT. Concernant la MPO, l'apoA-I n'a pu être modifiée par cette enzyme car la masse ne semble pas être affectée par le dalcetrapib. Toutefois, d'autres facteurs pourraient rendre ces enzymes plus efficaces et hausser leur activité enzymatique sans en modifier la masse. Nous n'avons toutefois pas mesuré cette activité dans le cadre de cette étude.

5.1.3 Bilirubine

Au niveau de la biochimie plasmatique, la seule différence significative entre les groupe DAL et PCB après un an de traitement est une diminution de la bilirubine de 14,5% dans le groupe DAL. Une hypothèse pouvant expliquer la diminution de la mesure de la bilirubine dans le groupe DAL de 14,5% est que le dalcetrapib agirait négativement sur l'enzyme hème oxygénase-1 (HO-1) dans les macrophages, seule source de production de la bilirubine (Khurana, 2006). HO-1 convertit l'hème des globules rouges en biliverdine, qui pourra être transformée à son tour en bilirubine. HO-1 joue un rôle antioxydant et protecteur dans les maladies vasculaires, dont l'athérosclérose, en inhibant la prolifération des SMC dans la lésion (Wang et Patterson, 2015). Le dalcetrapib, en diminuant l'expression de HO-1, diminuerait donc la quantité de bilirubine produite et causerait cette baisse de 14,5% ($p < 0,001$) observée dans le groupe DAL versus PCB. Une seconde hypothèse

se permettant d'expliquer cette diminution observée dans le groupe DAL serait que le dalcetrapib induirait l'expression du gène UGT1A1, codant pour l'enzyme bilirubine-UGT au niveau hépatique. Cette enzyme assure la glucuronidation de la bilirubine et permet sa dissolution et son élimination par le foie (Genetics Home Reference, 2012).

5.2 Profil des lipides plasmatiques

Plusieurs différences significatives entre les groupes DAL et PCB sont apparues après un an de traitement au dalcetrapib 600 mg *per os die*.

5.2.1 Augmentation des taux de HDL-C

Une augmentation du taux de HDL-C de 35,5% ($p < 0,001$) a été atteinte dans le groupe DAL après 1 an de traitement. Cette augmentation correspond aux valeurs attendues, soit des augmentations d'HDL-C par rapport au baseline de plus de 30% dans les études de phase II réalisées avec un traitement au dalcetrapib 600 mg *per os die* d'une durée variant entre 4 semaines et 24 mois, et est causée par l'augmentation du nombre de particules HDL de grande taille, riches en EC (Niesor et al, 2010; Rhainds et al, 2012a; Tardif et al, 2015). En effet, les grosses particules HDL ont augmenté de 68,7% ($p < 0,001$) dans le groupe DAL de notre étude. Chez les patients déficients en CETP ou traités avec un CETPi, on note des niveaux plus élevés de particules HDL riches en apoE, permettant à ces dernières de transporter plus d'EC et donc de subir une expansion de leur cœur lipidique. Ceci mène à une augmentation de la taille de ces particules et donc une augmentation du nombre de grosses particules HDL (Rosenson et al, 2011).

Afin d'assurer une élimination nette de cholestérol via les selles, cette élévation de HDL-C associée au dalcetrapib se doit d'être accompagnée d'une augmentation de la voie directe du TIC (via les HDL), étant donné que le LDL-C ne diminue pas en présence de dalcetrapib (Rhainds et al, 2012a). Chez un modèle de hamster, Niesor et al. (2010) ont observé une augmentation significative de l'excrétion fécale de stérols neutres et d'acides biliaires marqués au ^3H après un traitement au dalcetrapib 100 mg *bid*. Jusqu'à ce jour, ce type d'étude n'a pas été effectué chez l'humain avec le dalcetrapib. Brousseau et al. (2005) ont démontré, à partir d'une étude de clairance des HDL chez l'humain, que le torcetrapib n'a pas d'effet sur l'excrétion fécale de stérols. Concernant l'élimination hépatique, Schwartz et al. (2004) ont réalisé une petite étude avec 13 participants consistant en l'injection de LP (VLDL, IDL, LDL et HDL) marquées afin d'identifier et de quantifier les voies importantes *in vivo* de transport des EC chez l'humain. D'après leurs résultats, environ 85% de l'élimination hépatique irréversible des EC se fait via des LP contenant de l'apoB

(VLDL, IDL et LDL), soit par la voie indirecte du TIC, à laquelle la CETP participe en transférant les EC des HDL vers les LDL en échange de TG. Les CETPi, par exemple le dalcetrapib, empêchent ce transfert d'EC des HDL vers des LDL et favoriseraient la voie directe du TIC. Dans notre étude, un traitement au dalcetrapib ne paraît pas augmenter la voie directe du TIC. En effet, il semble que les EC demeurent dans la fraction HDL puisqu'une augmentation de 35,5% de HDL-C est observée. Tel que démontré par Brousseau et al. (2005), le torcetrapib n'augmente pas la production d'apoA-I mais diminue plutôt sa clairance en favorisant l'acquisition d'EC par les particules HDL, leur permettant de demeurer en circulation plus longtemps. La fraction HDL-C augmente car les particules HDL augmentent en taille et ne se libèrent pas au niveau hépatique de leur contenu en EC. Avec le dalcetrapib, cela suggère que les particules HDL ne participent pas à l'élimination nette des EC, demeurent en circulation plus longtemps dans le plasma humain et que leur possible effet bénéfique clinique ne serait pas dépendant de leur contenu en EC.

5.2.2 Augmentation de l'apoA-I

On note une augmentation de 14% ($p < 0,001$) de l'apoA-I dans le groupe DAL après 1 an de traitement. Les augmentations moyennes rapportées par Rhainds et al (2012a) par rapport au baseline varient entre 10 et 19% dans 7 études de phase II, dont 5 études d'une durée de 4 semaines et 1 d'une durée de 12 semaines de traitement au dalcetrapib 600 mg *per os die*. Cette hausse de 14% d'apoA-I serait en fait une conséquence de la diminution de son catabolisme causée par une augmentation du contenu en EC des HDL-P et donc une augmentation de la taille des HDL-P pouvant contenir jusqu'à 4 à 5 molécules d'apoA-I (deGoma & Rader, 2012; Rader & deGoma, 2014).

5.2.3 RMN

En général, la concentration de particules HDL totales a augmenté de 5,3% ($p < 0,01$) après 1 an de traitement au dalcetrapib. Plus spécifiquement, on observe une augmentation de 68,7% ($p < 0,001$) de la concentration des HDL de grande taille et une diminution de 9,1% ($p < 0,001$) de la concentration des petites HDL, avec une augmentation du diamètre moyen des particules HDL de 5,2% ($p < 0,001$) après 1 an de traitement au dalcetrapib. Le remodelage des HDL par le transfert des EC des HDL₃ vers les HDL₂ est conservé avec un traitement au dalcetrapib (Niesor et al, 2010). Par contre, une étude plus récente par Johns et al. (2015) rapporte qu'*in vitro* ce transfert est inhibé par le dalcetrapib. Cela suggère un maintien des HDL de grandes tailles au détriment du recyclage d'apoA-I dans la formation de petites HDL riches en protéines et interagissant avec ABCA1, d'où une perte de la fonction protectrice des HDL dans le TIC, tel que proposé par Niesor (2015).

5.2.4 Augmentation des taux de LDL-C et de cholestérol total

Comme la valeur d'apoB n'est pas diminuée après 1 an de traitement, que la valeur de LDL-C mesurée directement n'est pas augmentée ni diminuée et que l'augmentation de 10,8% ($p < 0,05$) de LDL-C calculée à partir de l'équation de Friedewald peut être biaisée dans un contexte d'inhibition de la CETP et lorsque le LDL-C est maintenu bas lors d'une thérapie avec les statines (Sniderman et al, 2003), on peut affirmer qu'il n'y a probablement pas de hausse de l'élimination nette de cholestérol. Toutefois, on note un changement dans la distribution de taille des particules LDL, soit une augmentation des grosses particules LDL et une diminution des petites particules LDL, dites athérogènes. Théoriquement, cela pourrait être un avantage du dalcetrapib, mais les études antérieures n'ont pas démontré d'effet protecteur du dalcetrapib au niveau des événements cardiovasculaires (voir la section sur le programme Dal-HEART).

Comme l'apoE est aussi retrouvée sur une fraction des HDL (Pownall et Gotto, 1999) et lui permet de s'associer au LDLr au niveau du foie pour retirer ces particules de la circulation (Ikonen, 2008), une augmentation de HDL-C et des valeurs stables de LDL-C et d'apoB peuvent être un indice de saturation du LDLr, d'où l'augmentation notable de HDL-C. Il a été proposé que l'augmentation de l'apoE chez les patients traités avec un CETPi empêche la libération de lipase hépatique, diminuant ainsi l'hydrolyse des HDL et leur affinité pour le SR-BI au niveau du foie (Rosenson et al, 2011) et favorisant une compétition avec les LDL pour sa liaison avec les LDLr hépatiques. Aussi, une étude réalisée par Dong et al (2014) rapporte une diminution de l'expression du gène *LDLR* via la voie SREPB2 chez des hépatocytes humains et murins en culture primaire exposés aux inhibiteurs de CETP anacetrapib, torcetrapib et evacetrapib. Cet effet pourrait permettre d'expliquer l'augmentation du cholestérol total et du HDL-C et les valeurs neutres de LDL-C, mais selon cet article, le dalcetrapib n'a pas cet effet sur cette voie. Il semble donc que le dalcetrapib influence le profil des particules LDL par un autre mécanisme.

Finalement, comme la valeur de HDL-C a augmenté de 35,5% ($p < 0,001$) dans le groupe DAL après 1 an de traitement, il est n'est pas surprenant d'observer une augmentation de la valeur de cholestérol total de 15,9% ($p < 0,001$) simultanément.

