Régulation de l'activité de la Protéine humaine de Transfert des Esters de Cholestérol (CETP) :Interactions électrostatiques avec les dérivés carboxylés (acides gras non estérifiés et rétinoïdes)

Emmanuel Florentin

▶ **To cite this version:**

Emmanuel Florentin. Régulation de l'activité de la Protéine humaine de Transfert des Esters de Cholestérol (CETP) :Interactions électrostatiques avec les dérivés carboxylés (acides gras non estérifiés et rétinoïdes). Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bourgogne, 1997. Français. NNT : . tel-00297283v1

HAL Id: tel-00297283

https://theses.hal.science/tel-00297283v1

Submitted on 15 Jul 2008 (v1), last revised 20 Jul 2010 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Faculté de Médecine

THESE

présentée pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Mention Biochimie

par

Emmanuel FLORENTIN

REGULATION DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE HUMAINE DE TRANSFERT DES ESTERS DE CHOLESTEROL (CETP) : INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES AVEC LES DERIVES CARBOXYLES (ACIDES GRAS NON-ESTERIFIES ET RETINOÏDES).

soutenue publiquement le 27 Juin 1997

JURY

Pr. J. CHAMBAZ	*Professeur des Universités, Praticien Hospitalier - Paris*
Dr. J.M. CHAPMAN	*Directeur de Recherche INSERM - Paris*
Pr. P. GAMBERT	*Professeur des Universités, Praticien Hospitalier - Dijon*
Dr. L. LAGROST	*Chargé de Recherche INSERM - Dijon*
Dr. M. LAPLAUD	*Maître de Conférence des Universités, Praticien Hospitalier - Limoges*

AVANT-PROPOS

A Monsieur le Professeur Philippe GAMBERT,

Pour m'avoir permis de rejoindre son équipe de recherche, pour ses soutiens de tous ordres et les encouragements constants qu'il m'a prodigués tout au long de ces années passées au sein du laboratoire. J'ai souvent apprécié ses qualités humaines et ses marques de sympathie.

A Monsieur le Docteur Christian LALLEMANT,

Pour m'avoir fait profiter de ses remarques pertinentes et ses conseils précieux qui ont toujours été les bienvenus.

Je le remercie de m'avoir offert une partie de son temps pour la correction de ce travail.

A Monsieur le Docteur Laurent LAGROST,

Pour avoir développé mon intérêt pour la recherche, pour ses compétences scientifiques exemplaires et ses conseils avisés qui m'ont permis d'entreprendre et de mener à bien ces travaux. Je le remercie très chaleureusement pour sa contribution majeure à la rédaction de ce mémoire.

Que tous trois trouvent ici l'expression de ma gratitude, de mon profond respect et de mon admiration.

A Monsieur le Professeur J. CHAMBAZ,

qui a accepté de consacrer une partie de son temps précieux à la lecture de ce mémoire et de participer à ce jury.
qu'il soit assuré de l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur J.M. CHAPMAN,

qui m'a fait l'honneur de lire et de juger ce travail, malgré de nombreuses occupations.
que ce travail soit un témoignage de ma profonde considération.

A Monsieur le Docteur M. LAPLAUD,

qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur du présent mémoire et de faire partie de ce jury malgré ses charges de travail.
qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à adresser tous mes remerciements aux personnes, qui en m'apportant aides et conseils tout au long de ce travail, ont contribué à sa réalisation :

Anne Athias et Laurence Perségol,

pour leur gentillesse, leur bonne humeur contagieuse, leurs conseils avisés et leur soutien de tous les instants (voire de *chaque* seconde) tout au long de la rédaction de ce mémoire... qu'elles en soient très chaleureusement remerciées.

Dominique DeBaudus, Alain Goux, Valérie Guyard-Dangremont, Hassan Gandjini, Elisabeth Niot, Liliane Princep,

qui m'ont accueilli chaleureusement au sein de cette équipe, qui ont guidé mes premiers pas au laboratoire, et qui ont eu le mérite de me supporter durant ces années... à eux une pensée très amicale.

David Masson,

pour sa collaboration musclée lors de nos nombreux déménagements au sein du laboratoire, pour ses conseils techniques (parfois surprenants) et sa bonne humeur... soyez-en, mon Lieutenant, très amicalement remercié.

Catherine Desrumaux,

pour sa gentillesse et en remerciement du temps passé à relire et corriger ce mémoire... qu'elle en soit très cordialement remerciée.

Pr. Dominique Néel, Pascale Barraud, Ginette Bessede, Valérie Deckert, Laurence Duvillard, Christelle Foucher, Laurence Gesquières, Serge Guéldry, Gérard Lizard, Serge Monier, Frédéric Pont, Caroline Rousseau, Laurence Viens ainsi que tout le personnel du Laboratoire Central de Biochimie Médicale, et du Centre de Prélèvement, de l'Hôpital du Bocage...

pour leur coopération, leur sympathie et leur bonne humeur...

A mes parents,

A Auguste,

A mes ami(e)s şi prietena mea.

Ce travail a été réalisé à l'Université de Bourgogne,

au Laboratoire de Biochimie des Lipoprotéines de la Faculté de Médecine.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE p. 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE p. 5

A. Structure et biosynthèse de la CETP. p. 6

I. Caractérisation moléculaire de la CETP. p. 6

1. Le gène. p. 6

2. Structure primaire. p. 7

3. Structures secondaire et tertiaire. p. 8

4. Glycosylation. p. 8

5. Mutations ponctuelles du gène. p. 9

II. Expression de la CETP dans différents tissus et cellules. p. 11

1. Localisation tissulaire. p. 11

2. Sécrétion. p. 12

III. Régulation de l'expression du gène. p. 13

IV. Epissage alternatif de l'ARNm de CETP. p. 14

B. Fonctions de la CETP. p. 14

I. Transfert de lipides par la CETP. p. 14

1. Transfert de lipides entre les lipoprotéines. p. 14

2. Transfert de lipides avec les cellules. p. 15

II. Rôle de la CETP sur les changements de taille des lipoprotéines. p. 17

1. Conversion des HDL. p. 17

2. Distribution en taille des LDL. p. 20

C. Mécanismes d'action et régulation de l'activité CETP. p. 21

I. Etapes clés de la réaction de transfert des esters de cholestérol. p. 21

1. Modèles cinétiques. p. 21

2. Liaison de la CETP aux lipoprotéines. p. 23

3. Liaison de la CETP aux lipides neutres. p. 24

II. Facteurs modifiant la réaction de transfert des esters de cholestérol. p. 25

1. Concentration en substrats lipoprotéiques. p. 25
2. Contenu lipidique des lipoprotéines. p. 28
2.1. Composés de surface. p. 28
2.2. Esters de cholestérol et triglycérides. p. 29
2.3. Acides gras non estérifiés. p. 29
3. Contenu en apolipoprotéines des substrats lipoprotéiques. p. 31
III. Inhibiteurs de la CETP. p. 32
1. Inhibiteur protéique du transfert lipidique (LTIP). p. 32
2. Inhibiteurs pharmacologiques de la CETP. p. 33
D. Concentration plasmatique et variations physiopathologiques. p. 36
I. Variations de la concentration plasmatique en CETP. p. 36
1. Concentration plasmatique. p. 36
2. Variations d'activité et de concentration. p. 36
2.1. Etat postprandial. p. 36
2.2. Etats pathologiques. p. 37
2.3. Drogues hypocholestérolémiantes. p. 37
2.4. Exercice physique. p. 38
2.5. Consommation d'alcool. p. 38
II. Etudes expérimentales chez l'animal. p. 39
1. Injection de CETP exogène à des animaux CETP-déficients. p. 39
2. Anticorps anti-CETP. p. 40
3. Souris transgéniques. p. 40
E. Conclusion générale : CETP et athérosclérose. p. 42

ETUDE EXPERIMENTALE p. 45

PREMIERE PARTIE: Influence des acides gras non estérifiés plasmatiques sur l'activité CETP dans diverses conditions physiopathologiques (Sujets normolipidémiques, analbuminémiques, syndromes néphrotiques). p. 46

I. INTRODUCTION p. 47

II. SUJETS ET METHODES p. 48

1. Sujets normolipidémiques. p. 48

2. Sujets analbuminémiques. p. 49
3. Sujets néphrotiques p. 49
4. Préparation des lipoprotéines. p. 49
5. Purification de la CETP. p. 50
5.1 Précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium. p. 50
5.2. Ultracentrifugation. p. 52
5.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe. p. 52
5.4. Chromatographie d'échange de cations. p. 53
5.5. Chromatographie d'affinité. p. 53
5.6. Chromatographie d'échange d'anions. p. 54
6. Marquage radioactif des LDL et $HDL_{3.}$ p. 54
7. Estimation du rapport [^{3}H]CE / [^{3}H]CL au sein des particules. p. 55
7.1. Extraction des lipides. p. 55
7.2. Chromatographie sur couche mince. p. 55
7.3. Comptage radioactif. p. 56
8. Mesure de l'activité CETP plasmatique. p. 56
9. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives. p. 58
10. Electrophorèse sur gel d'agarose et détermination de la charge des lipoprotéines. p. 58
11. Transferts massique d'esters de cholestérol et de triglycérides. p. 59
12. Dosage massique de CETP par méthode ELISA. p. 60
13. Activité spécifique CETP. p. 60
14. Précipitation des lipoprotéines plasmatiques. p. 60
15. Autres méthodes analytiques. p. 61
III. RESULTATS p. 62
A. Sujets normolipidémiques. p. 62
1. Corrélation entre la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés et l'activité CETP. p. 62
2. Distribution des acides gras dans les plasmas humains normolipidémiques p. 62

3. Effets de l'albumine sur l'activité CETP plasmatique p. 65
4. Transfert net massique d'esters de cholestérol et de triglycérides entre les HDL et VLDL+LDL plasmatiques. p. 68
B. Analbuminémiques. p. 69
1. Paramètres plasmatiques. p. 69
2. Composition des lipoprotéines plasmatiques. p. 69
3. Densité et taille de LDL. p. 70
4. Distribution des acides gras non estérifiés parmi les lipoprotéines plasmatiques. p. 70
5. Transferts d'esters de cholestérol radioactifs chez les analbuminémiques et les témoins. p. 74
6. Effets de la supplémentation en albumine sur l'activité de transfert. p. 74
C. Syndromes néphrotiques. p. 78
1. Paramètres plasmatiques. p. 78
2. Activité CETP plasmatique. p. 78
3. Effets des acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines sur la charge électrostatique des lipoprotéines et sur l'activité CETP. p. 79
4. Effets de la supplémentation en albumine sur la charge des lipoprotéines plasmatiques et sur l'activité CETP. p. 80
IV. DISCUSSION p. 80

DEUXIEME PARTIE: Exploration, par une nouvelle méthode de mesure, du transfert des esters de cholestérol entre les diverses fractions lipoprotéiques du plasma par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient. p. 88

I. INTRODUCTION p. 89
II. MATERIELS & & METHODES p. 91
1. Préparation des lipoprotéines radioactives. p. 91
2. Milieu d'incubation. p. 92
3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration. p. 92
4. Comptage radioactif des fragments de gel. p. 94
5. Ultracentrifugations. p. 94

6. Analyses statistiques. p. 95

III. RESULTATS & DISCUSSION p. 95

1 Séparation des lipoprotéines plasmatiques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. p. 95

2. Comptage radioactif des fragments de gels. p. 97

3. Transfert de [^{3}H]CE des HDL_3 vers les fractions plasmatiques VLDL et LDL. p. 99

4. Transferts de [^{3}H]CE des LDL vers les fractions HDL_2 ou HDL_3. p. 103

5. Transferts de [^{3}H]CE soit des HDL_2 soit des HDL_3 vers les fractions VLDL+LDL plasmatiques. p. 105

6. Transferts de [^{3}H]CE des HDL_3 vers les fractions VLDL+LDL plasmatiques de patients analbuminémiques. p. 107

IV. CONCLUSION p. 109

Troisième Partie : Régulation de l'activité CETP par des dérivés carboxylés: Effets de l'acide rétinoïque**.** p. 111

I. INTRODUCTION p. 112

II. MATERIELS & METHODES p. 114

1. Séparation du plasma. p. 114

2. Activité de transfert des esters de cholestérol. p. 114

2.1. Mesure d'activité entre lipoprotéines isolées. p. 114

2.2. Mesure d'activité dans un plasma total. p. 115

3. Analyses statistiques. p. 116

III. RESULTATS p. 116

1. Effets comparatifs des différents dérivés carboxylés sur le transfert de [^{3}H]CE-HDL_3 des HDL_3 vers des LDL isolées. p. 116

2. Influence du rapport en cholestérol LDL / cholestérol HDL_3 sur l'effet activateur de l'acide 13-*cis* rétinoïque. p. 118

3. Effet comparatif des acides 13-*cis* rétinoïque et palmitique sur l'activité de transfert des esters de cholestérol dans le plasma humain total. p. 118

4. Effets de l'albumine dépourvue d'acides gras sur le transfert de

[^{3}H]CE des HDL_3 vers les LDL induit par les acides palmitique ou 13-*cis* rétinoïque. p. 121

5. Effet comparatif de l'acide palmitique et de l'acide 13-*cis* rétinoïque sur la mobilité électrophorétique des LDL et HDL_3. p. 123

IV. DISCUSSION p. 127

CONCLUSION GENERALE p. 134

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p. 137

ANNEXES p. 169

ANNEXE 1 : p. 170

LAGROST, L., FLORENTIN, E., GUYARD-DANGREMONT, V., ATHIAS, A., GANDJINI, H., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P. Evidence for nonesterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1388-1396 (1995)

ANNEXE 2 : p. 180

BRASCHI, S., LAGROST, L., FLORENTIN, E., MARTIN, C., ATHIAS, A., GAMBERT, P., KREMPF, M., LALLEMANT, C. & JACOTOT, B. Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from analbuminemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 441-449 (1996)

ANNEXE 3 : p. 190

BRASCHI, S., MASSON, D., ROSTOKER, G., FLORENTIN, E., ATHIAS, A., MARTIN, C., JACOTOT, B., GAMBERT, P., LALLEMANT, C. & LAGROST, L., Role of lipoprotein-bound nonesterified fatty acids in enhancing the specific activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome. (*soumis pour publication*).

ANNEXE 4 : p. 226

FLORENTIN, E., LAGROST, L., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P., Polyacrylamide gradient gel electrophoresis as a method to measure transfers of radiolabeled cholesteryl esters between several plasma lipoprotein fractions. *Anal. Biochem.* **216**, 352-357 (1994).

ANNEXE 5 : p. 233

FLORENTIN, E., ATHIAS, A. & LAGROST, L., Modulation of the activity of the human cholesteryl ester transfer protein by carboxylated derivatives. Evidence for 13-*cis* retinoic acid as a potent regulator of the protein's activity in plasma. *Eur. J. Biochem.* **240**, 699-706 (1996).

FIGURES

Figure 1	p. 3
Figure 2	p. 16
Figure 3	p. 19
Figure 4	p. 22
Figure 5	p. 26
Figure 6	p. 43
Figure 7	p. 51
Figure 8	p. 63
Figure 9	p. 64
Figure 10	p. 66
Figure 11	p. 67
Figure 12	p. 72
Figure 13	p. 73
Figure 14	p. 75
Figure 15	p. 77
Figure 16	p. 82
Figure 17	p. 83
Figure 18	p. 90
Figure 19	p. 93
Figure 20	p. 96
Figure 21	p. 98
Figure 22	p. 102
Figure 23	p. 106
Figure 24	p. 108
Figure 25	p. 113
Figure 26	p. 117
Figure 27	p. 119
Figure 28	p. 120
Figure 29	p. 122

Figure 30 p. 124
Figure 31 p. 125
Figure 32 p. 126
Figure 33 p. 128

TABLEAUX

Tableau 1 p. 10
Tableau 2 p. 34
Tableau 3 p. 100
Tableau 4 p. 104

ABREVIATIONS

ADNc: ADN complémentaire

Apo: apolipoprotéine

ARNm: ARN messager

CE / EC: cholestérol estérifié / esters de cholestérol

$CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$: transfert d'esters de cholestérol des HDL radiomarquées vers les VLDL + LDL

$CET_{LDL \rightarrow HDL}$: transfert d'esters de cholestérol des LDL radiomarquées vers les HDL

CETP: *cholesteryl ester transfer protein*

CL: cholestérol libre (non estérifié)

CM-cellulose: carboxy-méthyl cellulose

EDTA-Na_2: acide éthylène diamine tétraacétique

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*

FPLC: *fast protein liquid chromatography*

FSD: *fumed silicon dioxide*

HDL: *high density lipoprotein*

HDL_2: *high density lipoprotein sub-fraction$_2$*

HDL_3: *high density lipoprotein sub-fraction$_3$*

HL: lipase hépatique

HMG-CoA: Hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A

HPLC: *high performance liquid chromatography*

IDL: *intermediate density lipoprotein*

LCAT: *lecithine:cholesterol acyltransferase*

LDL: *low density lipoprotein*

LPL: lipoproteine lipase

$Lp_{(AI\ w/o\ AII)}$: lipoprotéines contenant de l'apoAI sans apoAII.

$Lp_{(AI\ /\ AII)}$: lipoprotéines contenant de l'apoAI et de l'apoAII.

LTIP: *lipid transfer inhibitor protein*

PBS: *phosphate buffered saline*

PLTP: *phospholipid transfer protein*

SDS: sodium dodecyl sulfate

SPA: *scintillation proximity assay*

TG: triglycérides

Tris: tris(hydroxyméthyl) aminométhane

VLDL: *very low density lipoprotein*

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE.