5.3 Capacité d'efflux de cholestérol du sérum humain

Au niveau des cellules HepG2, pour la voie d'efflux dépendante du SR-BI, les valeurs obtenues correspondent aux résultats attendus pour ce modèle. Dans une étude d'efflux réalisée par Asztalos et al. (2005) les cellules hépatiques Fu5AH, exprimant SR-BI tout comme les cellules HepG2

(Rhainds et al, 2003), effluent vers les moyennes et grosses particules HDL. Au baseline, l'efflux des cellules HepG2 dépend des grosses et moyennes particules HDL (Figure 11) et est directement proportionnel à la valeur de HDL-C (Figure 10). Comme le dalcetrapib a pour effet d'augmenter la taille moyenne des particules HDL (5,2%) ainsi que la quantité des grosses particules HDL (67,8%), il est normal que l'efflux de HepG2 ait augmenté après 1 an de traitement versus le groupe PCB. Par contre, l'augmentation absolue de la CEC dans le groupe DAL (0,089) de plus de trois fois la valeur du groupe PCB (0,023) demeure beaucoup plus petite que la hausse des grosses particules HDL. Cela suggère que la compétence de ces particules HDL ne serait pas augmentée suite à un traitement au dalcetrapib.

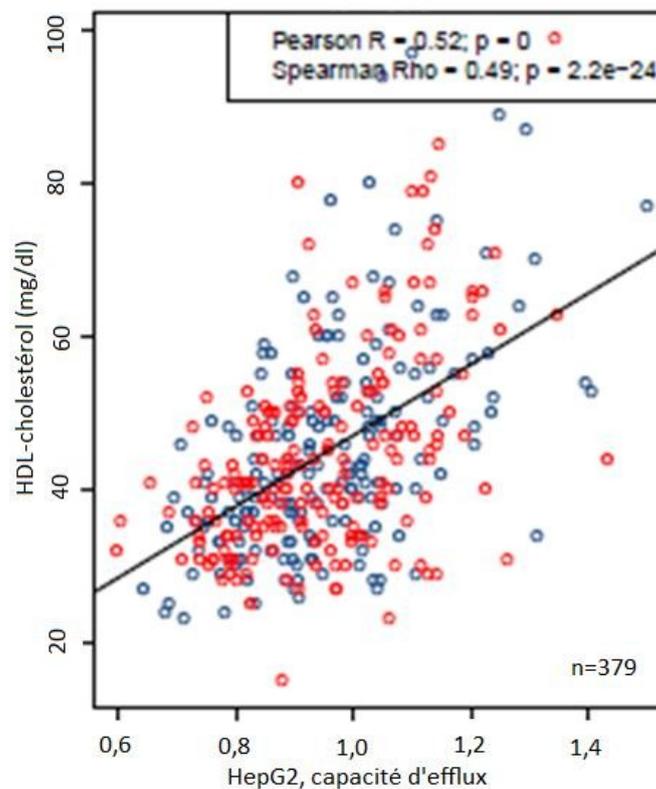


Figure 10: Corrélation entre la capacité d'efflux de cholestérol des cellules HepG2 et la valeur de HDL-C au baseline (n=379, PCB et DAL).

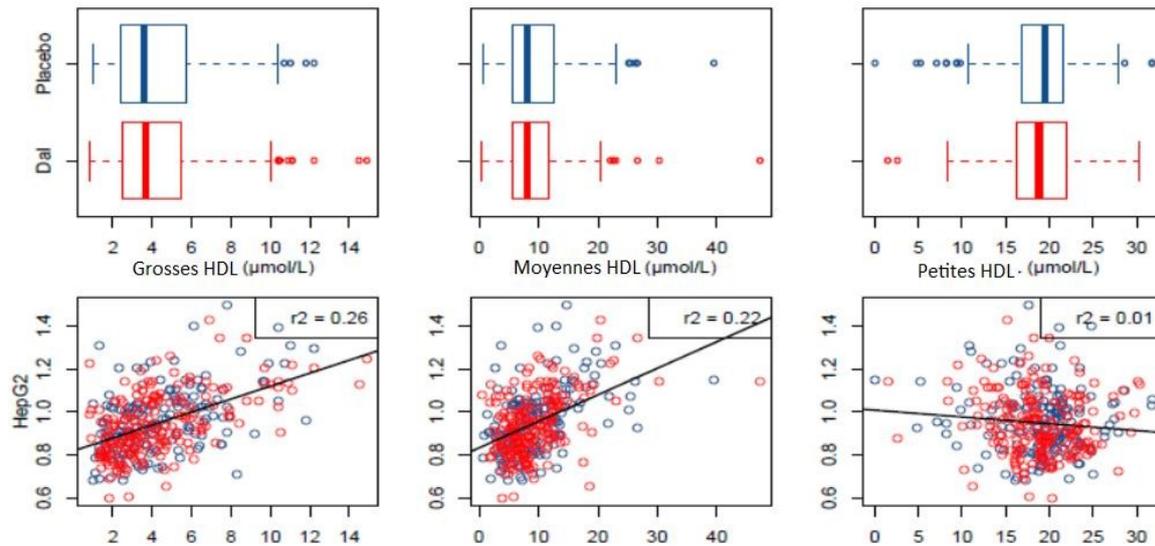


Figure 11: Corrélations entre les concentrations des sous-classes de particules HDL (grosses, moyennes et petites) et les capacités d’efflux de cholestérol des cellules HepG2 au baseline (n=379, PCB et DAL).

Pour les cellules BHK, les efflux basal, stimulé et ABCA1-dépendant sont tous corrélés positivement avec le taux de HDL-C (Figure 12). Cette observation peut être due au fait que les particules HDL seraient corrélées à une plus grande quantité de préβ-HDL, qui ne sont pas détectées par la RMN (Rosenson et al, 2013). Pour la corrélation avec les différentes sous-classes de HDL, les efflux basal et stimulé sont corrélés avec les grosses et moyennes particules HDL tandis que l’efflux ABCA1-dépendant est positivement corrélé avec les moyennes particules HDL (Figure 13). Avant le traitement au dalcetrapib, il ne semble pas y avoir d’efflux spécifique important via ABCA1 par les cellules BHK vers les LP attendues, soit les HDL de petite taille. Comme le traitement au dalcetrapib est associé à une augmentation de l’apoA-I de 14% ($p < 0,001$), il est normal que l’efflux ABCA1 par les cellules BHK soit augmenté car ce transporteur efflue vers les préβ-HDL contenant de l’apoA-I (Santos-Gallego et al, 2011). Aussi, il est possible que les HDL remodelées durant l’essai participent à l’efflux via les autres transporteurs exprimés par les cellules BHK-ABCA1, par exemple SR-BI, tel que mesuré par Western blot dans notre laboratoire (données non-publiées). Par exemple, si les grosses HDL sont remodelées en préβ-HDL et HDL moyennes durant l’essai, ces nouvelles préβ-HDL feraient l’efflux via ABCA1 tel qu’attendu et les moyennes particules via la voie SR-BI. La corrélation observée entre les moyennes HDL et l’efflux ABCA1-dépendant serait en fait une corrélation indirecte entre les nouvelles préβ-HDL et l’efflux ABCA1-dépendant mesuré.

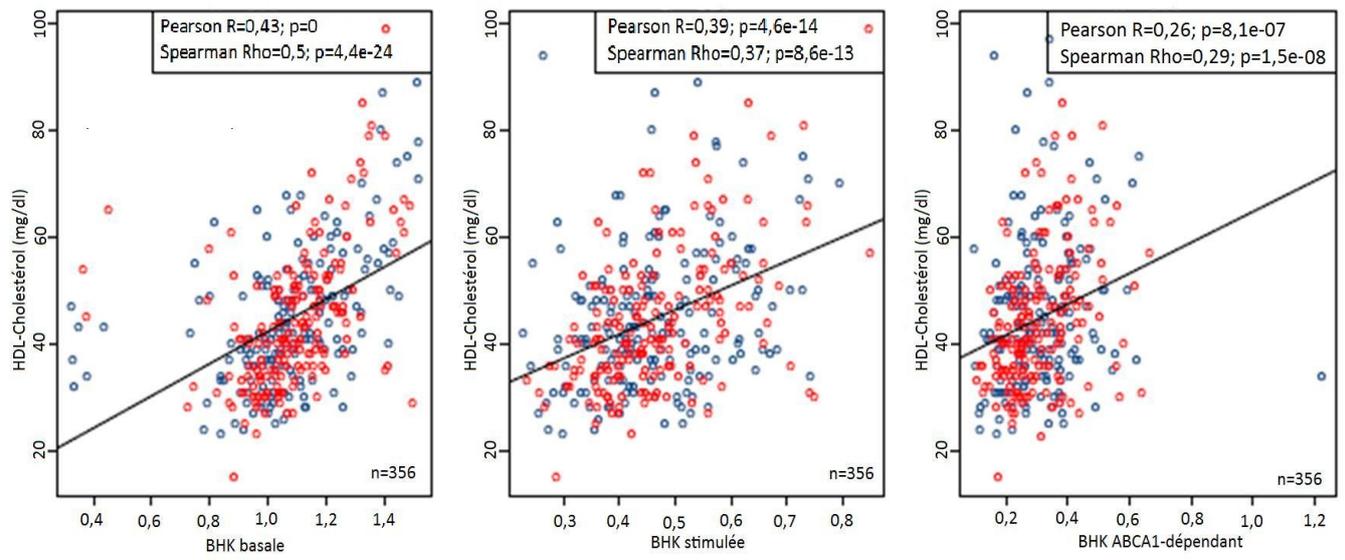


Figure 12: Corrélations entre les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules BHK-ABCA1 et les valeurs de HDL-C à baseline (n=356, PCB et DAL).