Dans le plasma, les lipoprotéines sont responsables du transport des lipides, composés insolubles en milieu aqueux. Ces édifices macromoléculaires sont constitués d'un coeur hydrophobe de lipides neutres (esters de cholestérol et triglycérides) et d'une couche hydrophile externe composée d'apolipoprotéines, de cholestérol non estérifié, de phospholipides et d'acides gras non estérifés. On compte cinq grandes classes de lipoprotéines (chylomicrons, VLDL : lipoprotéines de très faible densité, IDL : lipoprotéines de densité intermédiaire, LDL : lipoprotéines de faible densité et HDL : lipoprotéines de haute densité) qui différent les unes des autres par leur taille, leur densité hydratée, leur composition en lipides et en apolipoprotéines impliquant par là même des fonctions métaboliques différentes. Durant leur séjour dans le compartiment plasmatique, les lipoprotéines sont continuellement remodelées par l'action d'enzymes du métabolisme des lipides (HL : lipase hépatique, LCAT : lecithine:cholesterol acyltransferase, LPL : lipoprotéine lipase), mais également par des protéines de transfert, parmi lesquelles la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) (figure 1). La CETP joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines en catalysant le transfert net massique d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et LDL, et de triglycérides des VLDL vers les HDL et LDL. En fait, le rôle de la CETP sur l'athérogénicité du profil lipoprotéique reste à l'heure actuelle ambigu. La CETP en transférant des esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et LDL peut court-circuiter la voie d'élimination par les HDL du cholestérol excédentaire capté au niveau des tissus périphériques et éliminé par le foie. Cette voie de retour du cholestérol excédentaire est également appelée transport inverse ou transport "reverse" du cholestérol (figure 1). Dans ces conditions, la CETP serait potentiellement pro-athérogène. Cependant, les esters de cholestérol, transférés des HDL sur les VLDL et LDL, peuvent également être éliminés de la circulation sanguine via des récepteurs hépatiques (figure 1). Dans ces conditions, la CETP serait potentiellement anti-athérogène.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études se sont attaché à expliquer les mécanismes de régulation de l'expression et de l'activité de la CETP. Cette protéine suscite un intérêt croissant d'un point de vue pharmacologique en particulier

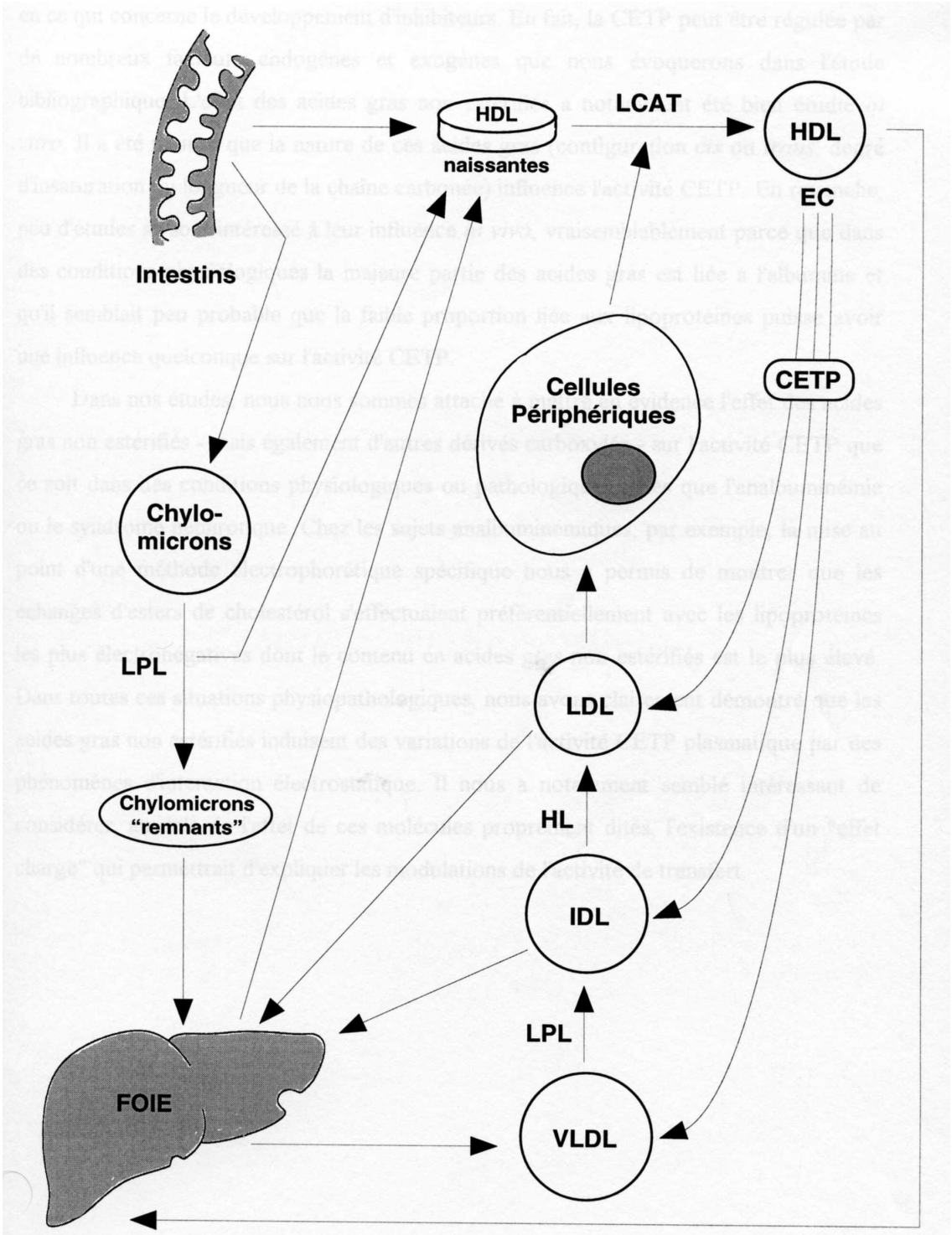


Figure 1: **Transport du cholestérol.**

en ce qui concerne le développement d'inhibiteurs. En fait, la CETP peut être régulée par de nombreux facteurs endogènes et exogènes que nous évoquerons dans l'étude bibliographique. L'effet des acides gras non estérifiés a notamment été bien étudié *in vitro*. Il a été montré que la nature de ces acides gras (configuration *cis* ou *trans*, degré d'insaturation ou longueur de la chaîne carbonée) influence l'activité CETP. En revanche, peu d'études se sont intéressé à leur influence *in vivo*, vraisemblablement parce que dans des conditions physiologiques la majeure partie des acides gras est liée à l'albumine et qu'il semblait peu probable que la faible proportion liée aux lipoprotéines puisse avoir une influence quelconque sur l'activité CETP.

Dans nos études, nous nous sommes attaché à mettre en évidence l'effet des acides gras non estérifiés - mais également d'autres dérivés carboxylés - sur l'activité CETP que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques telles que l'analbuminémie ou le syndrome néphrotique. Chez les sujets analbuminémiques, par exemple, la mise au point d'une méthode électrophorétique spécifique nous a permis de montrer que les échanges d'esters de cholestérol s'effectuaient préférentiellement avec les lipoprotéines les plus électronégatives dont le contenu en acides gras non estérifiés est le plus élevé. Dans toutes ces situations physiopathologiques, nous avons clairement démontré que les acides gras non estérifiés induisent des variations de l'activité CETP plasmatique par des phénomènes d'interaction électrostatique. Il nous a notamment semblé intéressant de considérer, au delà de l'effet de ces molécules proprement dites, l'existence d'un "effet charge" qui permettrait d'expliquer les modulations de l'activité de transfert.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Structure et biosynthèse de la CETP.

I. Caractérisation moléculaire de la CETP.

1. Le gène.

Chez l'homme, le gène de la CETP, présent sous forme d'une copie unique par génome haploïde, occupe un locus d'environ 25 kpb (AGELLON *et al.* 1990) sur le bras long du chromosome 16 (région 16q12-21) (LUSIS *et al.* 1987) à proximité du gène de la LCAT (région 16q22) (AZOULAY *et al.* 1986). Le gène, séquencé à 42%, est composé de 16 exons et 15 introns (AGELLON *et al.* 1990). Les exons, qui ne constituent que 8% de la totalité du gène, présentent des tailles variant de 32 pb (exon 13) à 250 pb (exon 16). Les introns, quant à eux, varient de 87 pb (intron 3) à environ 6 000 pb (intron 2) (AGELLON *et al.* 1990). Des polymorphismes au niveau du gène de la CETP peuvent induire des variations de la concentration plasmatique en CETP (FREEMAN *et al.* 1990, HANNUKSELA *et al.* 1994, MCPHERSON *et al.* 1996, KUIVENHOVEN *et al.* 1997). L'ADN complémentaire (ADNc) de la CETP a été cloné et séquencé chez de nombreuses espèces dont l'homme (DRAYNA *et al.* 1987), le singe cynomolgus (PAPE *et al.* 1991a), le lapin (NAGASHIMA *et al.* 1988) et le hamster (JIANG *et al.* 1991). La CETP du singe et celle de l'homme présentent des séquences en acides nucléiques et en acides aminés homologues à plus de 95% (PAPE *et al.* 1991a). Le pourcentage d'homologie n'est plus que d'environ 80% lorsque l'on compare les séquences humaines à celles du hamster (JIANG *et al.* 1991) ou à celles du lapin (NAGASHIMA *et al.* 1988). Par ailleurs, il a été montré que 7 résidus cystéine ainsi que 4 sites potentiels de glycosylation présents chez l'homme sont retrouvés chez le singe à la même position (DRAYNA *et al.* 1987, PAPE *et al.* 1991a). La comparaison inter-espèces montre que l'ARNm de la CETP du singe (1 800 bases) et de l'homme (1 900 bases) ont des tailles similaires mais inférieures à celle du lapin (2 200 bases) (PAPE *et al.* 1991a). Le promoteur du gène de la CETP humaine contient une séquence présentant des similitudes avec le site de liaison d'un activateur de la transcription (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) (C/EBP-α) (AGELLON *et al.* 1992, TALL 1995). Par ailleurs, les ADNc de la CETP et de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) présentent des homologies entre eux et avec

d'autres protéines de la famille des "*Lipopolysaccharide Binding Protein*" (LBP) parmi lesquelles la LBP plasmatique et la "*Neutrophil Bactericidal Permeability Increasing Protein*" (NBPIP) (GRAY *et al.* 1989, SCHUMANN *et al.* 1990). La comparaison des séquences en acides aminés de la CETP et de la PLTP montrent que 20% de leurs acides aminés sont identiques (DAY 1994) et que l'organisation intron / exon des gènes de la CETP et de la PLTP est conservée (TALL 1995). En ce qui concerne la LBP plasmatique, la CETP présente avec cette dernière une homologie de séquence de l'ordre de 23%.

2. Structure primaire.

Chez l'homme, l'ADN de la CETP code pour une préprotéine de 493 acides aminés comprenant un prépeptide signal de sécrétion de 17 acides aminés et la protéine mature de 476 acides aminés (DRAYNA *et al.* 1987). La CETP présente ainsi une masse moléculaire de 53 108 Da, alors que la masse moléculaire apparente de la protéine mature est d'environ 74 kDa. Cette différence s'explique par la forte glycosylation de la protéine. En fait, divers études ont rapporté une masse moléculaire apparente variant de 58 à 74 kDa (PATTNAÏK *et al.* 1978, IHM *et al.* 1982a, MORTON *et al.* 1982, ALBERS *et al.* 1984, SWENSON *et al.* 1987, HESLER *et al.* 1987, JARNAGIN *et al.* 1987, KATO *et al.* 1989, OHNISHI *et al.* 1990, FUKASAWA *et al.* 1992, RAVNIK *et al.* 1992, STEVENSON *et al.* 1993). Il existe une séquence commune dans le peptide signal de la CETP humaine, de l'apoAIV, de l'apoAI et de la LPL. Ces protéines comportent en particulier un pentapeptide Val-Leu-Thr-Leu-Ala identique (AGELLON *et al.* 1990). La composition en acides aminés de la CETP met en évidence une forte proportion (45%) d'acides aminés hydrophobes (Val: 8,4%; Ile: 6,0%; Leu: 11,7%; Ala: 7,3%; Phe: 6,0%; Met: 1,8% et Pro: 4,3%) ce qui lui confère une hydrophobicité très largement supérieure à celle des apolipoprotéines plasmatiques (HESLER *et al.* 1987). Cette propriété permet d'expliquer son rôle dans le transfert des esters de cholestérol hydrophobes.

3. Structures secondaire et tertiaire.

La CETP est composée de 32 à 35% d'hélice α et de 35% de structure β (DRAYNA *et al.* 1987, KO *et al.* 1993, CONNOLLY *et al.* 1996a). Elle possède par ailleurs une structure tertiaire hautement stabilisée, résistante au déploiement et nécessaire à son activité de transfert des esters de cholestérol (HESLER *et al.* 1989). Elle peut exister sous la forme d'un monomère (SWENSON *et al.* 1988), mais il a été montré que lorsqu'elle est soumise à électrophorèse en conditions natives, elle migre préférentiellement sous forme de dimère (*Mr* 140 000) (SWENSON *et al.* 1989).

La partie carboxy-terminale de la CETP (acides aminés 412-476) est particulièrement hydrophobe. En effet, la séquence de 26 acides aminés de la région carboxy-terminale de ce segment contient 62% de résidus hydrophobes. Comparativement à l'apoB, qui est l'apolipoprotéine la plus hydrophobe, la CETP est très soluble en milieu aqueux. Cette propriété pourrait s'expliquer par le fait que les résidus apolaires seraient susceptibles de former une poche hydrophobe à l'intérieur de la molécule. Cette structure serait impliquée dans le transport des esters de cholestérol, et des triglycérides, en milieu aqueux (HESLER *et al.* 1987).

4. Glycosylation.

Des modifications post-traductionnelles de la CETP, telles que la glycosylation, permettent d'expliquer les différences de masses observées (STEVENSON *et al.* 1993). En effet, la CETP compte 14,2% d'oses dont 2,6% d'acide sialique, 7,4% d'hexoses et 4,2% d'hexosamines (KATO *et al.* 1989) qui sont acquis durant l'étape intracellulaire de maturation de la protéine (SWENSON *et al.* 1987). Cette glycosylation intervient sur quatre sites : résidus Asn_{88}, Asn_{240}, Asn_{341} et Asn_{396} (DRAYNA *et al.* 1987). Il semble que la glycosylation, et en particulier l'addition de sucres N- liés, soit nécessaire à la sécrétion normale de la CETP dans le milieu, puisqu'une CETP non glycosylée est retenue par les cellules (AU-YOUNG et FIELDING 1992). Un traitement des cellules HepG2 par la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation, entraîne l'inhibition de

la sécrétion de la CETP à plus de 90%. La N-glycosylation au niveau des Asn_{88} et Asn_{396} est une étape critique pour la sécrétion de la CETP. A l'opposé, des mutations au niveau des Asn_{240} ou Asn_{341} n'entraînent pas de modification de la sécrétion et les mutants présentent une activité de transfert similaire voire augmentée par rapport aux témoins (STEVENSON *et al.* 1993). En fait, il a été supposé que l'attachement de résidus glucidiques au niveau de l'Asn_{88}, qui se situe près de la partie N-terminale de la molécule, pouvait influencer les étapes de repliement de la protéine durant la translocation à travers le réticulum (STEVENSON *et al.* 1993). En utilisant des techniques de mutagenèse dirigée, STEVENSON *et al.* (1993) ont pu remplacer certains résidus acides aminés Asn par des résidus Gln permettant d'éliminer chaque site de N-glycosylation. Ils ont ainsi pu démontrer que des variations de glycosylation modifiaient l'activité de la protéine. Le site de N-glycosylation sur l'Asn_{341} semble être utilisé de manière variable et serait responsable de la présence des deux principales formes de CETP (66 et 69 kDa) rencontrées dans le plasma humain (OHNISHI *et al.* 1990, STEVENSON *et al.* 1993). Le rapport entre ces deux isoformes pourrait être une source potentielle de variation d'activité CETP spécifique dans le plasma (STEVENSON *et al.* 1993).

5. Mutations ponctuelles du gène.

De nombreuses mutations du gène de la CETP ont été décrites dans la littérature (BROWN *et al.* 1989, GOTODA *et al.* 1993, TAKAHASHI *et al.* 1993, FUNKE *et al.* 1994, ARAI *et al.* 1996, SAKAI *et al.* 1996, TAMMINEN *et al.* 1996). Ces mutations, souvent associées à une hyperalphalipoprotéinémie (BROWN *et al.* 1989, FUNKE *et al.* 1994, ARAI *et al.* 1996), provoquent des déficiences partielles ou totale en CETP. Les sujets mutés présentent alors des activités CETP plasmatiques diminuées par rapport à des sujets ayant un allèle normal (tableau 1). Ces déficiences génétiques en CETP, que ce soit chez des sujets homozygotes ou hétérozygotes, induisent donc des modifications du profil lipoprotéique et principalement une augmentation du cholestérol HDL et du taux

Tableau 1: **Mutations du gène de la CETP.**

Mutation	Localisation	Type	Effet	Référence
G→A	Intron 14 (extrémité 5')	substitution	- défaut d'épissage du pré-ARNm - augmentation du taux de HDL - homozygotes: déficience totale en CETP - hétérozygotes: activité CETP réduite de moitié	BROWN *et al.* 1989
C→T	Exon 10 (codon 309)	non-sens (Gln_{309}→$Stop_{309}$)	- absence de 168 résidus (acides aminés 309-476) de la partie carboxy terminale de la CETP - diminution du taux d'ARNm - sujets hyperalphalipoprotéinémique	GOTODA *et al.* 1993
A→G	Exon 15 (codon 442)	faux-sens (Asp_{442}→Gly_{442})	- homozygotes: activité CETP d'environ 36% par rapport au génotype non muté - hétérozygotes: diminution de la masse CETP (17 à 26% de la valeur normale) et de l'activité spécifique (5 à 7% de la valeur normale)	TAKAHASHI *et al.* 1993
G→T	Exon 6 (codon 181)	non-sens (Gly_{181}→$Stop_{181}$)	- sujet hyperalphalipoprotéinémique - absence d'activité et de protéine CETP	ARAI *et al.* 1996
T→G et G→A	Intron 10 Intron 14	substitution	- élimination de l'exon 10 - insertion d'une séquence de 31 pb entre l'exon 13 et 14 de l'ADNc	SAKAI *et al.* 1996
G→A	paire de base 1696 (région 3' non codante)	substitution	- diminution d'activité d'environ 29% par rapport à un allèle normal	TAMMINEN *et al.* 1996

d'apoAI (INAZU *et al.* 1990, TAKAHASHI *et al.* 1993) qui sont généralement associées à une diminution du risque athérogène. Cependant, des études contradictoires laissent à penser que la relation entre déficience génétique en CETP et réduction du risque athérogène n'est pas aussi simple. En fait, l'augmentation de la longévité observée chez certaines personnes déficientes en CETP (INAZU *et al.* 1990) est tempérée par la mise en évidence de sujets déficients présentant des maladies cardiovasculaires prématurées. Ainsi, chez des sujets américains originaires du Japon présentant une mutation au niveau du gène de la CETP ($Asp_{442} \rightarrow Gly_{442}$, 5,1% et intron 14G:A, 0,5%), ZHONG *et al.* (1996) ont récemment mis en évidence une augmentation du risque cardiovasculaire associée à une diminution de la CETP (-35%) et à une augmentation du cholestérol HDL (+10% pour $Asp_{442} \rightarrow Gly_{442}$). Ces données confirment d'une part des études réalisées chez des souris transgéniques (HuCIII/CETPTg) hypertriglycéridémiques, chez lesquelles l'expression de la CETP inhibe le développement de lésions athéroscléreuses précoces (HAYEK *et al.* 1995), et d'autre part des études montrant des atteintes cardiovasculaires précoces et un arcus cornéen chez des sujets génétiquement déficients en CETP et présentant une faible activité de leur lipase hépatique (HIRANO *et al.* 1995).