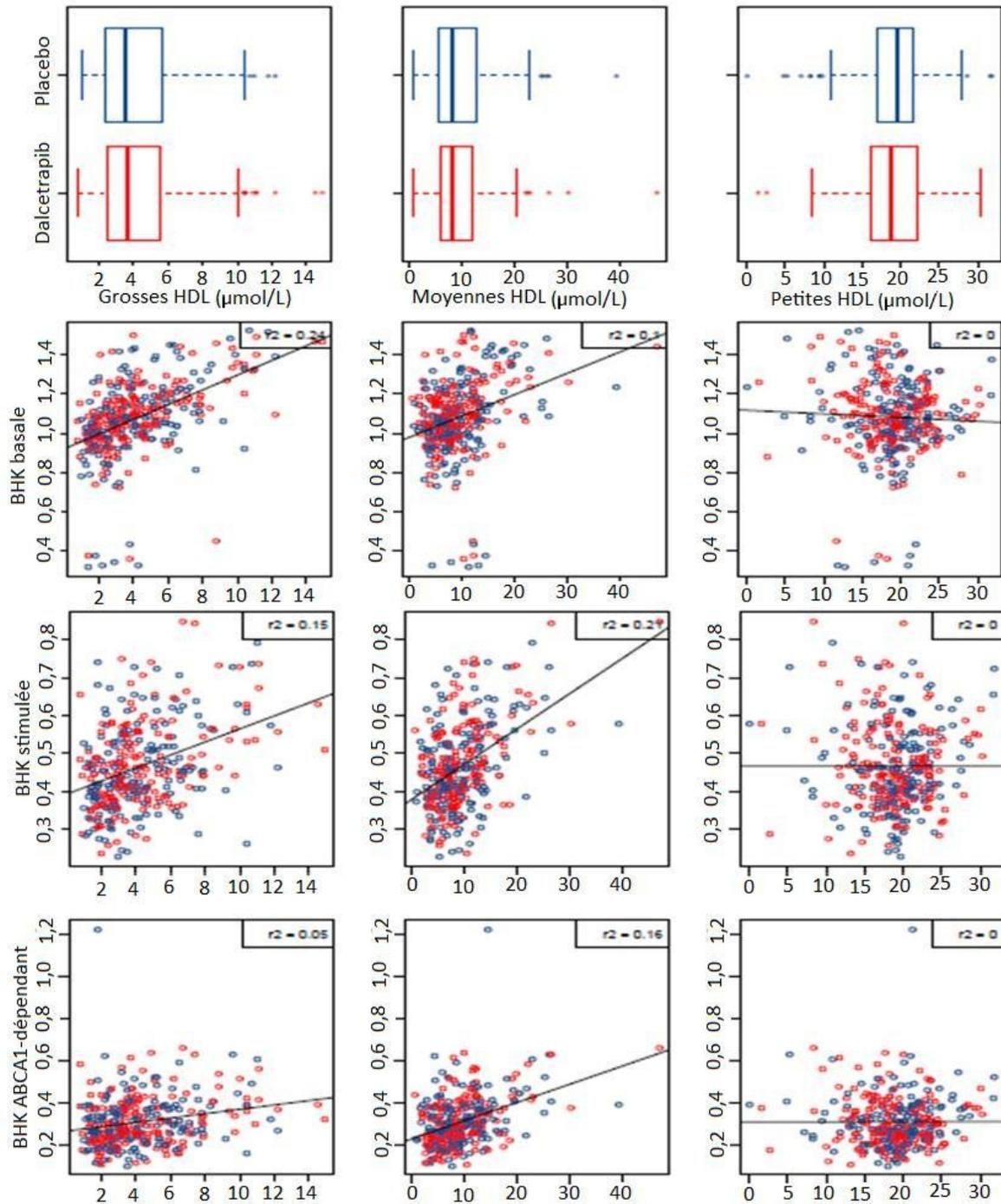


Figure 13: Corrélations entre les concentrations des sous-classes de particules HDL (grosses, moyennes et petites) et les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules BHK-ABCA1 au baseline (n=356, PCB et DAL).

Au baseline, les valeurs d'efflux basal et stimulé des J774 sont positivement corrélées avec la concentration de HDL-C ($r=0,59$; $p = 0$ et $r=0,46$; $p = 0$ respectivement). Cette corrélation demeure, quoique faible, lorsque l'efflux ABCA1-dépendant est considéré ($r=0,1$; $p = 0,046$) (Figure 14). Au niveau des particules HDL, J774 basal et stimulé semble effluer vers les moyennes et grosses

particules HDL, ce qui est attendu puisque J774 exprime naturellement SR-BI (Sark et al, 1999) et ABCG1 (Wang et al, 2007). Lorsque l'efflux ABCA1-dépendant est considéré, il n'y a pas de corrélation avec des particules HDL de taille particulière mesurées par la RMN (Figure 15). Dans l'étude d'efflux réalisée par Asztalos et al. (2005), les macrophages J774 exprimant ABCA1 effluent vers les pré β -HDL, les particules les plus efficaces pour interagir avec l'ABCA1 (Rosenson et al, 2011). Tel que proposé par Niesor (2015), le fait que le dalcetrapib favorise le développement de particules HDL de moyenne et grande taille au détriment du recyclage d'apoA-I peut expliquer l'efflux plutôt faible via ABCA1 par les cellules J774.

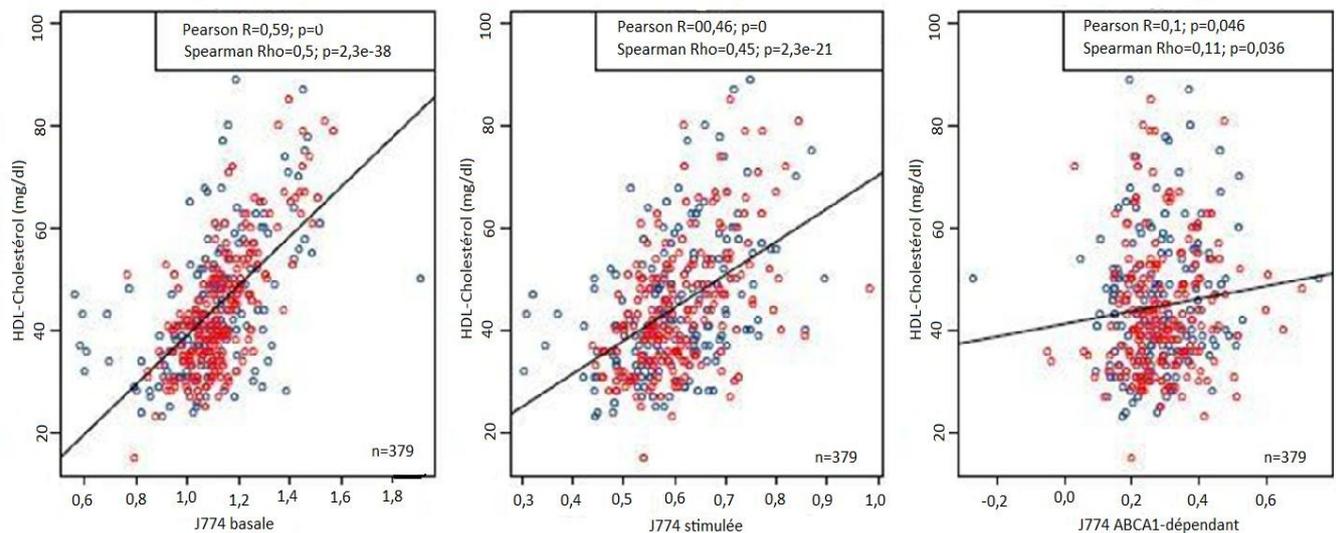


Figure 14: Corrélations entre les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules J774 et les valeurs de HDL-C au baseline (n=379, PCB et DAL).

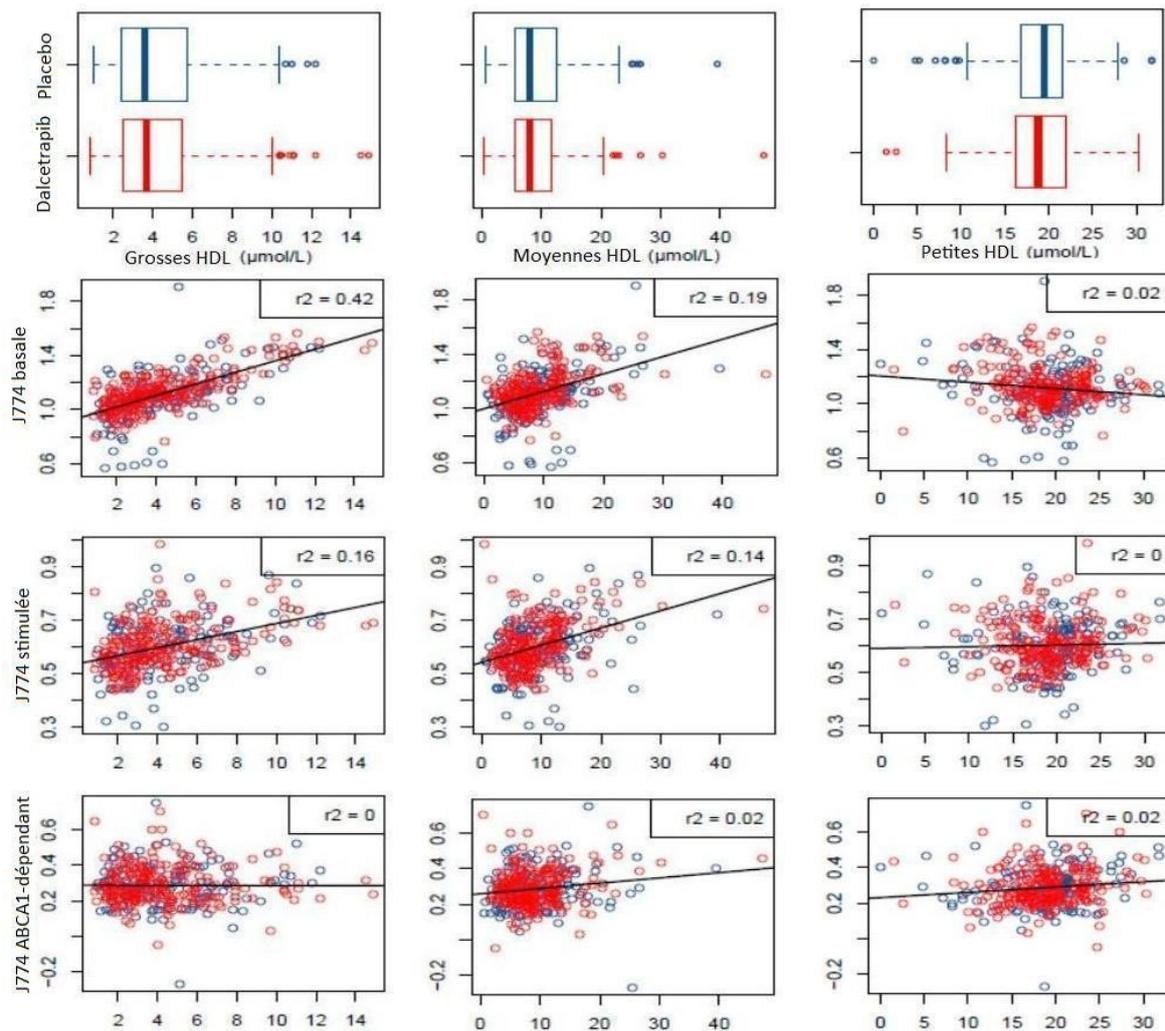


Figure 15: Corrélations entre les concentrations des sous-classes de particules HDL (grosses, moyennes et petites) et les capacités d'efflux de cholestérol basal, stimulé et ABCA1-dépendant des cellules J774 au baseline (n=379, PCB et DAL).

Niesor et al. (2010) ont démontré que le dalcetrapib maintient ou augmente la formation des préβ-HDL en ajoutant des concentrations supra physiologiques de CETP durant l'incubation de plasma humain *in vitro*. Suite à des essais d'efflux de cholestérol avec des plasmas de la cohorte dal-ACUTE, Ray et al. (2014) rapportent une absence d'effet sur la concentration de préβ-HDL et sur l'augmentation d'efflux via ABCA1. Malgré l'augmentation de HDL-C d'environ 30%, les augmentations d'apoA-I et d'efflux total n'étaient que d'environ 10%. Les résultats d'efflux obtenus avec notre cohorte sont donc superposables. Une hausse d'efflux basal, ou hausse de fonction des particules HDL, de 12% demeure isolée: les particules HDL ne sont augmentées que de 5,3%, la quantité de particules LDL et le taux de LDL-C sont demeurés les mêmes malgré le traitement au dalcetrapib. Cette hausse bénéfique de 12% de l'efflux pourrait avoir un effet positif sur le risque

cardiovasculaire mais une conséquence néfaste du dalcetrapib pourrait facilement la contrecarrer. Par exemple, le dalcetrapib pourrait avoir une influence négative sur les autres mécanismes cardioprotecteurs des particules HDL, soit antiinflammatoire, antithrombotique, antioxidante et améliorant la fonction endothéliale, qui ne sont pas associés directement au taux de HDL-C.

5.4 Facteurs métaboliques à considérer

De Grooth et al. (2004) ont revu la relation entre la CETP et l'athérosclérose. Ils ont conclu qu'il était impératif d'explorer les facteurs métaboliques individuels qui pourraient jouer sur les effets positifs d'une inhibition de la CETP. Tanigawa et al. (2007) ont amené une hypothèse intéressante sur l'inhibition de la CETP suite à leur expérience reliant l'expression forcée (transgénique) de la CETP chez les souris, la clairance des EC via le LDLr et le TIC. Chez les individus normolipidémiques, l'élimination des EC via SR-BI est basse donc la voie indirecte du TIC est essentielle: une inhibition de la CETP serait néfaste dans ce contexte. Chez les patients présentant une diminution de la clairance des particules LDL via LDLr, par exemple dans les cas d'hypercholestérolémie familiale, la voie indirecte peut être proathérogène car les EC transférés aux LP-apoB ne sont pas éliminés rapidement/en quantité suffisante. La voie directe, favorisée par une inhibition de la CETP pourrait leur être favorable. Par contre, chez les patients présentant une voie indirecte via apoB efficace (par exemple ceux traités avec une forte dose de statines), l'inhibition de la CETP n'offrirait aucune protection supplémentaire. Dans notre cohorte, plus de 95% des patients, tous hyperlipidémiques sans hypercholestérolémie familiale, sont traités par des statines selon le *standard of care* médical (voir Tableau X et les critères de sélection de l'échantillon section 2 de la Sous-étude de biomarqueurs de dal-Plaque2). Selon l'hypothèse émise par Tanigawa et al. (2007), les critères de sélection des patients de l'étude dal-PLAQUE2, et donc de notre sous-étude, n'étaient pas appropriés pour espérer voir un effet bénéfique d'un traitement au dalcetrapib sur la fonction et la structure des HDL. Pour qu'un CETPi soit favorable au patient, il devrait avoir des effets positifs sur les particules HDL et LDL en présence d'une thérapie concomitante aux statines, puisqu'il y a eu, seulement qu'en 2006 au Canada, 23,6 millions de prescriptions de ce traitement (Rosenberg & Allard, 2005). Tel que discuté plus haut, le dalcetrapib est dépourvu d'effet sur la quantité de particules LDL (apoB et concentration totale). Il se doit donc d'avoir des effets positifs sur les particules HDL pour compenser. Or, une hausse modeste de fonction des HDL ainsi qu'une faible augmentation de leur concentration sont obtenues et peuvent être facilement contrecarrées par d'autres effets négatifs du dalcetrapib, tel que la modification d'autres apolipoprotéines contenues dans les HDL (Ray et al, 2014).

Les inhibiteurs de CETP semblent influencer la distribution d'apoE dans la fraction HDL. Des essais d'efflux sur des macrophages THP-1 ont démontré qu'avec un traitement au torcetrapib 60 mg, l'inhibition de la CETP était de 35% et la hausse d'apoE demeurait modeste (1,1x) tandis qu'avec une dose de 120 mg l'inhibition de l'activité de CETP atteignait 53% et était associée à une hausse de l'apoE de 1,7x (Yvan-Charvet et al, 2007). Chez les patients traités au dalcetrapib de la cohorte Dal-ACUTE (Ray et al, 2014), le groupe PCB a vu sa concentration sérique d'apoE diminuer après leur syndrome coronarien aigu, contrairement au groupe DAL chez qui la concentration sérique d'apoE est demeurée stable dans le temps. L'apoE, retrouvée sur les grosses HDL formées suite à l'exposition au dalcetrapib, favoriserait plutôt l'efflux via ABCG1 (Rosenson et al, 2011). L'ABCG1, transporteur exprimé par les macrophages dont J774, promeut l'efflux vers les HDL matures (Santos-Gallego, 2008). Chez les macrophages humains, une augmentation du cholestérol cellulaire régule à la hausse l'expression d'ABCG1 (Klucken et al, 2000; Cavelier et al, 2006). Lors des essais d'efflux, l'étape de gorgement en cholestérol des cellules J774 pourrait favoriser l'expression d'ABCG1, d'où les corrélations positives d'efflux basal et stimulé avec les grosses et moyennes HDL-P. Aussi, l'apoE peut lier le LDLr et favoriser la clairance des HDL du plasma. Ainsi, les HDL sont éliminées précocement et ne participent plus au TIC (Talayero et al, 2014).

De plus, l'obésité, soit un indice de masse corporelle (IMC) égal ou supérieur à 30 (Santé Canada, 2012), est associée à des HDL contenant plus d'apoE et d'apoC-III, toutes deux associées à la maladie cardiovasculaire (Talayero et al, 2014). Plus précisément, l'apoE est associée à la maladie coronarienne et l'apoC-III pourrait prédire une augmentation du risque cardiovasculaire et, à de grandes concentrations, inhiber le remodelage normal des HDL (Gaudet et al, 2015; Talayero et al, 2014; Soran et al, 2012). L'apoC-III provoque une réponse inflammatoire et proathérogène chez les cellules impliquées dans le développement de l'athérosclérose (Jensen et al, 2012). Dans le groupe DAL, l'IMC moyen est de 29,4 et dans le groupe PCB de 30,4 (voir Table VIII). Comme beaucoup de sujets de notre cohorte sont obèses, les particules HDL contiennent probablement, au baseline, plus d'apoE que la normale, donc la voie d'efflux vers les sérums de ces patients qui serait plutôt favorisée serait ABCG1.

5.5 Aspects pharmacogénomiques de la thérapie avec le dalcetrapib

Cette idée que les CETPi seraient bénéfiques à certains patients et non à d'autres a été poursuivie par Tardif et al. (2015). Malgré l'augmentation d'environ 30% du HDL-C suite à un traitement au dalcetrapib, les études dal-OUTCOMES et dal-PLAQUE2 ont été stoppées pour leur futilité. L'étude pharmacogénomique réalisée par Tardif et al. (2015) a permis d'établir que le génotype AA (allèle

mineur) du polymorphisme rs1967309 sur le gène *ADCY9* conférait à ses porteurs une réduction de 39% des événements cardiovasculaires apparus dans le groupe DAL vs PCB et que les patients présentant le génotype GG (allèle majeur) présentaient une augmentation de 27% des événements dans le groupe DAL vs PCB (voir Figure 16). Précédemment, il a été démontré que certains polymorphismes au niveau du gène *ADCY9* affectaient la réponse individuelle au traitement inhalé chez les patients asthmatiques (Kim et al, 2011) et plus récemment que des variants génétiques de ce locus sont reliés à l'IMC et aux classes d'obésité (Berndt et al, 2013).