II. Expression de la CETP dans différents tissus et cellules.

1. Localisation tissulaire.

Alors que chez l'homme la distribution de la CETP est relativement ubiquitaire, elle est principalement hépatique chez d'autres espèces. Chez l'homme, le foie, l'intestin grêle, les surrénales et la rate (DRAYNA *et al.* 1987) synthétisent la CETP. Une activité de transfert a également été mesurée dans le liquide céphalo-rachidien, mettant ainsi en évidence une synthèse directe de CETP par le cerveau (ALBERS *et al.* 1992, YAMADA *et al.* 1995). L'activité de transfert au niveau cérébral représente environ 12% de l'activité plasmatique. La CETP pourrait donc avoir un rôle dans le transport et la redistribution des lipides dans le système nerveux central. Au niveau du tissu adipeux, la taille des adipocytes et la concentration en cholestérol membranaire semblent influencer

l'expression du gène de la CETP (RADEAU *et al.* 1995). Chez le hamster le tissu adipeux, le coeur et le muscle squelettique sont les principales sources d'ARNm de CETP, alors que l'expression est plus faible au niveau de l'estomac, de la rate et du foie (JIANG *et al.* 1991). Chez le singe, l'analyse tissulaire montre que le foie et l'aorte thoracique expriment des niveaux élevés d'ARNm de CETP alors que ces derniers sont plus faibles au niveau des surrénales, de la rate et de l'aorte abdominale et indétectables dans le cerveau, les reins, l'intestin et les muscles squelettiques (PAPE *et al.* 1991a). Compte tenu de la masse du foie et du tissu adipeux, PAPE *et al.* (1991a) ont démontré que ces tissus étaient les principaux responsables de la production de CETP chez le singe. Chez le lapin et le singe, les ARNm de CETP sont localisés principalement dans le foie, au niveau des cellules hépatiques non-parenchymateuses, de manière plus faible dans les surrénales et le rein et sont indécelables dans la rate. (NAGASHIMA *et al.* 1988, PAPE *et al.* 1991a-b, REA *et al.* 1993).

2. Sécrétion.

La CETP peut être synthétisée et sécrétée par nombreux types cellulaires que ce soient des macrophages humains (TOLLEFSON *et al.* 1985, FAUST *et al.* 1990), des cellules hépatiques HepG2 (SWENSON *et al.* 1987, FAUST *et al.* 1989, SPERKER *et al.* 1993), des cellules entérocytaires CaCo2 (FAUST et ALBERS 1988) ou bien encore des lignées cellulaires SW872 isolées à partir de liposarcomes humains (RICHARDSON *et al.* 1996). Cette sécrétion peut-être régulée par la présence, dans le milieu d'incubation, d'acides gras tels que l'oléate de sodium, pour les cellules $CaCO_2$ (FAUST *et al.* 1990), ou de butyrate de sodium pour les cellules HepG2 (SPERKER *et al.* 1993). De même, l'addition de LDL, à un milieu de culture contenant des cellules SW872, augmente la sécrétion d'activité CETP dans le milieu d'incubation. Le cholestérol LDL et le 25-OH cholestérol sont également capables d'induire une augmentation du taux d'ARNm de CETP. Ces données suggèrent que le cholestérol pourrait induire une augmentation de la quantité d'ARNm et entraînerait secondairement une augmentation du taux de CETP (RICHARDSON *et al.* 1996).

III. Régulation de l'expression du gène.

De nombreuses études ont montré que le gène de la CETP pouvait être régulé par des variations d'états métaboliques et nutritionnels. En particulier, des régimes riches en cholestérol induisent, au niveau de différents tissus (tissu adipeux, coeur, muscle squelettique, hépatocytes), une augmentation de la transcription du gène de la CETP d'où une augmentation du taux d'ARNm (QUINET *et al.* 1990, JIANG *et al.* 1991, WARREN *et al.* 1991, JIANG *et al.* 1992, AGELLON *et al.* 1992, QUINET *et al.* 1993, MARTIN *et al.* 1993). La régulation de l'expression du gène de la CETP, en réponse à des régimes riches en cholestérol ou à des hypercholestérolémies endogènes, serait dépendante de la présence de séquences encadrantes de ce gène (JIANG *et al.* 1992, MASUCCI-MAGOULAS *et al.* 1996, OLIVEIRA *et al.* 1996). De plus, cette réponse varierait en fonction de différents génotypes en apoE (MARTIN *et al.* 1993). L'expression du gène peut également être influencée par d'autres facteurs tels que les lipopolysaccharides (LPS) et les corticostéroïdes qui peuvent induire, chez l'homme et chez les souris transgéniques-CETP, une diminution de la synthèse hépatique d'ARNm ou une réduction du taux plasmatique de CETP (MASUCCI-MAGOULAS *et al.* 1995). De même, les taux d'ARNm hépatiques, adipeux, cardiaques ou musculaires peuvent être diminués par injection intraveineuse d'oligodésoxynucléotides antisens chez le lapin (SUGANO *et al.* 1996) ou par certaines endotoxines et cytokines chez les hamsters (HARDARD ∫TTIR *et al.* 1996) ce qui induit des modifications du profil lipoprotéique.

IV. Epissage alternatif de l'ARNm de CETP.

INAZU *et al.* (1992a) ont rapporté l'existence d'un ARNm dans lequel l'exon 8 est directement lié à l'exon 10. L'expression cellulaire de cette protéine délétée pour l'exon 9 (Δ_{E9}-CETP) conduit à la synthèse d'une protéine de plus petite taille, relativement abondante. L'ARNm de la Δ_{E9}-CETP représente 15 à 35% de l'ARNm total de la CETP dans le foie et le tissu adipeux, 35 à 65% dans la rate (QUINET *et al.* 1993) et environ 30% dans des lignées cellulaires isolées à partir de liposarcomes humains SW872 (RICHARDSON *et al.* 1996). Le polypeptide codé par cet épissage alternatif est inactif pour le transfert de lipides neutres. Par ailleurs, la Δ_{E9}-CETP est faiblement sécrétée et inhibe la sécrétion de la CETP "*sauvage*" par formation d'un complexe hétéromérique entre ces deux types de CETP (QUINET *et al.* 1993). L'épissage alternatif pourrait être un mécanisme de régulation post-traductionnel permettant de réduire l'expression de la CETP (TALL 1995, YANG *et al.* 1996).

B. Fonctions de la CETP.

I. Transfert de lipides par la CETP.

1. Transfert de lipides entre les lipoprotéines.

In vitro, la CETP catalyse les transferts bidirectionnels de lipides neutres entre toutes les fractions lipoprotéiques isolées (BARTER et LALLY 1979a, BARTER *et al.* 1979b, HOPKINS et BARTER 1980, BARTER *et al.* 1981, HESLER *et al.* 1988), c'est à dire un transfert d'esters de cholestérol des HDL et LDL vers les VLDL, et de triglycérides des VLDL (lipoprotéines riches en TG) vers les HDL et LDL (lipoprotéines pauvres en TG).

In vivo, les LDL et HDL ayant une vitesse de catabolisme relativement faible (de l'ordre de 1-2%/h) (BARTER et LALLY 1979a) et un rapport EC / TG similaire, leurs pools d'esters de cholestérol et de triglycérides vont s'équilibrer (figure 2). *In vitro*, on met le

plus souvent en évidence un échange soit de triglycérides (BARTER *et al.* 1979b) soit d'esters de cholestérol (SNIDERMAN *et al.* 1978) sans transfert de masse. Néanmoins, lorsque des lipoprotéines sont incubées pendant 24h, la CETP présente dans le milieu d'incubation induit un transfert net massique d'esters de cholestérol des HDL vers les LDL (BARTER *et al.* 1990b, GAMBERT *et al.* 1990). L'équilibre des pools d'esters de cholestérol entre ces deux fractions lipoprotéiques n'intervient qu'après 1 à 3 h d'incubation. Chez des sujets présentant une hyperlipidémie combinée - dyslipidémie caractérisée par une augmentation du taux de VLDL et LDL et une réduction du taux de HDL - il a été mis en évidence une augmentation du transfert net massique d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et un échange d'esters de cholestérol, sans transfert de masse, des HDL vers les LDL (GUERIN *et al.* 1996b). A l'opposé, les VLDL présentent un taux de catabolisme relativement élevé (10-40%/h) (BARTER et LALLY 1979a) et un rapport EC / TG faible par rapport aux HDL et LDL. Dans ces conditions, on n'observe pas *in vivo* d'équilibre des pools d'esters de cholestérol et de triglycérides dans ces fractions lipoprotéiques. *In vitro*, on note un transfert net massique de triglycérides des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL) vers les lipoprotéines pauvres en triglycérides (HDL et LDL) et un transfert net massique, réciproque et équimoléculaire d'esters de cholestérol des HDL et LDL vers les VLDL (HOPKINS et BARTER 1980, BARTER *et al.* 1980b, MORTON et ZILVERSMIT 1983, YEN *et al.* 1989).

2. Transfert de lipides avec les cellules.

Outre son rôle dans le transfert des lipides neutres entre les lipoprotéines, la CETP favorise également l'efflux d'esters de cholestérol et de triglycérides depuis diverses cellules (cellules musculaires lisses aortiques, macrophages péritonéaux, macrophages perméabilisés) vers le milieu de culture (STEIN *et al.* 1985, STEIN *et al.* 1986, MORTON 1988b). Elle permet également le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers des cellules hépatocytaires tumorales en culture (HepG2) (GRANOT *et al.* 1987, RINNINGER

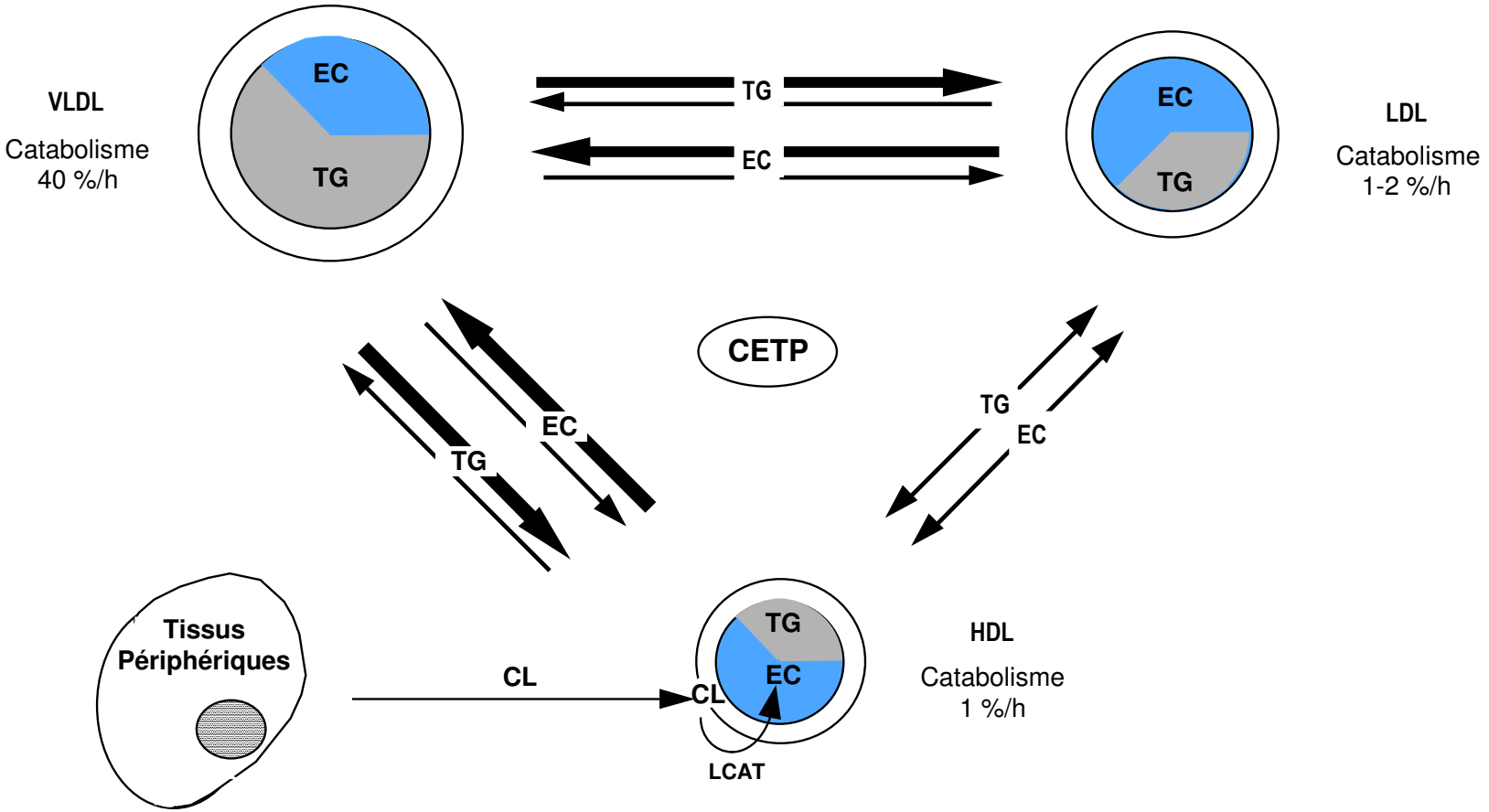


Figure 2: **Equilibration des esters de cholestérol et triglycérides entre HDL et LDL.**(D'après: Barter *et al.* (1990) *Atherosclerosis* **84**, 13-24)

et PITTMAN 1989, FRANCIS *et al.* 1991), vers des cellules musculaires lisses, et dans une moindre mesure vers des fibroblastes mais semble sans influence sur le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les cellules endothéliales ou les macrophages J774 (GRANOT *et al.* 1987). Des différences dans les vitesses de transfert ont été mises en évidence par FRANCIS *et al*. (1991) qui ont montré que lorsque le transfert d'esters de cholestérol s'effectuait des LDL vers des cellules HepG2 il était environ 25 fois supérieur à celui observé à partir des HDL. La CETP n'agirait pas en augmentant la liaison ou la fusion des HDL avec la surface cellulaire, mais en tant que transporteur lipidique (GRANOT *et al.* 1987). La CETP interviendrait également au niveau de l'homéostasie cellulaire du cholestérol, puisqu'une charge en esters de cholestérol au niveau des macrophages entraîne une augmentation, dose-dépendante, de la synthèse de CETP dans ces cellules (FAUST *et al.* 1990). Ce mécanisme peut être important dans la captation d'esters de cholestérol à partir de cellules chargées en lipides comme celles présentes dans les lésions athéroscléreuses et pourrait constituer un mécanisme de protection en réponse à l'accumulation de cholestérol au niveau des macrophages de la paroi artérielle (FAUST *et al.* 1990).

II. Rôle de la CETP sur les changements de taille des lipoprotéines.

1. Conversion des HDL.

Les HDL interviennent dans le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, ce qui constitue le transport inverse du cholestérol. Ces lipoprotéines sont composées de deux sous-fractions principales différant par leur taille, leur densité et leur composition apolipoprotéique (CHEUNG et ALBERS 1984). On met ainsi en évidence une sous fraction de grande taille (HDL_2) et une sous-fraction de taille plus faible (HDL_3). Chacune de ces sous-fraction est elle-même hétérogène, puisqu'en utilisant des techniques d'électrophorèse sur gel en gradient on montre que les HDL_2 peuvent être séparées en deux sous-fractions (HDL_{2b}, HDL_{2a} de diamètre respectif 10,6 et 9,2 nm) et

les HDL_3 en trois sous-fractions (HDL_{3a}, HDL_{3b}, HDL_{3c} de respectivement 8,4; 7,9 et 7,6 nm de diamètre) (BLANCHE *et al.* 1981) (figure 3).

L'hétérogénéité de ces sous-populations de HDL implique des fonctions métaboliques (CASTRO et FIELDING 1988) et physiopathologiques différentes, puisqu'un rôle de protection vis-à-vis de l'athérosclérose a été conféré aux HDL_2 (ANDERSON *et al.* 1978, SHEPHERD *et al.* 1980). A l'opposé, un taux faible de cholestérol HDL est associé à une augmentation du risque cardiovasculaire, reflétant une réduction des sous-populations de HDL de plus grande taille et plus denses (ANDERSON *et al.* 1978, JOHANSSON *et al.* 1991, CHEUNG *et al.* 1991, FÖGER *et al.* 1995). Des facteurs susceptibles de moduler la distribution des sous-populations de HDL peuvent donc présenter une importance particulière en termes de métabolisme normal et de prédisposition à l'athérosclérose.

In vitro, l'incubation d'un plasma humain non traité entraîne une diminution de la population de HDL_{3a} et HDL_{3b} et la formation à la fois de particules de plus grande taille (HDL_{2a}) et de particules de plus petite taille (HDL_{3c}) (NICHOLS *et al.* 1981).

Différents facteurs peuvent être impliqués dans ce phénomène de conversion :

* la LCAT qui permet l'estérification du cholestérol libre en cholestérol estérifié. Ce dernier va alors s'accumuler au coeur des particules HDL et augmenter leur taille (DAERR et GRETEN 1982, SCHMITZ *et al.* 1981, RAJARAM et BARTER 1986),

* la LPL, en hydrolysant les triglycérides dans les chylomicrons et les VLDL, libère des composés de surface qui peuvent s'associer avec des HDL et ainsi contribuer à la conversion des HDL_3 en HDL_2 (PATSCH *et al.* 1978, TALL *et al.* 1982),

* l'HL, en hydrolysant les triglycérides et les phospholipides des HDL_2, donne naissance à des HDL_3 (SHIRAI *et al.* 1981, GROOT *et al.* 1983) et à des pré-β_1 HDL de plus petite taille (BARRANS *et al.* 1994),

* la PLTP peut également intervenir dans les phénomènes de conversion des HDL en l'absence d'autres fractions lipoprotéiques en donnant naissance à des HDL de grande taille ainsi qu'à des particules de très petite taille à partir d'une population de HDL de taille intermédiaire (JAUHIAINEN *et al.* 1993, TU *et al.* 1993, PUSSINEN *et al.* 1995, PULCINI *et al.* 1995, ALBERS *et al.* 1995, LAGROST *et al.* 1996, LAGROST 1997).