Le gène *ADCY9* code pour l'enzyme adénylate cyclase de type 9, exprimée dans de nombreux tissus et catalysant la formation d'AMPc à partir d'ATP (GeneCards, 2015). Il est connu que l'AMPc augmente l'expression d'ABCA1 chez les macrophages (Oram et al, 2000) et aussi chez les fibroblastes de peau humains (Haidar et al, 2002). Si l'expression du transporteur ABCA1 est augmentée chez les porteurs du génotype AA, il y aurait plus d'efflux de cholestérol vers les pré β -HDL par les macrophages et donc une réduction de l'accumulation de cholestérol dans les parois artérielles, ce qui diminuerait le risque cardiovasculaire. Ceci suppose que le génotype AA augmente l'expression d'*ADCY9* et par le fait même, la production d'AMPc dans certains types cellulaires.

En ce qui concerne la cIMT dans la cohorte dal-PLAQUE2, Tardif et al. (2015) ont démontré qu'au niveau du polymorphisme rs2238448, les patients homozygotes pour l'allèle mineur traités au dalcetrapib présentaient une protection contre les événements cardiovasculaires et une régression de la valeur de cIMT, contrairement aux patients homozygotes pour l'allèle majeur. Cependant, des questions demeurent concernant le rôle du polymorphisme d'*ADCY9*. Contrairement à ce qui serait attendu, les patients homozygotes pour l'allèle dominant (GG) du polymorphisme rs1967309 de cette étude de pharmacogénomique présentent, au niveau plasmatique, la plus faible augmentation de cholestérol total et les plus grandes diminutions des valeurs de LDL-C et TG, toutes mesurées après 1 mois de traitement au dalcetrapib et comparativement aux autres génotypes (GA et AA). De plus, ces patients au génotype GG ont subi les plus grandes pertes de poids et diminution de leur IMC par rapport aux autres génotypes de la cohorte, dans le groupe DAL, toujours après 1 mois de traitement. Ces résultats sont surprenants, car ils sont à l'inverse de ce qui serait attendu quand on considère que le génotype qui semble "protéger" des événements cardiovasculaires est AA. Par contre, considérant les patients chez qui une condition chronique (telle la maladie cardiovasculaire) est bien établie, ceux avec un IMC de 25 à 40 kg/m² présenteraient de meilleurs pronostics face à leur condition que les patients avec IMC <18,5 kg/m². Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce paradoxe de l'obésité : 1) chez les insuffisants cardiaques,

les patients obèses présentent moins d'inflammation que les patients minces car le tissu adipeux, qui produit plus de récepteurs à cytokines, neutraliserait l'effet de molécules proinflammatoires sur le myocarde; 2) le phénotype des patients obèses les placeraient en premier plan pour recevoir et chercher de l'aide, ils bénéficieraient de plus de prévention que les patients minces et changeraient le cours de leur maladie; 3) l'hémodynamie des obèses hypertendus est particulière : augmentation du débit cardiaque, augmentation du volume sanguin et diminution de la résistance vasculaire systémique qui résulterait en un meilleur pronostic au niveau de l'hypertension vasculaire; 4) les idées sont conflictuelles concernant le fait que l'obésité est synonyme d'augmentation des risques vasculaires mis à part les dérangements métaboliques et finalement 5) l'IMC ne serait pas le meilleur outil pour évaluer les risques de santé associés à l'obésité : le ratio taille-hanche ou la mesure du gras viscéral seraient plus appropriés (Uretsky et al, 2007). De plus, une perte de poids significative est associée à une mortalité augmentée, tandis que le gain de poids n'est pas un élément de prédiction de la mortalité (Doehne, 2014).

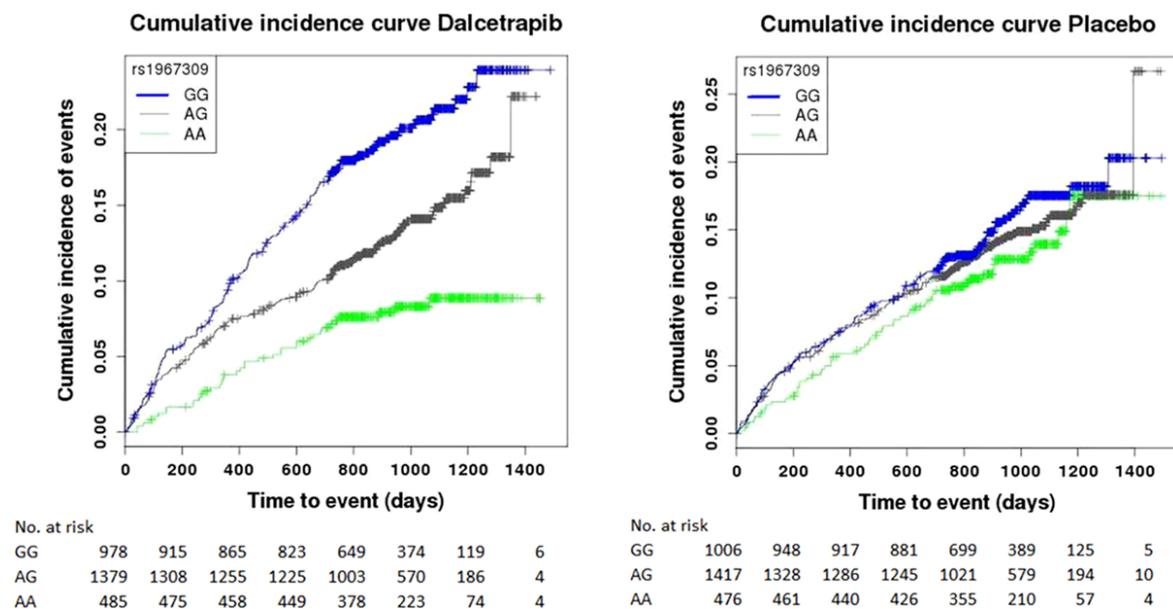


Figure 16: Incidence cumulative des événements cardiovasculaires pour les groupes dalcetrapib et placebo séparément et stratifiés par les trois génotypes du SNP rs1967309 dans le gène ADCY9 (tirée de Tardif et al, 2015).

En concluant, comme l'efflux par HepG2 dépend de SR-B1, la hausse relative de 9,2% après 1 an de traitement serait due à l'augmentation de la taille des particules HDL suite au traitement au dalcetrapib. En ce qui concerne les modèles J774 et BHK-ABCA1, l'état actuel de nos connaissances implique une nouvelle variable, soit le polymorphisme au niveau du gène ADCY9, codant pour

une enzyme qui pourrait modifier l'expression d'ABCA1. La faible tendance d'augmentation d'efflux ABCA1-dépendant pour ces deux types cellulaires pourrait mieux se définir en considérant cette variable. Comme les différents génotypes n'ont pas été considérés dans notre étude, on ne peut conclure que le dalcetrapib n'a pas d'effet sur l'efflux vers l'apoA-I des pré β -HDL. Il serait important de stratifier les valeurs de CEC pour les différents génotypes et aussi d'utiliser une méthode déterminant le profil lipidique en incluant la mesure des pré β -HDL afin de mieux quantifier l'efflux ABCA1-dépendant, l'étape cruciale du TIC.

RÉFÉRENCES

Abifadel M, Guerin M, Benjannet S, Rabès JP, Le Goff W, Julia Z, Hamelin J, Carreau V, Varret M, Bruckert E, Tosolini L, Meilhac O, Couvert P, Bonnefont-Rousselot D, Chapman J, Carrié A, Michel JB, Prat A, Seidah NG, Boileau C. Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2012; 223: 394-400.

Agence de la santé publique du Canada [Internet]. Ottawa; Agence de la santé publique du Canada. [Mis à jour 23 Juillet 2010; cité 09 Février 2015]. Six types de maladies cardiovasculaires; [1 écran]. Disponible à partir de : <http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/cvd-mcv/mcv-cvd-fra.php>

Ainsworth CD, Blake CC, Tamayo A, Beletsky V, Fenster A, Spence, JD. 3D ultrasound measurements of change in carotid plaque volume: a tool for rapid evaluation of new therapies. *Stroke*. 2005; 36(9): 1904-1909.

Al-Shali K, House AA, Hanley AJG, Khan HMR, Harris SB, Mamakeesick M, Zinman B, Fenster A, Spence JD, Hegele RA. Differences between carotid wall morphological phenotypes measured by ultrasound in one, two and three dimensions. *Atherosclerosis*. 2005; 178: 319-325.

Annema W, Tietge UJF. Regulation of reverse cholesterol transport – a comprehensive appraisal of available animal studies. *Nutrition and Metabolism*. 2012; 9: 25.

Asztalos BF, de la Llera-Moya M, Dallal GE, Horvath KV, Schaefer EJ, Rothblat GH. Differential effects of HDL Subpopulations on Cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2005; 46: 2246-2253.

Baldán Á, Bojanic DD, Edwards PA. The ABCs of sterol transport. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl: S80-S85.

Ballantyne CM, Miller M, Niesor EJ, Burgess T, Kallend D, Stein EA. Effect of dalcetrapib plus pravastatin on lipoprotein metabolism and high-density lipoprotein composition and function in dyslipidemic patients: Results of a phase IIB dose-ranging study. *AHJ*. 2012; 163(3): 515-521.

Berndt SI, Gustafsson S, Mägi R, Ganna A, Wheeler E, Feitosa MF, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 11 new loci for anthropometric traits and provides insights into genetic architecture. *Nat Genet*. 2013; 45: 501–512

Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of high-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med*. 2012; 4: 251-268.

Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, et al. Relationship of paraoxanase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systematic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA*. 2008; 299: 1265-1276.

Bielicki JK, Johnson WJ, Weinberg RB, Glick JM, Rothblat GH. Efflux of lipid from fibroblasts to apolipoproteins: dependence on elevated levels of cellular unesterified cholesterol. *J Lip Res*. 1992; (33): 1699-1709.

Boekholdt SM, Kuivenhoven JA, Wareham NJ, Peters RJG, Jukema JW, Luben R, Bingham SA, Day NE, Kastelein JJP, Khaw KT. Plasma Levels of Cholesteryl Ester Transfer Protein and the Risk of Future Coronary

Artery Disease in Apparently Healthy Men and Women: The Prospective EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition)–Norfolk Population Study. *Circulation*. 2004; 110: 1418-1423.

Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer LJ, McNeish J, Francone OL. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J of Biol Chem*. 2000; 275:28634-28640.

Bots ML, Visseren FL, Evans GW, Riley WA, Revkin JH, Tegeler CH, Shear CL, Duggan WT, Vicari RM, Grobbee DE, Kastelein JJ (for the RADIANCE-2 Investigators). Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. *The Lancet*. 2007; 370(9582): 153-160.

Brousseau ME, Diffenderfer MR, Millar JS, Nartsupha C, Asztalos BF, Welty FK, Wolfe ML, Rudling M, Björkhem I, Angelin B, Mancuso JP, Digenio AG, Rader DJ, Schaef EJ. Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition on High-Density Lipoprotein Subspecies, Apolipoprotein A-I Metabolism, and Fecal Sterol Excretion. *ATVB*. 2005; 25: 1057-1064.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science, New Series*. 1986; 232(4746): 34-47.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell*. 1997; 89(3): 331-340.

Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells and blood. *PNAS*. 1999; 96(20): 11041-11048.

Burnett JR, Wilcox LJ, Huff MW. Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibition and hepatic apolipoprotein B secretion. *Clinica Chimica Acta*. 1999; 286: 231-242.

Calabresi L, Favari E, Moleri E, Adorni MP, Pedrelli M, Costa S, Jessup W, Gelissen IC, Kovanen PT, Bernini F, Franceschini G. Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1): 141-146.

Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature Reviews*. 2012; 13: 213-224.

Cannon CP, Shah S, Dansky HM, Davidson M, Brinton EA, Gotto Jr AM, Stepanavage M, Liu SX, Gibbons P, Ashraf TB, Zafarino J, Mitchel Y, Barter P. Safety of Anacetrapib in Patients with or at High Risk for Coronary Heart Disease. *NEJM*. 2010; 363: 2406-2415.

Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1761(7):655-666.

Chang TY, Chang CCY, Lin S, Yu C, Li BL, Miyazaki A. Roles of acyl-coenzyme A:acyltransferase-1 and -2. *Curr Opin Lipidol*. 2001; 12: 289-296.

Chapman MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 111(3): 893-908.

Cortes VA, Busso D, Mardones P, Maiz A, Arteaga A, Nervi F, Rigotti A. 2013. Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2013; 88(4): 825-43.

Creider JC, Hegele RA, Joy TR. Niacin: another look at an underutilized lipid-lowering medication. *Nature Reviews.* 2012; 8: 517-528.

Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?. *Circulation.* 2006; 113: 2548-2555.

deGoma EM, deGoma RL, Rader DJ. Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels: evaluating high-density lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches. *JACC.* 2008; 51(23): 2199-2211.

deGoma EM, Rader DJ. High-density Lipoprotein particle number: a better measure to quantify High-density Lipoprotein?. *JACC.* 2012; 60(6): 517-520.

De Grooth GJ, Klerkx AHM, Stroes ESG, Stalenhoef AFH, Kastelein JJP, Kuivenhoven JA. A Review of CETP and its Relation to Atherosclerosis. *J Lip Res.* 2004; 45: 1967-1974.

De la Llera-Moya M, Atger P, Paul JL, Fournier N, Moatti N, Giral P, Friday KE, Rothblat G. A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994; 14: 1056-1065.

De la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, Cuchel M, Rader DJ, Rothblat GH. The Ability to Promote Efflux Via ABCA1 Determines the Capacity of Serum Specimens With Similar High-Density Lipoprotein Cholesterol to Remove Cholesterol From Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2010; 30: 796-801.

Denis M, Bissonnette R, Haidar B, Krimbou L, Bouvier M, Genest J. Expression, regulation and activity of ABCA1 in human cell lines. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2003; 78(4): 265-27.

Doehne W. Critical appraisal of the obesity paradox in cardiovascular disease: How to manage patients with overweight in heart failure? *Heart Fail Rev.* 2014; 19: 637-644.

Dong B, Singh AB, Fung C, Kan K & Liu J. CETP inhibitors downregulate hepatic LDL receptor and PCSK9 expression in vitro and in vivo through a SREBP2 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 2014; 235: 449-462.

Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004; 86(11): 839-848.

Eli Lilly [Internet]. Indianapolis: Eli Lilly and Company; c2015 [mis à jour 12 Octobre 2015; cité 12 Octobre 2015]. Mediaroom; [1 écran]. Disponible à partir de: <http://lilly.mediaroom.com/index.php?s=9042&item=137476>

Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *JACC.* 2006; 47(8): C7-C12.

Fayad ZA, Mani V, Woodward M, Kallend D, Bansilal S, Pozza J, Burgess T, Fuster V, Rudd JHF, Tawakol A, Farkouh ME. Rationale and design of dal-PLAQUE: A study assessing efficacy and safety of dalcetrapib on progression or regression of atherosclerosis using magnetic resonance imaging and 18F fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography. *American Heart Journal*. 2011; 162(2): 214-221.

The FIELD Study Investigators. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *The Lancet*. 2005; 366(9500): p1827-1902.

Fielding PE, Fielding CJ, Havel RJ, Kane JP, Tun P. Cholesterol net transport, esterification, and transfer in human hyperlipidemic plasma. *J Clin Invest*. 1983; 71: 449-460.

Fogelstrand P, Borén J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2012; 22(1): 1-7.

Foufelle F, Hegarty B, Bobard A, Hainault I, Bossard P, Ferré P. Un nouveau rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique. *Médecine/Sciences*. 2005; 21(6-7): 569-571.

Franceschini G, Sirtori CR, Capurso 2nd A, Weisgraber KH, Mahley RW. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest*. 1980; 66: 892-900.

Gaudet D, Alexander J, Baker F, Brisson D, Tremblay K, Singleton W, Geary RS, Hughes SG, Viney NJ, Graham MJ, Crooke RM, Witztum JL, Brunzell JD, Kastelein JJP. Antisense Inhibition of Apolipoprotein C-III in Patients with Hypertriglyceridemia. *NEJM*. 2015; 373:438-47.

GeneCards [Internet]. Weizmann Institute of Science; c1996-2015 [cité 10 Septembre 2015]. [1 écran]. Disponible à partir de : <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADCY9>

Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda; NIH. [mis à jour Février 2012; cité 13 Septembre 2015]. Genes; [1 écran]. Disponible à partir de : <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/UGT1A1>

Glomset JA. 1968. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968; 9: 155-167.

Goedeke L, Fernandez-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69(6): 915-930.

Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*. 1974; 249: 5153-5162.

Gotto A, Pownall H. *Manual of Lipid Disorders*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1999.

Haidar B, Denis M, Krimbou L, Marcil M, Genest Jr. cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J Lip Res*. 2002; 43(12): 2087-2094.

Hayashi H, Kawamura M. Lowering LDL cholesterol, but not raising LDL receptor activity, by ezetimibe. *J Clin Lipidol*. 2013; 7: 632-636.

Heart and Stroke Foundation [Internet]. Ottawa: Heart and Stroke Foundation; c2013 [cité 27 Juillet 2013]. News; [1 écran]. Disponible à partir de:
http://www.heartandstroke.com/site/c.ikiQLcMWJtE/b.6520045/k.BB7E/2011_Report__Denial_cutting_lives_short.htm

Heart and Stroke Foundation [Internet]. Ottawa: Heart and Stroke Foundation; c2013 [Mis à jour Août 2013; cité 15 Août 2013]. News; [1 écran]. Disponible à partir de:
http://www.heartandstroke.com/site/c.ikiQLcMWJtE/b.3484027/k.8419/Heart_disease__High_blood_cholesterol.htm

Herder M, Johnsen SH, Arntzen KA, Mathiesen EB. Risk factors for progression of carotid intima-media thickness and total plaque area: a 13-years follow-up study: the TROMSØ study. *Stroke*. 2012; 43: 1818-1823.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2002. SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest*. 109; 1125-1131.

The HSP-2 THRIVE Collaborative group. Effects of Extended-Release Niacin with Laropiprant in High-Risk Patients. *NEJM*. 2014; 371(3): 203-212.

Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X, Fu X, Wagner MA, Besler C, Gerstenecker G, Zhang R, Li X-M, Didonato AJ, Wilson Tang WH, Smith JD, Plow EF, Fox PL, Shih DM, Lusic AJ, Fisher EA, DiDonato JA, Landmesser U, Hazen SL. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest*. 2013; 123(9): 3815-3828.

Ikonen, Elina. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2008; 9: 125-138.

Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR. Increased High-Density Lipoprotein Levels Caused by a Common Cholesteryl-Ester Transfer Protein Gene Mutation. *NEJM*. 1990; 323: 1234-1238.

Inazu A, Jiang XC, Haraki T, Yagi K, Kamon N, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R, Takata K, Moriyama Y. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest*. 1994; 94(5): 1872–1882.

Jensen MK, Rimm EB, Furtado JD, ScD; Sacks FM. Apolipoprotein C-III as a Potential Modulator of the Association Between HDL-Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease. *JAHA*. 2012; 1(2): 1-10.

Jin FY, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin decreases removal of high density lipoprotein apolipoprotein A-I but not cholesterol ester by Hep G2 cells. Implications for reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(10): 2020–2028.

Johns DG, Duffy J, Fisher T, Hubbard BK, Forres MJ. On- and Off-Target Pharmacology of Torcetrapib. *Drugs*. 2012; 72(4): 491-495.

Johns DG, Chen Y, Wang SP, Castro-Perez J, Previs SF, Roddy TP. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein increases cholesteryl ester content of large HDL independently of HDL-to-HDL homotypic transfer: *In vitro* vs *in vivo* comparison using anacetrapib and dalcetrapib. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 762: 256-262.

Johri AM, Héту MF, Nambi V. Carotid Plaque or CIMT: What is the Future for Carotid US Imaging? *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2014; 8: 386.

Kamanna VS, Ganji SH, Kashyap ML. Recent advances in niacin and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2013; 24: 239–245.