* enfin, la CETP en favorisant le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les autres particules lipoprotéiques entraîne l'apparition de populations HDL de plus

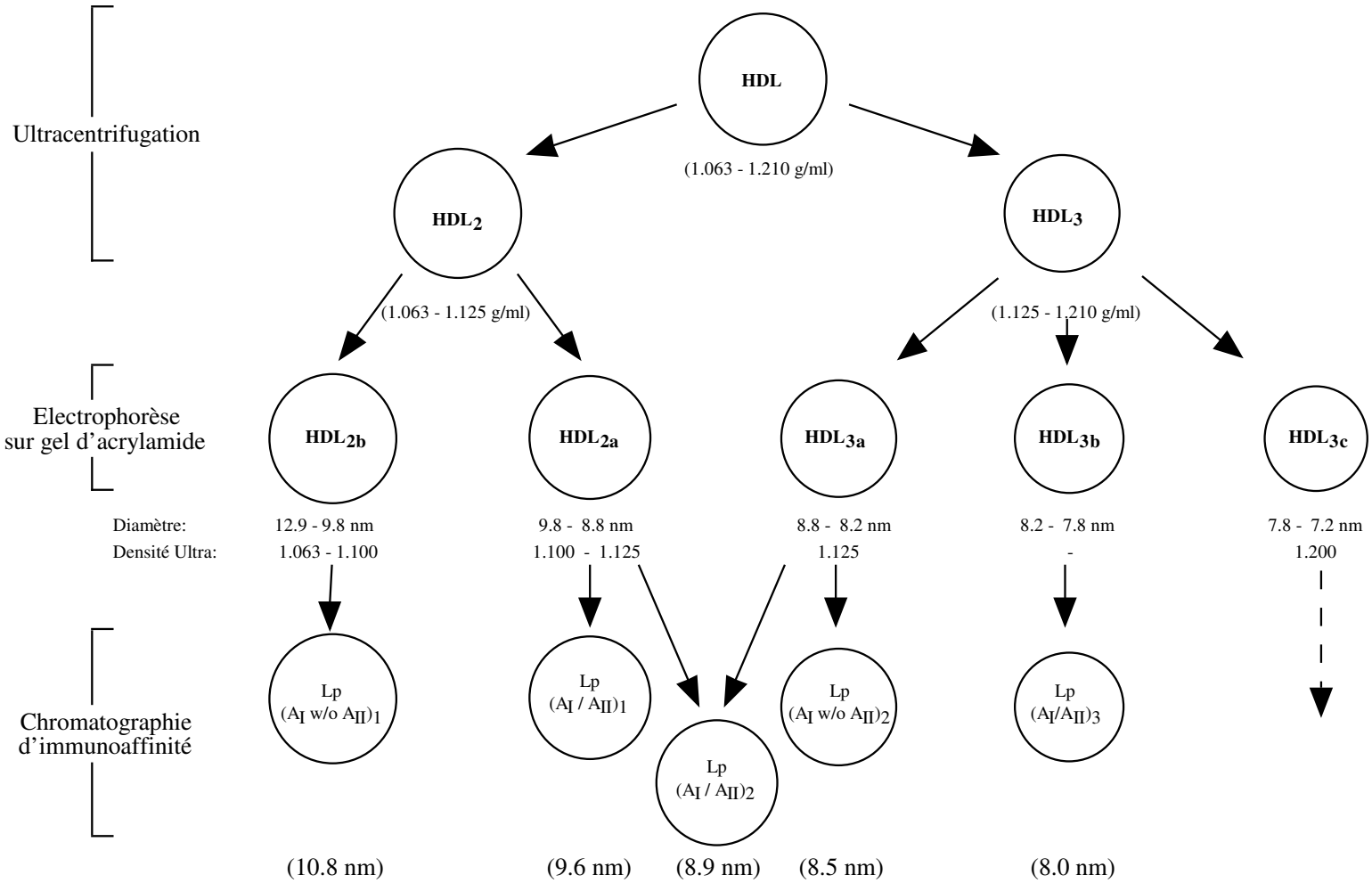


Figure 3: **Caractérisation des sous-populations de HDL dans le plasma humain.** D'après Blanche *et al.* (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 408-419
Cheung *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12201-12209.

grande et de plus petite taille (HA *et al.* 1983, HOPKINS *et al.* 1985, ELLSWORTH *et al.* 1987, BARTER *et al.* 1990c, LAGROST *et al.* 1996, RYE *et al.* 1997, LAGROST 1997). Ce phénomène de conversion des HDL par la CETP, qui est stimulé par les acides gras (BARTER *et al.* 1990c, LAGROST 1992b), peut se produire en l'absence de transferts lipidiques entre les HDL et d'autres fractions lipoprotéiques (LAGROST *et al.* 1990, BARTER *et al.* 1990c). Il a été montré que le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les autres lipoprotéines s'accompagnait d'un transfert équimolaire de triglycérides en sens inverse (NICHOLS et SMITH 1965, CHAJEK et FIELDING 1978). Or, le volume moléculaire des triglycérides étant environ 1,5 fois supérieur à celui des esters de cholestérol (SHEN *et al.* 1977), le remplacement des esters de cholestérol par des triglycérides dans le coeur des particules lipoprotéiques pourrait expliquer l'augmentation de taille des HDL_3 observée dans certaines études (HOPKINS *et al.* 1985). La formation de particules de plus petite taille pourrait quant à elle être expliquée soit par un transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL non associé à un transfert réciproque, mole à mole, de triglycérides (HOPKINS *et al.* 1985) soit par la dissociation de l'apoAI à la surface des lipoprotéines lors du phénomène de conversion (LAGROST 1992b, KUNITAKE *et al.* 1992) ou bien encore par un mécanisme impliquant la fusion de particules. En effet, RYE *et al.* (1997) ont récemment démontré que la CETP, en favorisant la fusion de deux particules HDL reconstituées (HDLr), donne naissance à un composé instable qui se réorganise en trois particules de plus petites tailles.

2. Distribution en taille des LDL.

La CETP joue également un rôle dans les changements de taille des LDL (DECKELBAUM *et al.* 1982, YAMASHITA *et al.* 1988, GAMBERT *et al.* 1990, SAKAI *et al.* 1991, LAGROST *et al.* 1993). En effet, des études effectuées sur des sujets déficients en CETP montrent que ces derniers présentent des LDL de petite taille (YAMASHITA *et al.* 1988, SAKAI *et al.* 1991). A l'opposé, lorsque la CETP est présente, elle va permettre la formation, à partir de LDL de petite taille et denses, d'une population homogène de plus

grande taille en transférant des esters de cholestérol depuis les HDL (GAMBERT *et al.* 1990, SAKAI *et al.* 1991) ou des triglycérides des VLDL vers les LDL (DECKELBAUM *et al.* 1982). L'action d'hydrolyse des triglycérides sur ces LDL peut produire des LDL de plus petite taille (DECKELBAUM *et al.* 1982).

C. Mécanismes d'action et régulation de l'activité CETP.

I. Etapes clés de la réaction de transfert des esters de cholestérol.

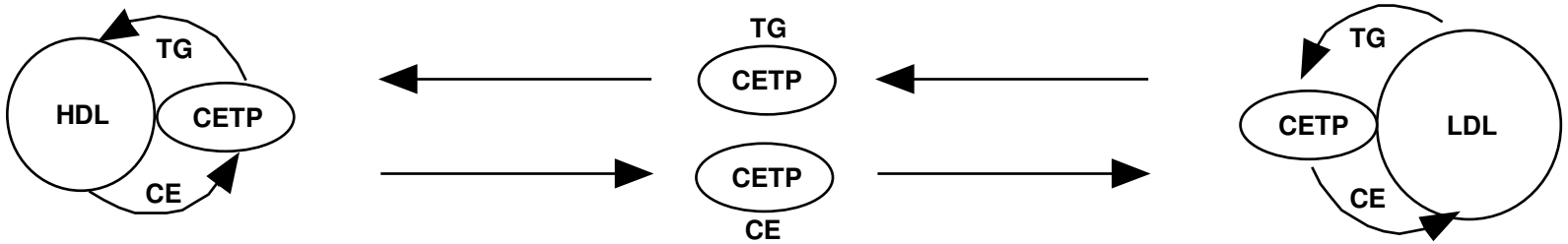
1. Modèles cinétiques.

Le mécanisme cinétique permettant d'expliquer le transfert de lipides neutres d'un substrat lipoprotéique vers un autre est, à l'heure actuelle, toujours controversé. Cependant, comme le montre la figure 4, deux modèles cinétiques principaux ont été proposés (IHM *et al.* 1982b, BARTER et JONES 1980a).

Dans un premier modèle (figure 4-A) la CETP agirait comme une "*navette*" en transportant les esters de cholestérol et les triglycérides entre les diverses fractions lipoprotéiques (BARTER *et al.* 1980a, SWENSON *et al.* 1988). Dans ce cas, la CETP se lierait avec une lipoprotéine donneuse à la surface de laquelle elle capterait une molécule de lipide neutre (CE) sur un site de liaison. Elle se dissocierait ensuite de la HDL, diffuserait dans le milieu et entrerait en contact avec une lipoprotéine acceptrice (VLDL ou LDL) avec laquelle elle échangerait une autre molécule de lipide neutre (TG).

Dans un second modèle (figure 4-B), la CETP permettrait la formation d'un "*complexe ternaire*" en impliquant une lipoprotéine donneuse et une lipoprotéine acceptrice (IHM *et al.* 1982b, AU-YOUNG et FIELDING 1992, LAGROST et BARTER 1992c, RYE *et al.* 1997). Dans cette situation, la CETP resterait liée à la lipoprotéine donneuse, avec laquelle elle diffuserait dans le milieu, jusqu'à ce que le complexe entre en collision avec une lipoprotéine acceptrice. La CETP pourrait alors échanger les molécules de lipides neutres dans un complexe ternaire dont la formation serait

A. Modèle de navette :



B. Complexe ternaire :

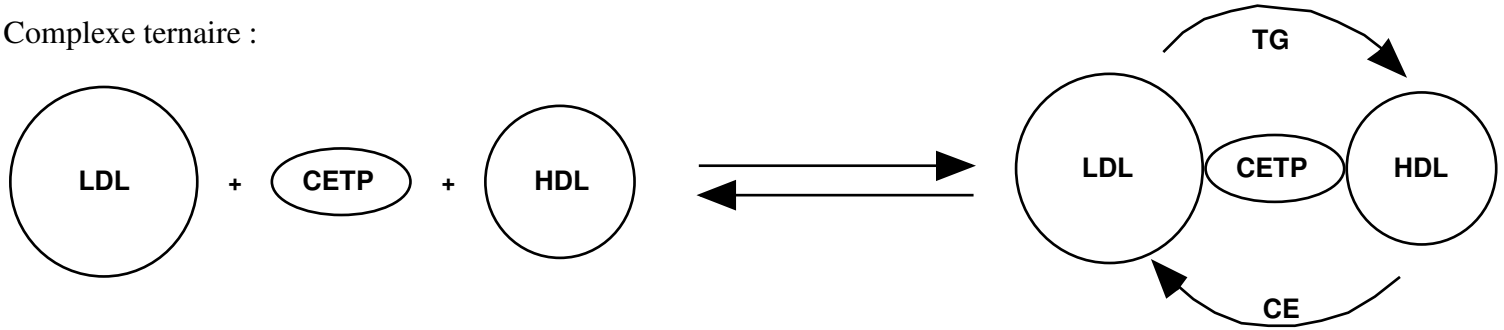


Figure 4: **Modèles cinétiques de la réaction de transfert des esters de cholestérol et triglycérides, CETP-dépendants.**

(D'après: Lagrost *et al.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 209-236)

augmentée en présence d'acide oléique (LAGROST et BARTER 1992c). Un troisième modèle, similaire au second impliquant la présence d'un dimère de CETP avait été proposé (TALL 1993). Cependant, il semble que la CETP se lie aux HDL sous forme d'un monomère et que dans les conditions physiologiques, la CETP se trouve sous forme monomérique en solution (BRUCE *et al.* 1995a, CONNOLLY *et al.* 1996a).

Il est donc peu probable que le mécanisme de transfert des lipides neutres implique la formation d'un dimère de CETP (TALL 1995). Il semble cependant que ces deux mécanismes ("*navette*" et "*complexe ternaire*") ne s'excluent pas l'un l'autre (BARTER *et al.* 1990b). Le modèle de "*navette*" pourrait expliquer l'hétéroéchange d'esters de cholestérol et triglycérides entre les lipoprotéines, alors que le modèle de "*complexe ternaire*" expliquerait la conversion des HDL en particules de plus petite taille, appauvries en lipides (BARTER *et al.* 1990b, RYE *et al.* 1997).

En fait, quel que soit le mécanisme d'action de la CETP, il est généralement admis que l'échange de lipides neutres fait intervenir deux étapes principales : 1°/ l'interaction de la CETP avec les particules lipoprotéiques, 2°/ la prise en charge des molécules de lipides neutres.

2. Liaison de la CETP aux lipoprotéines.

La réaction de transfert des lipides implique une association physique entre la CETP et les substrats lipoprotéiques (MORTON 1985). En effet, il existe une forte corrélation entre l'augmentation de liaison de la CETP aux lipoprotéines et l'activité de transfert (MORTON 1985, SAMMETT et TALL 1985). Cependant, la liaison entre la CETP et les VLDL et LDL est plus labile que celle intervenant entre la CETP et les HDL (PATTNAIK et ZILVERSMIT 1979, GROENER *et al.* 1984, MORTON 1985). L'affinité de la CETP pour les lipoprotéines est gouvernée par des interactions électrostatiques et hydrophobes (PATTNAIK et ZILVERSMIT 1979, NISHIDA *et al.* 1993). On pensait que cette interaction pouvait faire intervenir soit des triplets lysine (acides aminés 377-379) chargés positivement, présents à la surface de la CETP (WANG *et al.* 1991) soit une séquence carboxy-terminale Phe_{454}-Leu_{455}-Leu_{456}-Leu_{457} (AU-YOUNG et FIELDING 1992).

Or, à l'heure actuelle, il est admis que la liaison entre la CETP et les lipoprotéines implique :

- les résidus Lys_{233} et Arg_{259} (JIANG *et al.* 1995), chargés positivement, présents à la surface de la CETP,

- et des composés lipoprotéiques de surface chargés négativement (groupement phosphate des phospholipides, groupement carboxylique des acides gras non estérifiés ou les résidus chargés négativement des molécules d'apolipoprotéines) (PATTNAIK et FIELDING 1979, SAMMETT et TALL 1985, KATO *et al.* 1989, NISHIDA *et al.* 1993, WANG *et al.* 1995, MASSON *et al.* 1996, RAJARAM et SAWYER 1997).

Il semble par ailleurs qu'une charge électronégative optimale à la surface de la lipoprotéine soit nécessaire pour obtenir une interaction optimale de la CETP avec les substrats lipoprotéiques et une activité de transfert maximale (NISHIDA *et al.* 1993, MASSON *et al.* 1996). Ainsi, il a été démontré que des modifications de la charge électronégative à la surface des lipoprotéines, induites soit par accumulation d'acides gras durant la lipolyse (SAMMETT et TALL 1985) soit par des variations de pH (SAMMETT et TALL 1985) ou bien encore par des modifications chimiques (succinylation ou acétylation) (KATO *et al.* 1989, NISHIDA *et al.* 1993), modifient à la fois l'interaction entre la CETP et les lipoprotéines et l'efficacité de la réaction de transfert. En se fondant sur ce principe d'interactions électrostatiques, des inhibiteurs pharmacologiques de la CETP ont pu être récemment proposés (PIETZONKA *et al.* 1996).

3. Liaison de la CETP aux lipides neutres.

La CETP présenterait un site de liaison des lipides neutres au niveau des 26 acides aminés de sa partie carboxy-terminale (AU-YOUNG et FIELDING 1992). En effet, les anticorps TP2 se liant à cet épitope de 26 acides aminés sont susceptibles d'inhiber le transfert lipidique soit en bloquant la liaison des lipides à la CETP (SWENSON *et al.* 1989) soit en créant un encombrement stérique local (WANG *et al.* 1993). Les acides aminés 454-457 (AU-YOUNG et FIELDING 1992) ou 470-475 (WANG *et al.* 1995), formant la partie carboxy-terminale de la CETP, pourraient faire partie d'un site de

liaison des lipides neutres directement impliqué dans le mécanisme de transfert. L'hélice carboxy-terminale de la CETP formerait une queue flexible qui pénétrerait dans la lipoprotéine après la liaison avec cette dernière. La face hydrophobe de l'hélice pourrait alors entrer en contact avec une molécule de lipide neutre et la lier dans une poche formée par l'hélice carboxy-terminale et les régions hydrophobes voisines. Il semblerait qu'au niveau de cette poche hydrophobe existe un résidu cystéine essentiel à la réaction de transfert (CONNOLLY *et al.* 1996c). Chez le singe, il existerait deux sites spécifiques de liaison des triglycérides et des esters de cholestérol (MELCHIOR *et al.* 1995). Ainsi, des modifications conformationnelles, induites par la liaison d'une molécule d'esters de cholestérol sur un site de liaison, empêcherait l'accessibilité aux triglycérides sur le second site et réciproquement.

En résumé, on peut envisager deux étapes principales permettant d'expliquer la réaction de transfert des esters de cholestérol (figure 5). Dans une première étape (Etape I) un ou plusieurs groupements chargés positivement, présents à la surface de la CETP, interagiraient avec des groupements chargés négativement (groupement phosphate des phospholipides, groupement carboxylique des acides gras non estérifiés ou charge négative des molécules d'apolipoprotéines), présents à la surface de la lipoprotéine. Cette interaction induirait des changements conformationnels de la CETP, permettant le démasquage d'un site de liaison spécifique des lipides neutres (Etape II) qui pourrait ainsi capter une molécule d'esters de cholestérol ou de triglycéride.

II. Facteurs modifiant la réaction de transfert des esters de cholestérol.

1. Concentration en substrats lipoprotéiques.

Outre la masse CETP, divers facteurs plasmatiques peuvent modifier l'activité de transfert. Ainsi, le taux de transfert des esters de cholestérol entre les HDL et les

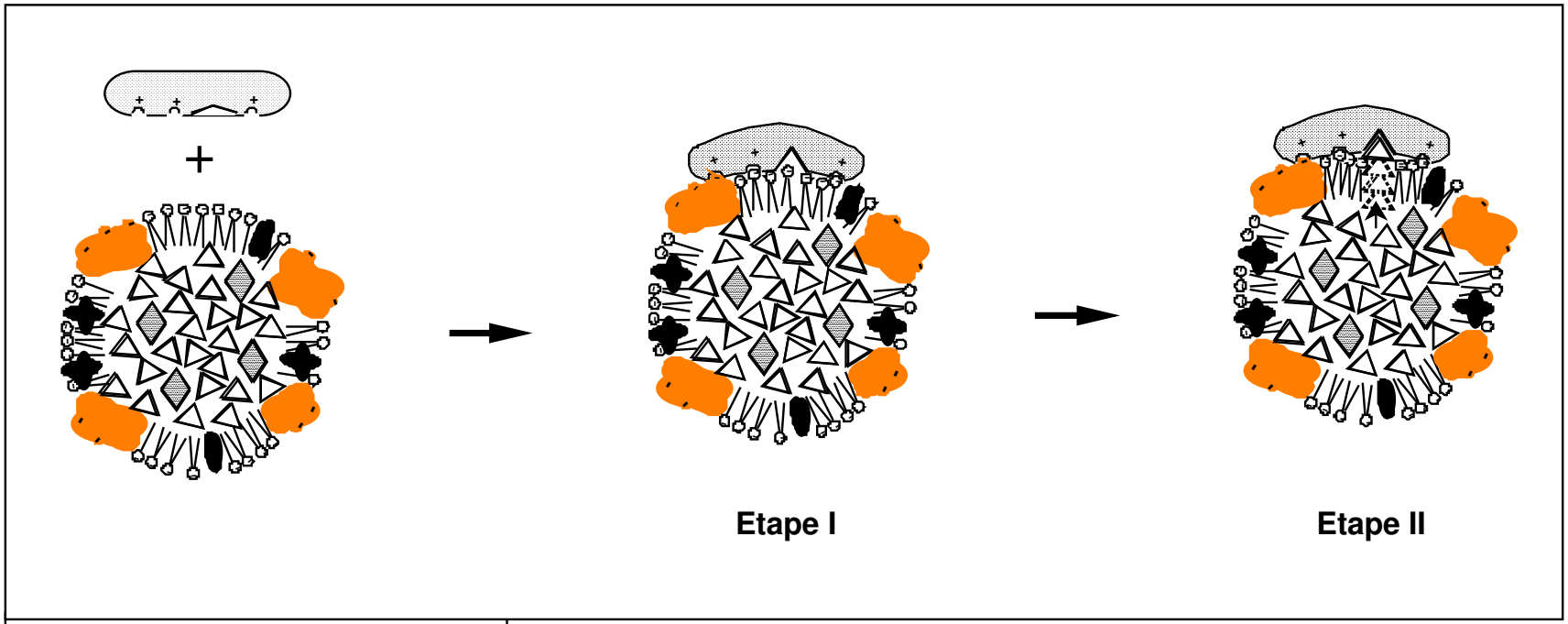


Figure 5: **Mécanisme de liaison supposé entre les lipoprotéines et la CETP.** Dans l'étape I, un site chargé positivement sur la molécule de CETP interagirait avec au moins un site chargé négativement (groupement phosphate des phospholipides, groupement carboxylique des acides gras non estérifiés ou charge négative des molécules d'apolipoprotéines) à la surface de la lipoprotéine. La liaison de la CETP à la lipoprotéine pourrait induire des modifications conformationnelles de la CETP, démasquant un site de liaison des lipides neutres. Dans l'étape II, une molécule de lipide neutre localisée près d'un groupement acyl du manteau phospholipidique pourrait se lier au site de liaison des lipides neutres avant d'être transférée vers une autre lipoprotéine. (D'après: Lagrost *et al.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 209-236.)

lipoprotéines contenant l'apoB semble être influencé à la fois par la concentration relative et la concentration absolue des diverses fractions lipoprotéiques (BARTER et JONES 1980a, RYE et BARTER 1992b). Il a été montré que le taux de transfert des esters de cholestérol entre les HDL et les LDL augmente parallèlement à la concentration en LDL (BARTER et JONES 1980a, BARTER *et al.* 1982b, KURASAWA *et al.* 1985) ou en VLDL (MARCEL *et al.* 1980, BARTER *et al.* 1982a, LASUNCION *et al.* 1992) pour atteindre un maximum au-delà d'un rapport molaire accepteur / donneur de 2 / 1 (MARCEL *et al.* 1980). A l'opposé, l'augmentation de concentration en HDL réduit le taux de transfert des esters de cholestérol entre les HDL et les VLDL + LDL (BARTER et JONES 1980a, BARTER *et al.* 1982b, LAGROST *et al.* 1993). En fait, il semble que le rapport lipoprotéines donneuses (HDL) sur lipoprotéines acceptrices (VLDL ou LDL) soit un facteur déterminant dans la régulation des phénomènes de transfert d'esters de cholestérol puisque de fortes concentrations en HDL, par rapport aux VLDL ou LDL, peuvent totalement supprimer le transfert d'esters de cholestérol marqués des HDL vers les VLDL et LDL (TOLLEFSON *et al.* 1988). Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la CETP ne favorise pas uniquement le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les autres fractions lipoprotéiques mais également entre différentes fractions HDL. Les complexes CETP / HDL étant plus stables que ceux formés avec d'autres lipoprotéines (PATTNAIK et ZILVERSMIT 1979, MORTON 1985) on peut donc envisager qu'une augmentation de concentration des HDL accroisse la probabilité des transferts d'esters de cholestérol, CETP-dépendants, intra-HDL au détriment d'échanges inter-lipoprotéines (BARTER et JONES 1980a, IHM *et al.* 1982b, TOLLEFSON *et al.* 1988, RYE et BARTER 1992b, LAGROST *et al.* 1993).

La concentration en lipoprotéines riches en triglycérides semble également être un facteur important de régulation de l'activité CETP, puisqu'une augmentation du taux de lipoprotéines acceptrices riches en triglycérides entraîne un accroissement du transfert net massique d'esters de cholestérol depuis les HDL (TALL 1986, DOUSSET *et al.* 1989, MANN *et al.* 1991). *In vivo*, chez des sujets normolipidémiques, la concentration en VLDL plasmatiques serait un facteur limitant du transfert massique d'esters de cholestérol vers ces lipoprotéines. A l'opposé, chez des sujets hypertriglycéridémiques présentant un taux élevé de VLDL plasmatiques, le facteur limitant serait la masse de la CETP (MANN *et al.* 1991, LAGROST 1994a, GUERIN *et al.* 1996c). En d'autres termes,

chez des sujets normolipidémiques, où la CETP est en excès, la disponibilité en triglycérides (concentration en VLDL) limite le taux de transfert net des esters de cholestérol alors que chez des sujets hypertriglycéridémiques, où la concentration en VLDL plasmatiques est accrue, le transfert net d'esters de cholestérol est sous la dépendance de la masse de CETP.

2. Contenu lipidique des lipoprotéines.

Il a été montré que la composition des VLDL et des LDL était à même d'affecter la réaction de transfert des esters de cholestérol des HDL vers ces lipoprotéines acceptrices (DULLAART *et al.* 1987). Ainsi, pour les VLDL, la composition de la particule dans son ensemble paraît avoir une importance dans la réaction de transfert, alors qu'au niveau des LDL, seule la composition de la surface de la particule modulerait la capacité à recevoir des esters de cholestérol (DULLAART *et al.* 1987). En fait, les caractéristiques de surface pourraient être importantes pour l'échange bidirectionnel sans transfert de masse, alors que la composition du coeur régulerait le transfert net massique (EISENBERG 1985, DULLAART *et al.* 1987).

2.1. Composés de surface.

Comme nous l'avons dit précédemment, les composés de surface des lipoprotéines influencent la réaction de transfert d'esters de cholestérol (DULLART *et al.* 1987, MORTON et STEINBRUNNER 1990). L'activité de transfert des lipides étant dépendante de l'interaction de la CETP avec les lipides présents à la surface des lipoprotéines, des variations de la concentration en cholestérol libre pourraient, en modifiant la fluidité des lipides de surface, modifier la disponibilité des esters de cholestérols et des triglycérides pour la CETP (MORTON 1988a). Ainsi, l'enrichissement des lipoprotéines en cholestérol

libre entraîne une augmentation du transfert net d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL (MORTON 1988a).

2.2. Esters de cholestérol et triglycérides.

Ces composés sont également capables d'influencer l'activité CETP (DULLART *et al.* 1987, SPARKS et PRITCHARD 1989a, SPARKS *et al.* 1989b). La cinétique de transfert des esters de cholestérol d'une particule donneuse vers une particule acceptrice sera favorisée si la particule acceptrice est riche en triglycérides et pauvre en esters de cholestérol comme c'est le cas pour les VLDL. Ainsi, il a été démontré que les meilleurs accepteurs d'esters de cholestérol étaient, parmi les VLDL, les VLDL de grande taille qui sont les plus riches en triglycérides (NOËL *et al.* 1984, EISENBERG 1985, DULLART *et al.* 1987) et parmi les LDL, les LDL de grande taille (MARZETTA *et al.* 1993, GUERIN *et al.* 1994a). Chez des sujets hypertriglycéridémiques, on observe d'ailleurs la présence de VLDL enrichies en esters de cholestérol (EISENBERG *et al.* 1984) alors que les LDL et HDL sont riches en triglycérides (DECKELBAUM *et al.* 1984). Il existe par ailleurs une corrélation négative entre le rapport triglycérides / esters de cholestérol des HDL et leur capacité à donner des esters de cholestérol (AHNADI *et al.* 1993b).

2.3. Acides gras non estérifiés.

Les groupements ionisés des acides gras non estérifiés, localisés sur la couche externe de VLDL lipolysées, modulent l'activité de transfert des esters de cholestérol des HDL vers les VLDL (TALL *et al.* 1984, SAMMETT et TALL 1985). Cet effet inducteur est diminué par des variations de pH (de 7,5 à 6,0) indiquant par conséquent l'importance des groupements carboxyliques ionisés des acides gras (SAMMETT et TALL 1985). La lipolyse augmente la liaison entre la CETP et les HDL en raison d'un enrichissement des HDL en phospholipides et acides gras. Des HDL isolées du plasma en période postprandiale, enrichies en phospholipides, sont de meilleurs substrats pour la CETP que des HDL isolées en période de jeûne (TALL 1986b). De même, on note une

augmentation du transfert après action de la lipase hépatique (CLAY *et al.* 1990) ou ajout d'acides gras à des lipoprotéines (SAMMETT et TALL 1985, BARTER *et al.* 1990c). Par ailleurs, des acides gras, mis en présence de VLDL et LDL, induisent une augmentation du transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et une diminution du transfert réciproque de triglycérides, entraînant par conséquent la formation de HDL de très petite taille (BARTER *et al.* 1990c).

En fait, les acides gras présents à la surface des lipoprotéines favorisent la formation d'un complexe ternaire entre les HDL et LDL (LAGROST et BARTER 1992c) et induisent un transfert net massique d'esters de cholestérol vers les LDL (SAMMETT et TALL 1985, BARTER *et al.* 1990a, BARTER *et al.* 1990b). A l'opposé, en l'absence d'acides gras, la CETP transfèrerait les lipides neutres entre les HDL et les LDL principalement par un mécanisme de navette conduisant à un échange de lipides sans transfert net massique. En fait, l'effet activateur ou inhibiteur des acides gras sur l'activité CETP est dépendant d'un certain nombre de paramètres dont leur concentration finale, leur degré d'insaturation (LAGROST et BARTER 1991b) et la configuration *cis* ou *trans* de leur double liaison (LAGROST 1992a). L'activation de la CETP par les acides gras est un processus biphasique dépendant de la concentration de ces composés dans le milieu d'incubation (LAGROST et BARTER 1991b). Des études récentes (FOUCHER *et al.* 1996), conduites par résonance paramagnétique électronique, ont démontré que les acides gras non estérifiés pouvaient modifier la fluidité des lipoprotéines et par conséquent moduler l'activité de transfert des esters de cholestérol. Ainsi, dans les lipoprotéines enrichies en acides gras, la modification de la fluidité dépend de la structure de la chaîne carbonée des acides gras puisque les acides gras à chaîne moyenne (laurique et myristique) sont de meilleurs fluidifiants que leurs homologues à chaîne courte (octanoïque et décanoïque) ou à chaîne longue (palmitique et stéarique). De plus, l'introduction d'au moins une double liaison dans la chaîne carbonée induit une augmentation de la fluidité comparativement aux acides gras saturés.

3. Contenu en apolipoprotéines des substrats lipoprotéiques.

Diverses études utilisant des émulsions lipidiques artificielles ou des fractions lipoprotéiques plasmatiques ont suggéré que les apolipoprotéines, bien que n'étant pas des cofacteurs protéiques spécifiques susceptibles d'influencer par elles mêmes l'activité CETP, étaient néanmoins capables de réguler la réaction de transfert des lipides neutres (SON et ZILVERSMIT 1984, NISHIKAWA *et al.* 1988, NISHIDA *et al.* 1990, MILNER *et al.* 1991, KINOSHITA *et al.* 1993, OHNISHI et YOKOHAMA 1993, GUYARD-DANGREMONT *et al.* 1994b, LAGROST *et al.* 1994c, MAIN *et al.* 1996) et la conversion des HDL (RYE *et al.* 1992a, LAGROST 1992a).

Cependant les données de la littérature demeurent contradictoires. Ainsi, l'apoAI a été successivement décrite comme inhibitrice (SON et ZILVSERMIT 1984, CONNOLLY *et al.* 1996b), activatrice (NISHIKAWA *et al.* 1988, NISHIDA *et al.* 1990, MILNER *et al.* 1991, OHNISHI *et al.* 1993) ou sans effet sur l'activité de transfert (NISHIDE *et al.* 1989). En fait, le rôle activateur ou inhibiteur de l'apoAI et de l'apoAIV serait fonction de leur concentration (GUYARD-DANGREMONT *et al.* 1994b, MAIN *et al.* 1996) puisque il a été montré que ces apolipoprotéines étaient activatrices à de faibles concentrations et inhibitrices à des concentrations plus élevées (GUYARD-DANGREMONT *et al.* 1994b). L'apoE, quant à elle, augmenterait l'activité de transfert des lipides neutres (OHNISHI et YOKOHAMA 1993) en augmentant l'affinité de la CETP pour les VLDL (KINOSHITA *et al.* 1993). L'apoCIII semble également capable d'activer la réaction de transfert mais de manière moins importante que les autres apolipoprotéines (OHNISHI et YOKOHAMA 1993).

Des techniques d'enrichissement en apolipoprotéines ont été utilisées afin de modifier spécifiquement la proportion relative d'une apolipoprotéine par rapport à une autre (AI / AII), sans altérer la composition lipidique des lipoprotéines. Cette technique a permis d'étudier l'influence des apolipoprotéines sur l'activité de transfert. Ainsi, il a été montré que le taux de transfert d'esters de cholestérol était significativement plus faible en présence de HDL_3 contenant à la fois l'apoAI et l'apoAII ($HDL_{3\text{-}(AI/AII)}$) qu'en présence de HDL_3 contenant uniquement l'apoAI ($HDL_{3\text{-}(AI\ w/o\ AII)}$) (LAGROST *et al.* 1994c). L'analyse cinétique de l'interaction de la CETP avec des HDL_3, enrichies en apoAII, a mis en évidence que l'apoAII pourrait se comporter comme un inhibiteur incompétitif

de la réaction de transfert des esters de cholestérol (LAGROST *et al.* 1994c). Cependant pour MOULIN *et al.* (1994) les $Lp_{(AI\ w/o\ AII)}$ et les $Lp_{(AI\ /\ AII)}$ présentent des capacités similaires à induire une activité de transfert des esters de cholestérol catalysée par la CETP. Lorsque des HDL_3 sont progressivement enrichies en apoAII, sans modification de leur contenu lipidique, celles-ci présentent une diminution progressive de leur charge électronégative (MASSON *et al.* 1996). Dans ces conditions, le taux d'esters de cholestérol transférés des LDL vers les HDL_3, enrichies en apoAII, augmente progressivement lorsque la densité de charges négatives croît, c'est à dire lorsque les lipoprotéines deviennent de plus en plus électronégatives. Au delà d'une densité de charge optimale l'activité de transfert diminue.

III. Inhibiteurs de la CETP.

1. Inhibiteur protéique du transfert lipidique (LTIP).

Une sialoglycoprotéine de 32 kDa (pI : 3,9-4,3), capable d'inhiber les activités de transfert des esters de cholestérol et des triglycérides, a été isolée à partir de plasma humain dépourvu de lipoprotéines (SON et ZILVERSMIT 1984). Cet inhibiteur supprime de manière similaire le transfert de triglycérides et d'esters de cholestérol. Par ailleurs, le pourcentage de réduction du transfert des lipides entre les lipoprotéines est indépendant de la concentration en protéine de transfert mais est diminué pour des concentrations augmentées en lipoprotéines. Bien que le mécanisme d'inhibition ne soit pas clairement élucidé, il semblerait que cet inhibiteur, en se liant aux lipoprotéines, empêche la liaison de la CETP avec ces particules lorsqu'il est ajouté précocément au milieu d'incubation. Il pourrait également rompre le complexe CETP-lipoprotéines lorsque qu'il est ajouté après la formation de ce dernier (MORTON 1985). Des études comparatives portant sur l'effet de cet inhibiteur sur l'activité de transfert ont démontré que l'inhibition était plus importante pour des transferts entre VLDL et LDL que pour ceux s'effectuant entre HDL et VLDL (MORTON et STEINBRUNNER 1993). Ces observations, et le fait que l'ampleur de l'inhibition soit dépendante de la concentration

en lipoprotéines présentes dans le milieu d'incubation (MORTON 1981, SON et ZILVERSMIT 1984), ont conduit à la conclusion que le LTIP agirait par compétition avec la protéine de transfert à la surface des lipoprotéines. Cet inhibiteur est associé, dans le plasma humain, avec les HDL (NISHIDE *et al.* 1989) ou les LDL (MORTON et GREENE 1994). Chez des espèces telles que l'homme, le rat ou le cochon, l'élimination de cet inhibiteur par passage de sérum sur une colonne anti-LTIP augmente l'activité de transfert de 17 à 200 % (NISHIDE *et al.* 1989). Par ailleurs, l'activité endogène de transfert des lipides d'une fraction plasmatique dépourvue de lipoprotéine peut être très fortement augmentée lorsque cette fraction est préincubée à des températures élevées (56°C / 30 mn) (MORTON et STEINBRUNNER 1993), ce qui suggére l'existence d'un inhibiteur protéique thermolabile dans cette fraction.