Kastelein JJP, Duivenvoorden R, Deanfield J, de Groot E, Jukema JW, Kaski J-C, Munzel T, Taddei S, Lahnert V, Burgess T, Kallend D, Luscher TF. Rationale and design of dal-VESSEL: a study to assess the safety and efficacy of dalcetrapib on endothelial function using brachial artery flow-mediated vasodilatation. *Current Medical Research & Opinion*. 2011; 27(1): 141-150.

Kastelein JJP, van Leuven SI, Burgess L, RADIANCE-1 Investigators. Effects of Torcetrapib on Carotid Atherosclerosis in Familial Hypercholesterolemia. *NEJM*. 2007; 356: 1620-1630.

Kellner-Weibel G, Yancey PG, Jerome WG, Walser T, Mason RP, Phillips MC, Rothblat GH. Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(8): 1891-1898.

Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Sankaranarayanan S, Rothblat GH. In vitro studies and mass flux of cholesterol between serum and macrophages. In: Shaefer EJ, editor. *High density lipoproteins, dyslipidemia, and coronary heart disease*. Boston: Springer; 2010. p.83-88.

Khera AV, Rader DJ. Future therapeutic directions in reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep*. 2010; 12: 73-81.

Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, Rader DJ. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *NEJM*. 2011; 364: 127-135.

Khurana, I. *Textbook of medical physiology*. 1st ed. Kundli: Elsevier; 2006.

Kim SH, Ye YM, Lee HY, Sin HJ, Park HS. Combined pharmacogenetic effect of ADCY9 and ADRB2 gene polymorphisms on the bronchodilator response to inhaled combination therapy. *J Clin Pharm Ther*. 2011; 36: 399–405.

Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *PNAS*. 2000; 97: 817–822.

Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. 1997; 387(6631): 414-417.

Kuo F, Gardener H, Dong C, Cabral D, Della-Morte D, Blanton SH, Elkind MSV, Sacco RL, Rundek T. Traditional Cardiovascular Risk Factors Explain the Minority of the Variability in Carotid Plaque. *Stroke*. 2012; 43(7): 1755–1760.

Lehne RA. *Pharmacology for nursing care*. 6th ed. St-Louis: Saunders Elsevier; 2007.

Leiva A, Verdejo H, Benitez ML, Martinez A, Busso D, Rigotti A. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis*. 2011; 217: 299-307.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-874.

Liu S, Mistry A, Reynolds JM, Lloyd DB, Griffor MC, Perry DA, Ruggeri RB, Clark RW, Qiu X. Crystal Structures of Cholesteryl Ester Transfer Protein in Complex with Inhibitors. *J Biological Chemistry*. 2012; 287(44): 37321-37329.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2003.

Lüscher TF, Taddei S, Kaski JC, Jukema JW, Kallend D, Münzel T, Kastelein JJ, Deanfield JE; dal-VESSEL Investigators. Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESSEL randomized clinical trial. *Eur Heart J*. 2012; 33(7):857-65.

Lusis AJ. *Atherosclerosis*. *Nature*. 2000; 407(6801): 233-241.

Maugeais C, Perez A, von der Mark E, Magg C, Pflieger P, Niesor EJ. Evidence for a role of CETP in HDL remodeling and cholesterol efflux: role of cystein 13 of CETP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 183(11): 1644-1650.

Matyus SP, Braun PJ, Wolak-Dinsmore J, Saenger AK, Jeyarajah EJ, Shalaurova I, Warner SM, Fischer TJ, Connelly MA. HDL particle number measured on the Vantera®, the first clinical NMR analyzer. *Clinical Biochemistry*. 2015; 48(3): 148-155.

Medical Mayo Laboratories [Internet]. Rochester : Mayo Clinic; c1995-2016 [cité 05 Mars 2016]. Test Catalog; [1 écran]. Disponible à partir de: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/80309>

McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2009; 119: 1135-1145.

Merck [Internet]. Kenilworth : Merck Sharp & Dohme Corp.; c2009-2016 [Mis à jour 09 Mars 2013; cité 10 Février 2016]. Newsroom; [1 écran]. Disponible à partir de: <http://www.mercknewsroom.com/press-release/research-and-development-news/results-hps2-thrive-study-tredaptive-extended-release-ni>

Miao B, Zondlo S, Gibbs S, Cromley D, Hosagrahara VP, Kirchgessner TG, Billheimer J, Mukherjee R. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res*. 2004; 45(8): 1410-1417.

Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*. 1975; 1: 16-19.

Miwa K, Inazu A, Kawashiri M, Nohara A, Higashikata T, Kobayashi J, Koizumi J, Nakajima K, Nakano T, Niimi M, Mabuchi H, Yamagishi M. Cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells to serum is preserved in CETP-deficient patients. *Clin Chim Acta*. 2009; 402(1-2): 19-24.

Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusis AJ, Fogelman AM, La Du BN. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest*. 1997; 99(8): 2005–2019.

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, Maugeaix C. Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre- β -HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 2010; 51: 3443-3454.

Niesor EJ. Will Lipidation of ApoA-I through interaction with ABCA1 at the Intestinal Level Affect the Protective Functions of HDL? *Biology*. 2015; 4: 17-38.

Nilsson PM. ACCORD and Risk-Factor Control in Type 2 Diabetes. *NEJM*. 2010; 362:1628-1630.

Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, Ruzylo W, Bachinsky WB, Lasala GP, Tuzcu M (for the ILLUSTRATE Investigators). Effect of Torcetrapib on the Progression of Coronary Atherosclerosis. *NEJM*. 2007; 356: 1304-1316.

Nofer JR, van Eck M. HDL scavenger receptor class B type I and platelet function. *Current opinion in Lipidology*. 2011; 22: 277–282.

O'Connell BJ, Denis M, Genest J. Cellular Physiology of Cholesterol Efflux in Vascular Endothelial Cells. *Circulation*. 2004; 110: 2881-2888.

Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature*. 2000; 406(6792): 203-207.

Ono, K. Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection. *J Cardiol*. 2012; 60(5): 339-343.

Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem*. 2000; 275: 34508–34511.

Oram JF, Heinecke JW. ATP-Binding Cassette Transporter A1: A cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 2005; 85: 1343–1372.

Petrides F, Shearston K, Chatelais M, Guilbaud F, Meilhac O, Lambert G. The promises of PCSK9 inhibition. *Curr Opin Lipidol*. 2013; 24(4): 307-312.

Polonsky TS, Ward RP. Chapter 3: The Role of Imaging in Cardiovascular Risk Assessment. In: Sorrentino MJ, editor. *Hyperlipidemia in primary care*. New York: Humana Press; 2011. p. 41-55.

Pownall HJ, Gotto Jr AM. Chapter 1: Structures and dynamics of human plasma lipoproteins. In: Betteridge J, Shepherd J, Illingworth R, editors. *Lipoproteins in health and disease*. London: Arnold; 1999.p.3-16.

Protocole Dal-Plaquet2, numéro NC22703 ROW, version B, RO4607381.

Rader DJ, deGoma EM. Future of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibitors. *Annu Rev Med*. 2014; 65: 385–403.

Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sciences*. 2013; 9(10): 1057-1069.

Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, Chang TY, Brown MS, Goldstein JL. 1997. Complementation Cloning of *S2P*, a Gene Encoding a Putative Metalloprotease Required for Intramembrane Cleavage of SREBPs. *Molecular Cell*. 1997; 1(1): 47-57.

Rawson RB. Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). *Biochem Soc Symp*. 2003; 70: 221-231.

Ray KK, Ditmarsch M, Kallend D, Niesor EJ, Suchankova G, Upmanyu R, Anzures-Cabrera J, Lehnert V, Pauly-Evers M, Holme I, Stasek J, van Hesse MWJ, Jones P. On behalf of the dal-ACUTE Investigators. The effect of cholesteryl ester transfer protein inhibition on lipids, lipoproteins, and markers of HDL function after an acute coronary syndrome: the dal-ACUTE randomized trial. *European Heart Journal*. 2014; 35: 1792–1800.

Rees MR, Zijlstra F. Chapter 2: Invasive Coronary Imaging. In: Oudkerk M, Reiser MF, editors. *Coronary Radiology*. 2nd Edition. Verlag Berlin Heidelberg : Springer; 2009. p. 25-98.

Rhainds D, Brodeur M, Lapointe J, Charpentier D, Falstra L, Brissette L. The Role of Human and Mouse Hepatic Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) in the Selective Uptake of Low-Density Lipoprotein–Cholesteryl Esters. *Biochemistry*. 2003; 42(24):7527–7538.

Rhainds D, Arsenault BJ, Brodeur MR, Tardif JC. An update on the clinical development of dalce-trapib (RO4607381), a cholesteryl ester transfer protein modulator that increases HDL cholesterol levels. *Future Cardiol*. 2012a; 8(4): 513-531.

Rhainds D, Arsenault BJ, Tardif JC. PCSK9 inhibition and LDL cholesterol lowering: the biology of an attractive therapeutic target and critical review of the latest clinical trials. *Clin Lipidol*. 2012b; 7(6): 621-640.

Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of High-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocrine Reviews*. 2003; 24(3): 357-387.

Roche [Internet]. Suisse : F.Hoffmann-Laroche Ltd; c2014 [mis à jour 7 Mai 2012; cité 15 Février 2014]. Media Releases; [1 écran]. Disponible à partir de:
<http://www.roche.com/media/store/releases/med-cor-2012-05-07.htm>

Rohatgi A. High-Density Lipoprotein Function Measurement in Human Studies: Focus on Cholesterol Efflux Capacity. *Progress in Cardiovascular disease*. 2015; 58: 32-40.

Rosenberg HG, Allard D. Prudence oblige: l'emploi des statines chez les femmes. *Le Réseau – Journal du Réseau Canadien pour la Santé des Femmes* [Internet]. Printemps/Été 2008 [cité 12 Octobre 2015]; 10(2): [environ 1 p.]. Disponible à <http://www.cwhn.ca/node/39850>

Rosenson RS. Functional assessment of HDL: moving beyond static measures for risk assessment. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010; 24(1): 71-75.