Chez le babouin une protéine de 4 kDa capable d'inhiber la CETP, et dont la séquence N-terminale est identique aux 38 acides aminés terminaux de l'apoCI, a également été détectée (KUSHWAHA *et al.* 1993). Cet inhibiteur pourrait conduire à l'accumulation de HDL_1 dans le plasma de ces singes (KUSHAWAHA *et al.* 1990). Il semblerait que le fragment de l'apoCI en s'associant avec l'apoAI à la surface des HDL ou avec l'apoE à la surface des VLDL puisse limiter l'association de la CETP avec ces substrats lipoprotéiques (KUSHWAHA *et al.* 1993).

2. Inhibiteurs pharmacologiques de la CETP.

Ces dernières années des inhibiteurs pharmacologiques de la CETP ont été synthétisés (BISGAIER *et al.* 1994, CHAKALAMANNIL *et al.* 1995, EPPS *et al.* 1995, KIM *et al.* 1995, CONNOLLY *et al.* 1996c, PIETZONKA *et al.* 1996, XIA *et al.* 1996, KOTHARI *et al.* 1997) ou bien extraits à partir d'éponges (COVAL *et al.* 1995, SHIN *et al.* 1995), de champignons (KWON *et al.* 1995, BARRETT *et al.* 1996, KIM *et al.* 1996) ou bien encore de racines de ginseng (KWON *et al.* 1996) (tableau 2).

Tableau 2: **Identification (composés, provenance et IC_{50}) d'inhibiteurs pharmacologiques de la CETP.** (Dans ce tableau, "*n.d.*" représente des valeurs d'IC_{50} non déterminées).

Composés chimiques	Provenance	IC_{50}	Référence
subériténone A et B (sesquiterpénoïdes)	éponge de l'antarctique : *Suberites sp.*	10 µmol/ml	SHIN *et al.* 1995.
wiendendiol A et B (sesquiterpene-hydroquinone)	éponge marine : *Xestonspongia wiedenmayeri*	5 - 46 µM	COVAL *et al.* 1995.
KRIBB-BPOO5m (composé tétracyclique contenant une lactone)	champignon : *Trichothecium roseum* F1064	31 µg/ml	KWON *et al.* 1995.
analogues de la rosenonolactone (diterpénoïdes)	champignon : *Trichothecium roseum* F1064	31 - 300 µg/ml	KIM *et al.* 1996.
U-106305 (quinquecyclopropane)	champignon : *Streptomyces sp.* UC 11136	*n.d.*	BARRETT *et al.* 1996.
panaxynol, panaxydol, panaxytriol (polyacéthylène)	racines de : *Panax ginseng*	20 - 35 µg/ml	KWON *et al.* 1996.
4-phenyl-5-tridecyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (PD 140195)	synthèse chimique	*n.d.*	BISGAIER *et al.* 1994.
dérivés du wiedendiol A et B (sesquiterpénoïdes)	synthèse chimique	0 à > 50 µM	CHAKALAMANNIL *et al.* 1995.
15-cétocholestérols	synthèse chimique	*n.d.*	KIM *et al.* 1995.
dérivés de la 1, 3, 5-triazine	synthèse chimique	5 - 45 µM	XIA *et al.* 1996.
analogues d'esters de cholestérol contenant un groupement phosphate	synthèse chimique	2 - 24 µM	PIETZONKA *et al.* 1996.

Ces inhibiteurs sont dans leur grande majorité des composés polycycliques et leur effet inhibiteur a été mesuré, *in vitro*, par des techniques de dosage par SPA (*Scintillation Proximity Assay*). Les résultats obtenus par SPA ont, dans certains cas, été confirmés par des techniques de mesure de transfert d'esters de cholestérol radioactifs (BISGAIER *et al.* 1994, KOTHARI *et al.* 1997) de précipitation (COVAL *et al.* 1995) ou d'immunoprécipitation (PIETZONKA *et al.* 1996). *Ex vivo*, la mesure d'activité de transfert, après injection intraveineuse de PD-140195 chez le lapin (BISGAIER *et al.* 1994) ou après administration orale de CGS 25159 chez le hamster (KOTHARI *et al.* 1997), montre une inhibition transitoire, concentration dépendante, de cette activité. A l'heure actuelle, peu de mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action de ces molécules. BISGAIER *et al.* (1994) ont cependant suggéré que l'inhibition du transfert d'esters de cholestérol par le PD-140195, pourrait être liée à sa capacité à occuper le site de liaison des esters de cholestérol, compte-tenu de leurs structures spatiales similaires. PIETZONKA *et al.* (1996) ont quant à eux émis l'hypothèse que le remplacement, sur une molécule d'ester de cholestérol, de la chaîne d'acides gras ou du noyau stéroïde, pourrait conduire à la formation d'un analogue dont les capacités de liaison à la CETP seraient augmentées grâce à des interactions hydrophobes ou électrostatiques. Les analogues de synthèse ainsi formés pourraient alors se comporter comme des inhibiteurs compétitifs de la CETP. Bien que l'implication de la CETP dans le développement de l'athérosclérose ne soit pas à ce jour parfaitement clair, tous ces composés ont été développés afin d'obtenir des agents thérapeutiques qui par leur rôle d'inhibition de la CETP pourraient jouer un rôle dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

D. Concentration plasmatique et variations physiopathologiques.

I. Variations de la concentration plasmatique en CETP.

1. Concentration plasmatique.

Il existe une grande disparité de l'activité CETP suivant les espèces animales. Ainsi, l'homme, le singe et le lapin ont une activité élevée alors qu'elle est faible chez des espèces telles que le rat, le mouton, la vache, le cochon ou le chien (HA et BARTER 1982). Il existe en fait une relation entre activité CETP et risque athérogène, puisque chez des espèces ayant une activité CETP élevée, les risques athérogènes sont importants alors que chez des espèces ayant une faible activité CETP ces risques athérogènes sont fortement diminués. Il est de ce fait possible que le très haut niveau d'activité chez le lapin ou l'homme et son absence virtuelle chez le rat puissent expliquer les susceptibilités très différentes de ces espèces vis-à-vis de l'athérosclérose.

Dans les populations humaines normolipidémiques, le taux plasmatique de CETP se situe aux environs de 2 μg/ml (1,87 à 4,23 μg/ml) (MARCEL *et al.* 1990, MCPHERSON *et al.* 1991b) et est légèrement plus élevée chez les femmes (MARCEL *et al.* 1990, FUKASAWA *et al.* 1992).

2. Variations d'activité et de concentration.

2.1. Etat postprandial.

L'activité et la concentration plasmatique en CETP peuvent être régulées par divers facteurs endogènes ou exogènes tels que le cholestérol ou la composition en acides gras des régimes alimentaires (QUIG et ZILVSERMIT 1988, QUINET *et al.* 1990, QUIG *et al.* 1991, BAGDADE *et al.* 1992, MARTIN *et al.* 1993, ABBEY et NESTEL 1994, SCHWAB *et al.* 1996, MCPHERSON *et al.* 1997). Bien que les mécanismes de régulation de la concentration plasmatique en CETP ne soient pas encore totalement éclaircis, des

études réalisées chez l'animal permettent de penser que le cholestérol peut modifier l'expression du gène de la CETP (MARTIN *et al.* 1993, OLIVEIRA *et al.* 1996).

2.2. Etats pathologiques.

L'activité CETP a été étudiée dans des situations physiopathologiques associées à un métabolisme anormal des lipoprotéines. Ainsi, dans de nombreuses dyslipidémies associées à une accélération du risque athérogène on note une élévation de la concentration plasmatique en CETP et une augmentation du taux de transfert des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines contenant l'apoB. Parmi ces dyslipidémies on peut citer les dysbétalipoprotéinémies (GROENER *et al.* 1984, TALL *et al.* 1987, MANN *et al.* 1991), l'hypercholestérolémie (SPARKS *et al.* 1989b, SPARKS *et al.* 1991, MCPHERSON *et al.* 1991b, BAGDADE *et al.* 1991a, INAZU *et al.* 1992b), le syndrome néphrotique (MOULIN *et al.* 1992, BRASCHI *et al.* 1996), le diabète sucré insulino-dépendant (DULLAART *et al.* 1989, BAGDADE *et al.* 1991b) ou bien encore les maladies vasculaires périphériques (RUEHLING *et al.* 1989).

Cependant certaines de ces données demeurent contradictoires et quelques travaux ont montré que certaines hyperlipidémies (FIELDING *et al.* 1983) ou insuffisances coronariennes (MIYASHITA *et al.* 1992) étaient associées à de faibles activités de transfert. Les divergences observées seraient liées à des facteurs méthodologiques ou à l'hétérogénéité des populations étudiées.

2.3. Drogues hypocholestérolémiantes.

Des variations d'activité CETP ont également été observées chez des populations traitées par des drogues hypocholestérolémiantes. Toutefois, les résultats obtenus sont loin d'être concordants. Ainsi, les traitements par les fibrates (bezafibrates, gemfibrozil, fénofibrates) ou les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (simvastatine et pravastatine

qui réduisent la concentration plasmatique en cholestérol VLDL+LDL en inhibant la biosynthèse du cholestérol (GRUNDY 1990) peuvent être associés soit à une réduction (MANN *et al.* 1991, BHATNAGAR *et al.* 1992, AHNADI *et al.* 1993a, GUERIN *et al.* 1995, GUERIN *et al.* 1996a) soit à une augmentation de l'activité CETP (BAGDADE *et al.* 1990, KAHRI *et al.* 1993). Cependant d'autres études ont démontré qu'ils n'affectaient pas l'activité de transfert (CHEUNG *et al.* 1993, NISHIWAKI *et al.* 1994). L'administration de probucol, qui empêche la formation de lésions athéroscléreuses, est associée à une augmentation de la concentration et de l'activité CETP (FRANCESCHINI *et al.* 1991, MCPHERSON *et al.* 1991a).

2.4. Exercice physique.

L'exercice physique réduit la concentration plasmatique en CETP chez des sujets sédentaires (SEIP *et al.* 1993) mais également chez des marathoniens qui ont une masse (RITSCH *et al.* 1993) et une activité CETP réduites (SERRAT-SERRAT *et al.* 1993). Ces réductions ne seraient que transitoires et l'on observe un retour à des activités normales une semaine après l'arrêt de l'exercice physique (RITSCH *et al.* 1993).

2.5. Consommation d'alcool.

La consommation d'alcool est également associée à une réduction, dose dépendante (NISHIWAKI *et al.* 1994b) et réversible (HIRANO *et al.* 1992, VÄLIMÄKI *et al.* 1993), de la concentration et de l'activité CETP plasmatique (SAVOLAINEN *et al.* 1990, HANNUKSELA *et al.* 1992a-b, LAGROST *et al.* 1996). L'ingestion d'alcool a par ailleurs une influence variable, sur la concentration plasmatique en HDL et le risque cardiovasculaire, en fonction de certains polymorphismes du gène de la CETP (HANNUKSELA *et al.* 1994, FUMERON *et al.* 1996) démontrant ainsi l'existence

d'interactions gène-environnement. En fait, le profil lipoprotéique des alcooliques chroniques présente des similitudes avec celui des sujets déficients en CETP, c'est à dire des LDL polydispersées de petite taille et des HDL de grande taille enrichies en cholestérol (HIRANO *et al.* 1992). Cependant des résultats discordants, obtenus chez des sujets normolipidémiques ayant une consommation modérée d'alcool, montrent que l'ingestion d'alcool, bien qu'entraînant une augmentation du cholestérol HDL, n'a pas d'effet sur l'activité CETP (ITO *et al.* 1995, RIEMENS *et al.* 1997). Ces données contradictoires pourraient s'expliquer par l'interférence de la consommation d'alcool avec d'autres facteurs tels que la consommation de tabac ou bien encore par des quantités différentes d'alcool ingéré qui, chez de gros buveurs, pourraient entraîner des dysfonctionnements hépatiques ou une modification du comportement alimentaire (ITO *et al.* 1995, RIEMENS *et al.* 1997).

II. Etudes expérimentales chez l'animal.

1. Injection de CETP exogène à des animaux CETP-déficients.

Un certain nombre d'études a été réalisé afin de déterminer, *in vivo*, le rôle de la CETP dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines plasmatiques (HA *et al.* 1985, QUIG et ZILVERSMIT 1986, GAVISH *et al.* 1987, GROENER *et al.* 1989). Le rat, une espèce physiologiquement dépourvue d'activité CETP, présente un taux de cholestérol VLDL et LDL relativement faible. Chez cet animal, les HDL, principal transporteur du cholestérol, ont une faible teneur en triglycérides. L'injection de CETP, partiellement purifiée à partir de plasma humain, entraîne chez le rat des modifications dans la répartition du cholestérol et en particulier une augmentation du contenu en esters de cholestérol dans les VLDL, LDL et IDL (HA *et al.* 1985, QUIG et ZILVERSMIT 1986, GROENER *et al.* 1989). Au niveau des HDL, on note, outre une réduction de taille de ces particules, une diminution de leur contenu en esters de cholestérol et une augmentation de leur teneur en triglycérides (HA *et al.* 1985, GROENER *et al.* 1989). Ces données montrent que lorsque la CETP est injectée *in vivo*, à des espèces physiologiquement

déficientes, elle induit des modifications du profil lipoprotéique qui pourrait ainsi devenir plus athérogène.

2. Anticorps anti-CETP.

Une autre technique, permettant d'étudier l'influence de la CETP *in vivo* consiste à injecter des anticorps anti-CETP à des animaux présentant une activité de transfert des lipides. Chez le lapin, l'injection d'anticorps anti-CETP (ABBEY et CALVERT 1989, WHITLOCK *et al.* 1989) entraîne des modifications du profil lipoprotéique. En effet, outre une augmentation de taille des HDL (ABBEY et CALVERT 1989) on observe un enrichissement des HDL et un appauvrissement des VLDL en esters de cholestérol et des variations en sens inverse en ce qui concerne les triglycérides. De plus, l'injection d'anticorps anti-CETP conduit à une diminution de la captation des esters de cholestérol par le foie ainsi qu'à une réduction du catabolisme des HDL (WHITLOCK *et al.* 1989).

In vivo, l'injection d'anticorps monoclonaux anti-CETP permet donc de modifier la composition en lipides neutres des lipoprotéines et d'évoluer vers un profil moins athérogène.

3. Souris transgéniques.

Depuis quelques années des modèles d'animaux transgéniques, à l'origine CETP déficients, ont été développés afin de mieux appréhender, *in vivo*, l'influence de la CETP sur le métabolisme lipoprotéique et son rôle vis-à-vis de l'athérosclérose.

Chez la souris, l'expression du gène de la CETP entraîne une diminution du cholestérol HDL et de la concentration en apoAI, une réduction de taille des HDL et une augmentation du taux d'apoB ainsi que du cholestérol VLDL et LDL (AGELLON *et al.* 1991, MAROTTI *et al.* 1992, DINCHUK *et al.* 1995, GRASS *et al.* 1995). En outre, il a été observé que l'effet de la CETP sur le taux de cholestérol HDL est plus important chez

des souris transgéniques exprimant à la fois la CETP et l'apoAI humaine (HAYEK *et al.* 1992), ce qui signifie qu'il y aurait, dans ces conditions, une augmentation de l'interaction de la CETP avec l'apoAI humaine comparativement à l'apoAI de souris. Certaines lignées de souris transgéniques ont permis de mettre en évidence l'existence d'une corrélation inverse entre la concentration en CETP plasmatique et l'abondance d'ARNm de récepteur hépatique aux LDL. Cette diminution de l'expression d'ARNm de récepteurs hépatiques aux LDL permettrait d'expliquer les augmentations de VLDL-CE et LDL-CE observées (JIANG *et al.* 1993). Par ailleurs, la présence de CETP, chez des souris transgéniques hypertriglycéridémiques exprimant l'apoCIII humaine, diminue la taille et le contenu en esters de cholestérol des HDL et augmente le taux de catabolisme des esters de cholestérol et de l'apoAI de ces particules (HAYEK *et al.* 1993). L'expression de la CETP chez des animaux transgéniques induirait une augmentation du rapport d'athérogénicité (VLDL+LDL) / HDL. Cette évolution du profil lipoprotéique vers un profil de type "humain", expliquerait l'accélération du développement des lésions athéroscléreuses précoces au niveau de l'aorte proximale observées chez des souris transgéniques exprimant une CETP de singe cynomolgus (MAROTTI *et al.* 1993).

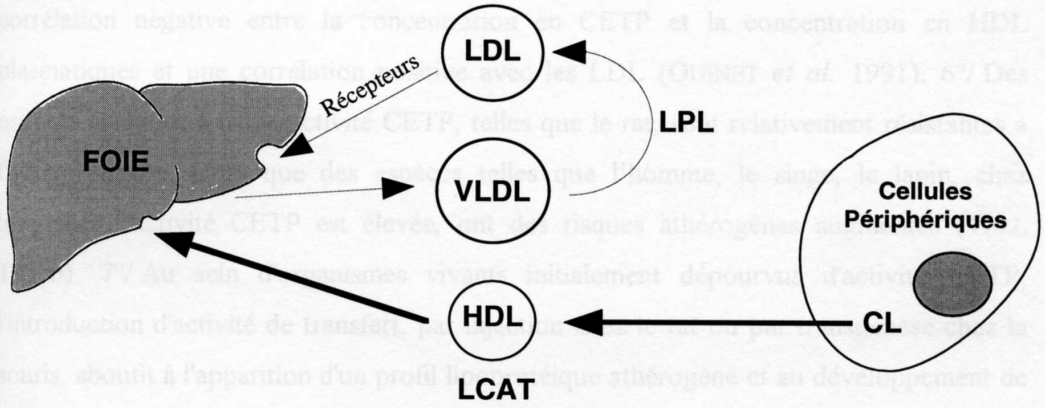
Cependant, les données de la littérature demeurent contradictoires quant à l'influence de l'expression de la CETP chez des animaux transgéniques et à son implication dans le développement de l'athérosclérose. En effet, HAYEK *et al.* (1995) ont récemment montré que l'expression de la CETP inhibe le développement des lésions athéroscléreuses précoces de l'aorte proximale chez des souris hypertriglycéridémiques. Il semblerait que dans ce modèle expérimental la présence d'un transgène apoCIII, induisant une hypertriglycéridémie, puisse expliquer les divergences de résultats entre ces deux études (HAYEK *et al.* 1995). Ces données obtenues chez l'animal semblent être confirmées par celles de ZHONG *et al.* (1996) qui ont mis en évidence, *in vivo*, une augmentation du risque cardiovasculaire chez des sujets déficients en CETP.