Rosenson RS, Brewer HB, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, Krauss RM, Otvos JD, Remaley AT, Schaefer EJ. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clinical Chemistry.* 2011; 57(3): 392-410.

Rosenson RS, Brewer Jr HB, Ansell B, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, Kontush A, Tall AR, Webb NR. Translation of High-Density Lipoprotein Function Into Clinical Practice: Current Prospects and Future Challenges. *Circulation.* 2013;128: 1256-1267.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362(6423): 801-809.

Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *NEJM.* 1999; 340(2): 115-126.

Rothblat GH, Llera-Moya M, Favari E, Yancey PG, Kellner-Weibel G. Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations. *Atherosclerosis.* 2002; 163: 1-8.

Rundek T, Blanton SH, Bartels S, Dong C, Raval A, Demmer RT, Cabral D, Elkind MSV, Sacco RL, Desvarieux M. Traditional risk factors are not major contributors to the variance in carotid intima-media thickness. *Stroke.* 2013; 44(8): 2101-2108.

Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS. Molecular Identification of the Sterol-Regulated Luminal Protease that Cleaves SREBPs and Controls Lipid Composition of Animal Cells. *Molecular Cell.* 1998; 2(4): 505-514.

Sakr SW, Williams DL, Stoudt GW, Phillips MC, Rothblat GH. Induction of cellular cholesterol efflux to lipid-free apolipoprotein A-I by cAMP. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999; 1438: 85-98.

Sampson UK, Fazio S, Linton MF. Residual cardiovascular risk despite optimal LDL-cholesterol reduction with statins : the evidence, etiology, and therapeutic challenges. *Curr Atheroscler Rep.* 2012; 14(1): 1-10.

Santé Canada [Internet]. Ottawa : Santé Canada [mis à jour 23 Février 2012; cité 9 Septembre 2015]. Aliments et nutrition; [1 écran]. Disponible à partir de: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/weights-poids/guide-ld-adult/bmi_chart_java-graph_imc_java-fra.php

Santos-Gallego CG, Ibanez B, Badimon JJ. HDL-cholesterol : is it really good? Differences between apoA-I and HDL. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76: 443-452.

Santos-Gallego CG, Giannarelli C, Badimon JJ. Experimental models for the investigation of high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux. *Curr Atheroscler Rep.* 2011; 13: 266-276.

Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2010; 501(2): 177-181.

Sato R, Yang Y, Wang X, Evans MJ, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS. 1994. Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J Biol Chem.* 1994; 269: 17267-17273.

Sattler KJE, Elbasan S, Keul P, Elter-Schulz M, Bode C, Gräler MH, Bröcker-Preuss M, Budde T, Erbel R, Heusch G, Levkau B. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 821-832.

Schwartz CC, VandenBroek JM, Cooper PS. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *J Lipid Res*. 2004; 45: 1594-1607.

Scott MP, Lodish HF, Berk A, Kaiser, C, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A. *Molecular Cell Biology*. San Francisco: W. H. Freeman; 2012.

Shen L, Peng H, Xu D, Zhao S. The next generation of novel low-density lipoprotein cholesterol-lowering agents: Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 inhibitors. *Pharmacological Research*. 2013; 73: 27-34.

Smeltzer CS, Bare BG. *Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing, Volume 2*. 10th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2004.

Smith JD. Myeloperoxidase, Inflammation, and Dysfunctional HDL. *J Clin Lipidol*. 2010; 4(5): 382–388.

Sniderman AD, Blank D, Zakarian R, Bergeron J, Frohlich J. Triglycerides and small dense LDL: the twin Achilles heels of the Friedewald formula. *Clinical Biochemistry*. 2003; 36: 499-504.

Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Volle DH, Lobaccaro JMA, Mathé D, Combes O, Scanff P, Lutton C, Aigueperse J. Les oxystérols : métabolisme, rôles biologiques et pathologies associées. *Gastroenterol Clin Biol*. 2004; 28(3): 279-293.

Soran H, Durrington PN. Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation. *Curr Opin Lipidol*. 2011; 22(4): 254-261.

Soran H, Hama S, Yadav R, Durrington PN. HDL functionality. *Curr Opin Lipidol*. 2012; 23(4): 353-366.

Spence JD. Technology Insight: ultrasound measurement of carotid plaque—patient management, genetic research, and therapy evaluation. *Nature*. 2006; 2(11): 611-619.

Staels B, Auwerx J. Regulation of apo A-I gene expression by fibrate. *Atherosclerosis*. 137; (Suppl.): S19–S23.

Stein JH, Fraizer MF, Eschlimann SA, Nelson-Worel J, McBride PE, Douglas PS. Vascular Age: Integrating Carotid Intima-Media Thickness Measurements with Global Coronary Risk Assessment. *Clin. Cardiol*. 2004; 27: 388-392.

Szwarc D, Vignaux O. Chapitre 23 : Techniques d'imagerie cardiaque. In : Nahum, H, editor. *Traité d'imagerie médicale - Volume 1 - 2nd ed*. Paris : Lavoisier; 2013. p 335-348.

Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. 2002; 110(7): 905-911.

Talayero B, Wang L, Furtado J, Carey VJ, Bray GA, Sacks FM. Obesity favors apolipoprotein E- and C-III-containing high density lipoprotein subfractions associated with risk of heart disease. *J Lipid Res.* 2014; 55: 2167-2177.

Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metabolism.* 2008; 7(5): 365-375.

Tanigawa H, Billheimer JT, Tohyama J, Zhang Y, Rothblat G, Rader DJ. Expression of Cholesteryl Ester Transfer Protein in Mice Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport. *Circulation.* 2007; 116: 1267-1273.

Tardif JC, Rhéaume E, Lemieux Perreault LP, Grégoire JC, Feroz Zada Y, Asselin G, Provost S, Barhdadi A, Rhainds D, L'allier PL, Ibrahim R, Upmanyu R, Niesor EJ, Benghozi R, Suchankova G, Laghrissi-Thode F, Guertin MC, Olsson AG, Mongrain I, Schwartz GG, Dubé MP. Pharmacogenomics determinants of the cardiovascular effects of Dalceptrapib. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015; 8:372-382.

Taylor AJ, Villines TC, Stanek EJ, Devine PJ, Griffen L, Miller M, Weissman NJ, Turco M. Extended-Release Niacin or Ezetimibe and Carotid Intima-Media Thickness. *NEJM.* 2009; 361(22): 2113-2122.

Teramoto T, Takeuchi M, Morisaki Y, Ruotolo G, Krueger KA. Efficacy, safety, tolerability, and pharmacokinetic profile of evacetrapib administered as monotherapy or in combination with atorvastatin in Japanese patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol.* 2014; 113(12): 2021-9.

Tortora GJ, Grabowski AR. *Principes d'anatomie et de physiologie.* Anjou : Centre Éducatif et Culturel; 1999.

Uretsky S, Messerli, FH, Bangalore S, Champion A, Cooper-DeHoff RM, Zhou Q, Pepine CJ. Obesity Paradox in Patients with Hypertension and Coronary Artery Disease. *The American Journal of Medicine.* 2007; 120: 863-870.

Vaisar T, Pennathur S, Grenn 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. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 2007; 117(3): 746-756.

Van Eck M, Twisk J, Hoekstra M, Van Rij BT, Van der Lans CAC, T. Bos IS, Krujit JK, Kuipers F, Van Berkel TJC. Differential Effects of Scavenger Receptor BI Deficiency on Lipid Metabolism in Cells of the Arterial Wall and in the Liver. *J Biol Chem.* 2003; 278: 23699-23705.

Vaughan AM, Oram JF. ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J Lip Res.* 2003; 44(7): 1373-1380.

Wang H, Patterson C. *Atherosclerosis: Risks, Mechanisms, and Therapies.* New Jersey: Wiley Blackwell, 2015.

Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IL, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 2007; 117(8): 2216-2224.

Williams PT, Zhao XQ, Marcovina SM, Otvos, JD, Brown BG, Krauss RM. Comparison of four methods of analysis of lipoprotein particle subfractions for their association with angiographic progression of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014; 233: 713-720.

World Health Organization [Internet]. Genève: World Health Organization; c2013 [13 Août 2013]. The World Health Report 2002, Chapter 4; [1 écran]. Disponible à partir de: <http://www.who.int/whr/2002/chapter4/en/index4.html>

Wright RS. Recent clinical trials evaluating benefit of drug therapy for modification of HDL cholesterol. *Curr Opin Cardiol*. 2013; 28(4): 389–398.

Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. Crucial Step in Cholesterol Homeostasis: Sterols Promote Binding of SCAP to INSIG-1, a Membrane Protein that Facilitates Retention of SREBPs in ER. *Cell*. 2002; 110(4): 489-500.

Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 1993; 75: 187-197.

Younis NN, Soran H, Sharma R, Charlton-Menys V, Durrington PN. Lipoprotein glycation in atherogenesis. *Clin Lipidol*. 2009; 4(6): 781-790.

Younis NN, Soran H, Charlton-Menys V, Sharma R, Hama S, Pemberton P, Elseweidy MM, Durrington PN. High-density lipoprotein impedes glycation of low-density lipoprotein. *Diabetes & Vascular Disease Research*. 2012; 10(2): 152–160.

Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, Davis MA, Michaely P, Liu P, Willingham MC, Rudel LL. Cholesterol-regulated Translocation of NPC1L1 to the Cell Surface Facilitates Free Cholesterol Uptake. *J Biol Chem*. 2006; 281(10): 6616-6624.

Yvan-Charvet L, Matsuura F, Wang N, Bamberger MJ, Nguyen T, Rinninger F, Jiang XC, Shear CL, Tall AR. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 1132–1138.

Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003; 108: 661-663.

Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2005; 115(10): 2870-2874.

Zhang Y, Ahmed AM, Tran TL, et al. The inhibition of endocytosis affects HDL lipid uptake mediated by the human scavenger receptor class B type I. *Mol Membr Biol*. 2007; 24(5-6): 442-454.