E. Conclusion générale : CETP et athérosclérose.

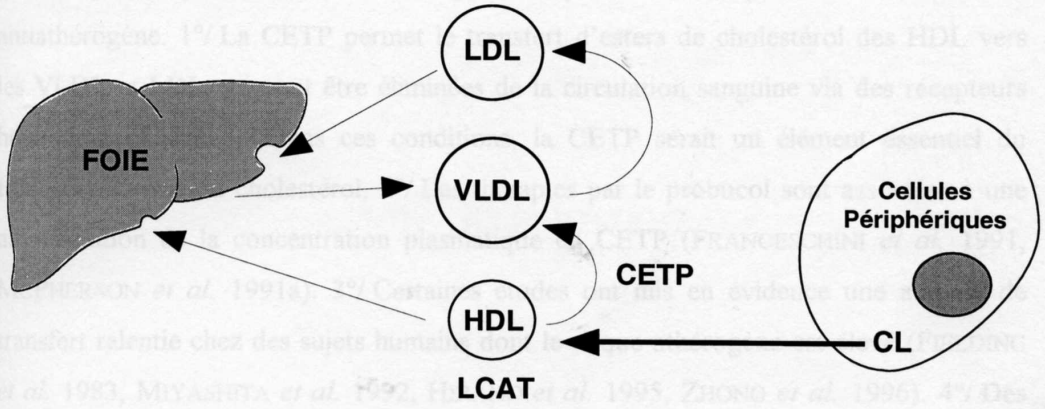
Durant ces dernières années, de nombreuses études se sont attaché à mettre en évidence le rôle de la CETP *in vitro* et *in vivo* dans le métabolisme des lipoprotéines et le transport des lipides neutres (TALL 1993, LAGROST 1994a, TALL 1995). Cependant, l'influence de la CETP sur le risque athérogène ne semble plus aussi claire que par le passé (BRUCE et TALL 1995b, TALL 1995, FIELDING et HAVEL 1996).

De nombreux arguments expérimentaux ont été apportés en faveur d'un rôle pro-athérogène de la CETP. 1°/ La CETP court-circuite le transport inverse du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie, en transférant des esters de cholestérol des HDL, particules anti-athérogènes, vers des lipoprotéines pro-athérogènes contenant l'apoB (figure 6). Cette voie métabolique pourrait être prédominante dans des circonstances où la captation, par le foie, des lipoprotéines contenant l'apoB serait réduite. 2°/ Les modifications du profil lipoprotéique, induites par une déficience en CETP chez des sujets homozygotes, sont associées à une résistance accrue vis-à-vis de l'athérosclérose (BROWN *et al.* 1989, GOTODA *et al.* 1993, TAKAHASHI *et al.* 1993, FUNKE *et al.* 1994, ARAI *et al.* 1996, SAKAI *et al.* 1996, TAMMINEN *et al.* 1996). 3°/ Chez l'homme, de nombreuses dyslipidémies (dysbétalipoprotéinémies, diabète sucré insulino-dépendant, hypercholestérolémie, maladies vasculaires périphériques, syndromes néphrotiques), associées à un risque athérogène augmenté, sont caractérisées par des concentrations plasmatiques en CETP accrues et / ou une augmentation du taux de transfert des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines contenant l'apoB (GROENER *et al.* 1984, TALL *et al.* 1987, DULLAART *et al.* 1989, RUEHLING *et al.* 1989, SPARKS *et al.* 1989, BAGDADE *et al.* 1991a-b, MANN *et al.* 1991, MCPHERSON *et al.* 1991b, SPARKS *et al.* 1991, INAZU *et al.* 1992b, MOULIN *et al.* 1992, BRASCHI *et al.* 1996). 4°/ L'alcoolisme, associé à une augmentation du cholestérol HDL et une diminution du risque athérogène, engendre une diminution de la concentration plasmatique en CETP (SAVOLAINEN *et al.* 1990, HANNUKSELA *et al.* 1992a-b, LAGROST *et al.* 1996). L'exercice physique est également associé à des taux augmentés en HDL et diminués en LDL et en CETP plasmatique (SEIP *et al.* 1993, RITSCH *et al.* 1993, SERRAT-SERRAT *et al.* 1993). 5°/ Des animaux nourris avec des régimes riches en graisses et en cholestérol montrent une

Déficience en CETP



Activité CETP normale



Activité CETP augmentée

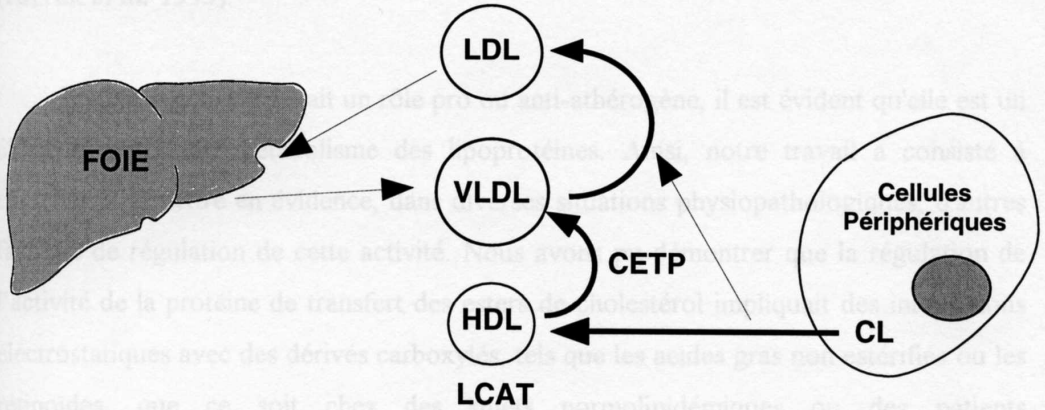


Figure 6: **Transport inverse du cholestérol dans trois états métaboliques différents.**
(d'après: Tall (1993) *J. Lipid. Res.* **34**, 1255-1274)

corrélation négative entre la concentration en CETP et la concentration en HDL plasmatiques et une corrélation positive avec les LDL (QUINET *et al.* 1991). 6°/ Des espèces animales à faible activité CETP, telles que le rat, sont relativement résistantes à l'athérosclérose, alors que des espèces telles que l'homme, le singe, le lapin, chez lesquelles l'activité CETP est élevée, ont des risques athérogènes augmentés (TALL 1986b). 7°/ Au sein d'organismes vivants initialement dépourvus d'activité CETP, l'introduction d'activité de transfert, par injection chez le rat ou par transgénèse chez la souris, aboutit à l'apparition d'un profil lipoprotéique athérogène et au développement de lésions athéromateuses (HA *et al.* 1985, QUIG *et al.* 1986, GAVISH *et al.* 1987, GROENER *et al.* 1989, AGELLON *et al.* 1991, MAROTTI *et al.* 1992, GRASS *et al.* 1995).

Cependant, d'autres données suggèrent que la CETP pourrait avoir un rôle antiathérogène. 1°/ La CETP permet le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et LDL qui vont être éliminées de la circulation sanguine via des récepteurs hépatiques (figure 6). Dans ces conditions, la CETP serait un élément essentiel du transport inverse du cholestérol. 2°/ Les thérapies par le probucol sont associées à une augmentation de la concentration plasmatique en CETP (FRANCESCHINI *et al.* 1991, MCPHERSON *et al.* 1991a). 3°/ Certaines études ont mis en évidence une activité de transfert ralentie chez des sujets humains dont le risque athérogène est élevé (FIELDING *et al.* 1983, MIYASHITA *et al.* 1992, HIRANO *et al.* 1995, ZHONG *et al.* 1996). 4°/ Des souris transgéniques hypertriglycéridémiques exprimant à la fois l'apoCIII et la CETP présentent une inhibition du développement des lésions athéroscléreuses précoces (HAYEK *et al.* 1995).

En fait, que la CETP ait un rôle pro ou anti-athérogène, il est évident qu'elle est un élément central du métabolisme des lipoprotéines. Ainsi, notre travail a consisté à chercher et à mettre en évidence, dans diverses situations physiopathologiques, d'autres facteurs de régulation de cette activité. Nous avons pu démontrer que la régulation de l'activité de la protéine de transfert des esters de cholestérol impliquait des interactions électrostatiques avec des dérivés carboxylés, tels que les acides gras non estérifiés ou les rétinoïdes, que ce soit chez des sujets normolipidémiques ou des patients analbuminémiques ou présentant un syndrome néphrotique.

ETUDE EXPERIMENTALE

PREMIERE PARTIE

INFLUENCE DES ACIDES GRAS NON ESTERIFIES PLASMATIQUES SUR L'ACTIVITE CETP DANS DIVERSES CONDITIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

(Sujets Normolipidémiques, Analbuminémiques, Syndromes Néphrotiques)

cf. Annexe 1:

Evidence for nonesterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma.

LAGROST, L., FLORENTIN, E., GUYARD-DANGREMONT, V., ATHIAS, A., GANGJINI, H., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **15**, 1388-1396 (1995)

cf. Annexe 2:

Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from analbuminemic patients.

BRASCHI, S., LAGROST, L., FLORENTIN, E., MARTIN, C., ATHIAS, A., GAMBERT, P., KREMPF, M., LALLEMANT, C. & JACOTOT, B.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **16**, 441-449 (1996)

cf. Annexe 3:

Role of lipoprotein-bound nonesterified fatty acids in enhancing the specific activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome.

BRASCHI, S., MASSON, D., ROSTOKER, G., FLORENTIN, E., ATHIAS, A., MARTIN, C., JACOTOT, B., GAMBERT, P., LALLEMANT, C. & LAGROST, L.,

(*soumis pour publication*)

I. INTRODUCTION.

Une des thématiques du laboratoire portait sur l'étude de l'influence des acides gras non estérifiés sur l'activité de la protéine humaine de transfert des esters de cholestérol. En fait, de nombreuses études avaient mis en évidence, qu'*in vitro* les acides gras, localisés sur la couche externe des lipoprotéines, étaient susceptibles de moduler l'activité de la CETP (SAMMETT et TALL 1985, BARTER *et al.* 1990c). L'effet activateur ou inhibiteur des acides gras non estérifiés est dépendant d'un certain nombre de paramètres dont leur ionisation, leur concentration finale, leur degré d'insaturation, la configuration *cis* ou *trans* de leur double liaison ou leur capacité à modifier la fluidité des lipoprotéines (SAMMETT et TALL 1985, LAGROST et BARTER 1991b, LAGROST 1992a, NISHIDA *et al.* 1993, FOUCHER *et al.* 1996).

Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'influence des acides gras non estérifiés sur l'activité de transfert *in vivo*. Dans cette perspective, j'ai été amené à m'impliquer dans diverses études portant sur l'effet des acides gras non estérifiés, non plus *in vitro*, mais dans différentes conditions physio-pathologiques, que ce soit chez des sujets normolipidémiques, chez des patients analbuminémiques ou bien encore chez des patients présentant un syndrome néphrotique. Nous nous sommes dans un premier temps demandés si dans des conditions physiologiques normales la faible proportion d'acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines (SHAFRIR 1958) pouvait avoir une influence sur l'activité de transfert. Nous avons pu démontrer qu'il existait une corrélation significative entre l'activité CETP et la concentration en acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines chez des sujets normolipidémiques. Afin de confirmer que les acides gras non estérifiés, liés aux lipoprotéines, étaient des modulateurs potentiels de l'activité de transfert il nous fallait trouver des situations pathologiques dans lesquelles la distribution des acides gras était modifiée - déplacée de l'albumine vers les lipoprotéines - puis montrer que dans ces conditions ces composés augmentaient l'activité de transfert. Nous nous sommes donc, dans la suite de notre étude, intéressés à l'analbuminémie qui est une maladie génétique rare caractérisée par une concentration plasmatique en albumine anormalement faible et une hypercholestérolémie (SHETLAR *et al.* 1959, BARTTER *et al.* 1961, MONTGOMERY *et al.* 1962, WALDMANN *et al.* 1964,

CORMODE *et al.* 1975, BOMAN *et al.* 1976, WEINSTOCK *et al.* 1979, DAMMACO *et al.* 1980, BALDO *et al.* 1983). A l'heure actuelle seule une vingtaine de patients analbuminémiques ont été recensés de par le monde et nous avons eu la possibilité d'étudier trois d'entre eux. Afin d'augmenter la significativité de nos résultats, nous avons été amenés à nous intéresser à une population plus importante de sujets présentant un syndrome néphrotique dont les pathologies (hypoalbuminémie et hyperlipidémie) (JOVEN *et al.* 1990, APPEL *et al.* 1985, GHERARDI *et al.* 1977) étaient relativement similaires à celles des analbuminémiques.

Dans ces trois études nous avons clairement pu démontrer d'une part que les acides gras non estérifiés, liés aux lipoprotéines, pouvaient être considérés, *in vivo*, comme des modulateurs potentiels de l'activité CETP et que d'autre part la charge de ces composés était un facteur important du mécanisme de régulation de l'activité de transfert.

II. SUJETS & METHODES.

1. Sujets normolipidémiques.

Les sujets étudiés étaient tous des volontaires sains, ne fumant pas et présentant un profil lipoprotéique normolipidémique, soumis à aucune médication autre que des contraceptifs oraux. Leur sang est prélevé, après une nuit de jeûne, dans des tubes contenant de l'EDTA-Na_2. Les plasmas sont séparés rapidement par une centrifugation de 15 mn à 3 000 rpm dans une centrifugeuse Jouan régulée à 4°C, puis maintenus à cette température. Les analyses sont effectuées dans les heures suivant le prélèvement.

2. Sujets analbuminémiques.

ZA était une femme de 32 ans, présentant une hyperlipidémie (CT: 3,88 g/l; HDL-C: 0,57 g/l; TG: 1,65 g/l) combinée à une hypoalbuminémie (18 g/l) sans protéinurie. L'étude généalogique de la famille a révélé des unions consanguines des parents. Ni les régimes à faible teneur en graisse, ni les hypolipémiants n'ont eu d'effet sur la dyslipidémie.

BR et RR, deux soeurs de respectivement 25 et 32 ans présentaient également une dyslipidémie sévère (BR [CT: 3,85 g/l; HDL-C: 0,34; TG: 1,28 g/l]; RR [CT: 5,02 g/l; HDL-C: 0,43; TG: 1,39 g/l]) associée à une hypoalbuminémie congénitale (BR: 23 g/l; RR: 21 g/l).

Le groupe de sujets témoins était composé de cinq jeunes femmes normolipidémiques de 38,6 ± 6,9 ans (CT: 1,42-2,15 g/l; TG: 0,39-0,85 g/l; albumine: 44-46 g/l), soumises à aucune médication autre que des contraceptifs oraux.

3. Sujets néphrotiques.

L'étude a porté sur 15 patients (6 femmes et 9 hommes) de 44 ± 3 ans présentant un syndrome néphrotique avec en particulier une protéinurie supérieure à 3 g/jour et une hypoalbuminémie (< 35 g/l). Le groupe de sujets témoins normolipidémiques est constitué de 9 personnes (3 femmes et 6 hommes) de 41 ± 3 ans.

4. Préparation des lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont isolées à partir d'un plasma humain total normolipidémique par ultracentrifugation séquentielle (HAVEL *et al.* 1955) à la vitesse de 100 000 rpm (356 000 g) dans une ultracentrifugeuse Beckman TL-100 (rotor TLA-100.2) (Beckman,

Palo Alto, U.S.A.). Les densités sont ajustées par addition de KBr solide. Les LDL sont isolées entre les densités 1,019 et 1,055 g/ml par une ultracentrifugation unique de 3 h à la densité la plus basse et deux ultracentrifugations de 4 h à la densité la plus élevée. Les HDL_3 sont isolées entre les densités 1,13 et 1,21 g/ml par une ultracentrifugation de 7 h à la densité la plus basse et deux ultracentrifugations de 10 h à la densité la plus élevée. Dans certaines expériences, toutes les classes de lipoprotéines (VLDL (d < 1,006 g/ml), IDL (1,006 < d < 1,019 g/ml), LDL (1,019 < d < 1,063 g/ml), HDL_2 (1,063 < d < 1,125 g/ml) et HDL_3 (1,125 < d < 1,210 g/ml)) sont isolées par une série d'ultracentrifugations séquentielles. Les fractions HDL_2 et HDL_3 sont lavées par une seconde ultracentrifugation dans des solutions de KBr à respectivement d = 1,125 g/ml et d = 1,210 g/ml afin d'éviter toute contamination par l'albumine.

Les lipoprotéines ainsi isolées sont dialysées une nuit à 4°C contre un tampon PBS (NaCl: 150 mmol/l; Na_2HPO_4: 10 mmol/l; NaH_2PO_4: 5 mmol/l; EDTA-Na_2: 5 mmol/l; NaN_3: 3 mmol/) pH 7,4.

5. Purification de la CETP.

La CETP est purifiée à partir de 2500 ml de plasma normolipidémique en utilisant une série de procédures décrites précédemment par LAGROST *et al*. (1994b-c) (figure 7).

5.1 Précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium.

Le plasma est soumis à une précipitation sélective par le sulfate d'ammonium afin d'éliminer une partie des protéines puis il est amené à une concentration finale de 35% de saturation en sulfate d'ammonium (197 g de sulfate d'ammonium ajoutéspar litre de plasma) et placé sous agitation à 4°C pendant 2 h. Après une centrifugation à 10 000 g

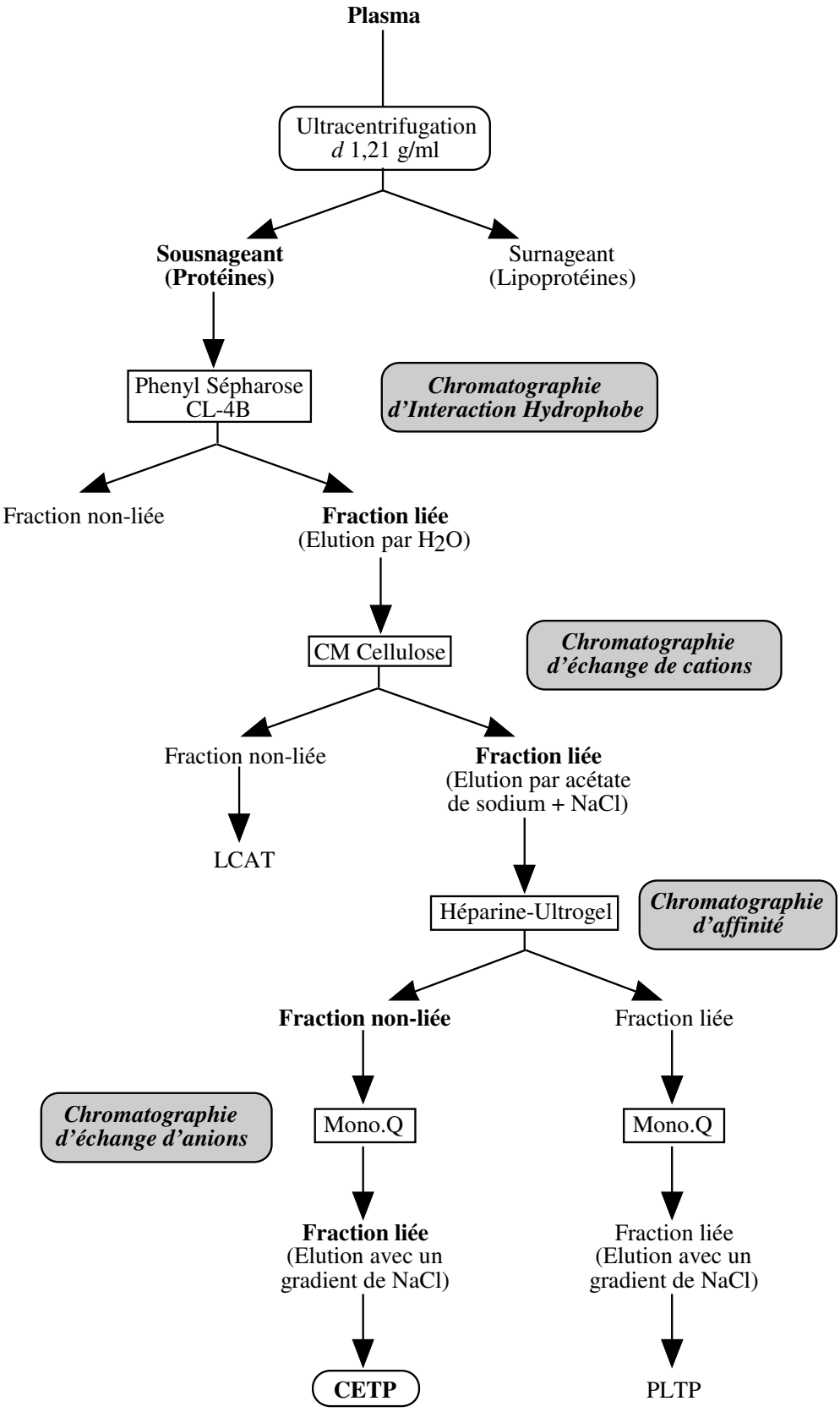


Figure 7**: Schéma des étapes de purification de la CETP.**

pendant 30 mn, le précipité protéique est éliminé et le surnageant est amené à une concentration finale de 55% de saturation en sulfate d'ammonium (120 g de sulfate d'ammonium par litre de surnageant). Après 12 h d'agitation à 4°C, la solution plasmatique est centrifugée à 10 000 g pendant 45 mn. Le précipité protéique obtenu est dissous dans l'eau distillée puis la solution est dialysée une nuit à 4°C contre de l'eau distillée.

5.2. Ultracentrifugation.

Cette étape permet de séparer la CETP et les lipoprotéines avec lesquelles la CETP est associée au niveau plasmatique. La solution protéique obtenue après dialyse est ajustée à une densité de 1,25 g/ml avec du KBr solide. Une ultracentrifugation de 24 h à 250 000 g (55 000 rpm) dans un rotor 70 (Beckman, Palo Alto, USA) permet de séparer d'une part les lipoprotéines et d'autre part la CETP qui est récupérée dans la fraction de $d > 1{,}25$ g/ml.

Les étapes de purification ultérieures sont conduites en utilisant un système chromatographique FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia). Toutes les solutions employées en chromatographie sont dégazées et filtrées (filtre 0,22 µm, Millipore). Les colonnes chromatographiques sont reliées à une cellule optique. L'enregistrement de l'absorbance à 280 nm permet ainsi de suivre le déroulement de la chromatographie.

5.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe.

Cette étape utilise les propriétés hydrophobes de la CETP. Une colonne de PhénylSépharose CL-4B (1 m x 2,5 cm) (Pharmacia, Uppsala, Suède) est préalablement équilibrée avec un tampon Tris-HCl 10 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, NaN_3 3 mmol/l, pH 7,4. La fraction de $d > 1{,}25$ g/ml est ensuite injectée sur cette colonne maintenue à 4°C. Les protéines non adsorbées sont éluées par une solution de

Tris 10 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, NaN_3 3 mmol/l, pH 7,4. Les protéines adsorbées sur la phase (protéines hydrophobes, CETP) sont éluées avec de l'eau distillée (PATTNAIK *et al.* 1978, IHM *et al.* 1980).

5.4. Chromatographie d'échange de cations.

La fraction protéique contenant la CETP est ajustée à pH 4,5 et amenée à une concentration finale d'acétate de sodium de 50 mmol/l, par ajout d'un tampon acétate de sodium de 500 mmol/l, pH 4,5. Après avoir éliminé le précipité protéique par centrifugation (10 mn, 5 000 rpm), la fraction est soumise à une chromatographie à 4°C sur colonne de CM-cellulose (70 x 1,6 cm) (Whatman, Kent, Angleterre) préalablement équilibrée avec un tampon acétate de sodium 50 mmol/l, pH 4,5. La colonne est lavée par le tampon acétate de sodium 50 mmol/l puis les protéines adsorbées sont éluées avec un tampon acétate de sodium 50 mmol/l, pH 4,5, contenant 90 mmol/l de NaCl. Cette dernière fraction, après avoir été ajustée à pH 7,4 par ajout de Tris 2,7 M (300 µl / 10 ml de fraction), est immédiatement dialysée contre un tampon Tris-HCl 20 mmol/l, pH 7,4 contenant 1 mmol/l d'EDTA et 3 mmol/l de NaN_3. Cette étape permet de séparer la CETP qui est éluée par la solution saline, de la LCAT, qui n'est pas retenue sur la colonne dans ces conditions (PATTNAIK *et al.* 1978).

5.5. Chromatographie d'affinité.

La fraction CM-Cellulose dialysée est injectée sur une colonne d'Héparine-Ultrogel A4R (40 x 1,6 cm) (Sépracor, Villeneuve La Garenne, France), préalablement équilibrée par un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4.

Dans ces conditions, l'activité CETP n'est pas retenue sur la colonne. Les protéines adsorbées (PLTP) sont éluées par une solution de Tris 20 mM contenant 500 mM de NaCl.

5.6. Chromatographie d'échange d'anions.

La fraction protéique contenant la CETP est injectée sur une colonne MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mmol/l, pH 7,4, EDTA 1 mmol/l, NaN_3 3 mmol/l, à température ambiante. L'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl (0 à 500 mmol/l) dans ce même tampon. La CETP est éluée à une concentration en NaCl d'environ 150 mmol/l. On dose immédiatement la capacité des fractions à transférer des esters de cholestérol radioactifs des LDL vers les HDL. Les fractions qui possèdent une activité de transfert élevée sont mélangées, puis congelées en aliquotes à -80°C.

6. Marquage radioactif des LDL et HDL_3.

Des HDL_3 sont radiomarquées d'après la technique décrite précédemment (TOLLEFSON *et al.* 1988, LAGROST *et al.* 1994c).

Un volume de 20 ml de plasma humain normolipidémique est ajusté à la densité de 1,13 g/ml, par ajout de KBr solide, puis soumis à une ultracentrifugation de 7 h à la vitesse de 100 000 rpm (356 000 g) dans une ultracentrifugeuse Beckman TL-100 (rotor TLA-100.2). La fraction de $d > 1,13$ g/ml est ensuite dialysée une nuit à 4°C contre un tampon PBS, pH 7,4.

Un volume de 500 µl de cholestérol tritié ([1α, 2α (n)-^{3}H]-cholestérol, activité spécifique: 46 Ci/mmol, Amersham, Les Ulis, France) est amené à sec sous un courant d'azote. Le résidu est repris par 50 µl d'éthanol absolu puis ajouté à la fraction dialysée de $d > 1,13$ g/ml. Le mélange est mis à incuber, sous agitation, à 37°C pendant 24 h. Cette incubation va permettre l'incorporation du cholestérol libre, dans les HDL_3, puis son estérification grâce à l'action de la lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT).

Par la suite, des LDL froides, isolées à partir de 10 ml de plasma humain entre les densités 1,019 et 1,055 g/ml, sont ajoutées au milieu d'incubation durant 6 h afin de permettre le transfert d'esters de cholestérol radioactifs des HDL_3 vers les LDL

(LAGROST *et al.* 1994c). A l'issue de l'incubation, les [^{3}H]CE-HDL$_3$ et [^{3}H]CE-LDL sont réisolées par ultracentrifugation séquentielle, comme décrit précédemment, puis dialysées une nuit à 4°C contre un tampon PBS, pH 7,4.

7. Estimation du rapport [^{3}H]CE / [^{3}H]CL au sein des particules.

Il est nécessaire de connaître le rapport [^{3}H]CE / [^{3}H]CL au sein des particules, après estérification par la LCAT, afin de vérifier que tout le cholestérol tritié a bien été estérifié. On est ainsi amené à extraire les lipides des fractions lipoprotéiques puis à les fractionner par chromatographie sur couche mince.

7.1. Extraction des lipides.

Pour ce faire, un volume de 25 µl de ^{3}H-HDL$_3$ est mélangé à 350 µl de PBS. Un volume de 2,5 ml de solution d'extraction (Isopropanol / n-heptane / H_2SO_4 1N : 80 / 20 / 2) est ajouté à la solution obtenue. L'ensemble est homogénéisé et laissé à température ambiante pendant 20 mn. Un volume de 1 ml de n-heptane et 1 ml d'eau distillée sont ensuite ajoutés au mélange. La solution est homogénéisée et laissée à température ambiante pendant 15 mn. La phase supérieure (heptane) est ensuite prélevée puis asséchée sous azote. Le culot est ensuite repris par 150 µl de chloroforme.

7.2. Chromatographie sur couche mince.

Un volume de 60 µl du mélange lipides / chloroforme est déposé sur une plaque de chromatographie sur couche mince (Gel de silice 60 F_{254} - épaisseur de la couche 250 µm - Merck). Une solution éthanolique de cholestérol non estérifié à 2 g/l et une solution d'oléate de cholestérol à 2 g/l (oléate de cholestérol solide, Sigma, pureté 99%,

repris par 150 µl de chloroforme) sont déposés pour permettre de repérer les taches de [^{3}H]CL et [^{3}H]CE après migration. Celle-ci s'effectue jusqu'à ce que le front du solvant (Hexane / diéthyl ether / méthanol / acide acétique; 45 / 20 /1,5 / 1), se trouve à environ 2 cm du haut de la plaque. Cette dernière est ensuite séchée à l'étuve, puis les taches sont révélés par des vapeurs d'iode préalablement chauffé.

7.3. Comptage radioactif.

Les taches de [^{3}H]CL et [^{3}H]CE sont ensuite grattés et placés en pots de comptage avec 10 ml de liquide de scintillation (OptiPhase "HiSafe" 3, LKB Scintillation Products, FSA Laboratories Supplies, Loughbourough, Leics, Angleterre). La radioactivité est mesurée sur un compteur à scintillation liquide Wallac 1410 (Pharmacia) pendant 5 mn.

Les résultats montrent que les [^{3}H]HDL_3 ont plus de 95% de leur cholestérol sous forme estérifiée.

8. Mesure de l'activité CETP plasmatique.

L'activité CETP d'un échantillon est évaluée en mesurant sa capacité à transférer des esters de cholestérol radioactifs d'un substrat lipoprotéique donneur vers un substrat lipoprotéique accepteur (TOLLEFSON *et al.* 1988, LAGROST *et al.* 1994c). Dans le plasma, l'activité CETP est évaluée en mesurant le taux d'esters de cholestérol radioactifs transférés soit à partir de HDL_3 vers des lipoprotéines à apoB endogènes ($CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$) soit à partir de LDL vers des HDL endogènes ($CET_{LDL \rightarrow HDL}$). Pour ce faire, une dose traceuse (2,5 nmol de cholestérol) soit de [^{3}H]CE-HDL_3 soit de [^{3}H]CE-LDL est ajoutée à 25 µl de plasma humain dans un volume final de 50 µl. L'activité de la LCAT plasmatique est bloquée par ajout d'acide iodoacétique à une concentration finale de 1,5 mmol/l. Dans certaines expériences, de l'albumine

dépourvue d'acides gras (Sigma) est ajoutée au milieu d'incubation. Les dosages sont effectués en double et incubés à l'étuve pendant 3 h à 37°C.

A l'issue de l'incubation, les tubes sont immédiatement centrifugés pendant 1 mn sur centrifugeuse Eppendorf, afin de recueillir l'eau de condensation, puis placés sur la glace. Une aliquote de 45 µl des mélanges réactionnels est ensuite ajoutée à 2 ml d'une solution de KBr de densité $d = 1{,}07$ g/ml dans des tubes d'ultracentrifugation Beckman Quickseal. Les tubes sont ensuite thermoscellés, puis soumis à ultracentrifugation durant 16 h à la vitesse de 40 000 rpm (172 000 g) dans un rotor 50.4 Ti d'ultracentrifugeuse L7-65B Beckman.

Les fractions de densité $d < 1{,}068$ g/ml (fraction plasmatique contenant les lipoprotéines à apoB) et $d > 1{,}068$ g/ml (fraction plasmatique contenant les HDL) sont ensuite recueillies dans un volume de 1 ml environ, après découpe des tubes d'ultracentrifugation, et transférés dans des tubes de comptage. Un volume de 2 ml de liquide de scintillation (OptiPhase "HiSafe" 3, LKB Scintillation Products, FSA Laboratories Supplies, Loughbourough, Leics, Angleterre) est ajouté à chaque tube et la radioactivité est mesurée pendant 5 mn par un compteur à scintillation liquide Wallac 1410.

Le taux de récupération de la radioactivité dans les fractions de $d < 1{,}068$ g/ml et $d > 1{,}068$ g/ml par rapport à la radioactivité initiale est constamment supérieur à 95%. Dans les témoins non incubés contenant des HDL_3, la radioactivité retrouvée dans la fraction de $d < 1{,}068$ g/ml n'excède jamais 4% du total. Dans les témoins non incubés contenant des LDL, la radioactivité retrouvée dans la fraction de $d > 1{,}068$ g/ml n'excède jamais 10% du total.

L'activité CETP est exprimée en pourcentage de la radioactivité totale transférée d'un traceur lipoprotéique donneur vers les fractions de $d < 1{,}068$ g/ml ou de $d > 1{,}068$ g/ml durant 3h d'incubation à 37°C après déduction de la valeur de blanc des témoins maintenus à 4°C (LAGROST *et al.* 1993). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'esters de cholestérol radioactifs transférés.

9. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives.

Dans l'étude portant sur les sujets analbuminémiques, la taille des particules LDL, isolées comme décrit précédemment (LAGROST *et al.* 1993), est déterminée, en conditions non dénaturantes, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration 15-250 g/l. L'électrophorèse se déroule à 4°C pendant 2 h à 30 V, 12 h à 50 V et 12 h à 150 V dans un tampon de migration composé de 14 mmol/l de Tris, 110 mmol/l de glycine et 1,5 mmol/l de NaN_3 (pH 8,4). Les gels sont fixés et colorés par du Coomassie Brillant Bleu G 250 avant leur analyse sur un densitomètre GS-670 (Bio-Rad). Le diamètre moyen apparent des LDL est calculé par comparaison avec des standards protéiques de calibration de haut poids moléculaire (Pharmacia) et des billes de latex (Duke Scientific).

10. Electrophorèse sur gel d'agarose et détermination de la charge des lipoprotéines.

Dans les études portant sur les sujets analbuminémiques et néphrotiques, les mélanges d'incubation, réalisés comme décrit précédemment, sont analysés sur des gels d'agarose 0,5 % préformés (Paragon Lipo gel, Beckman) en utilisant la technique décrite par SPARKS et PHILLIPS (1992).

Une aliquote de 20 µl des milieux d'incubation est appliquée sur le gel jusqu'à ce qu'elle y pénètre totalement (environ 30 mn). L'électrophorèse a lieu, pendant 45 mn à 100 V, dans un tampon barbital (Acide 5, 5-Diethylbarbiturique: 10 mmol/l; sel sodique de l'acide 5, 5-Diethylbarbiturique: 50 mmol/l) de pH 8,6 et de force ionique 0,05. Le générateur (ECPS 3000/150, Pharmacia) délivre un courant régulé constant. A l'issue de l'électrophorèse, les gels sont fixés dans une solution éthanol / acide acétique / eau distillée (90:15:45) pendant 5 mn puis desséchés pendant 1 h dans une étuve régulée à 80°C. Par la suite, les gels sont colorés pendant 5 mn dans une solution éthanolique de Noir Soudan B à 0,07 % et décolorés dans une solution éthanolique à 45%. Les profils

lipoprotéiques sont obtenus après intégration sur un densitomètre GS-670 Bio-Rad (Laboratoires Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis) en utilisant un programme d'analyse moléculaire Bio-Rad. La charge de surface des LDL et HDL est estimée en utilisant l'équation de SPARKS et PHILLIPS (1992). La mobilité électrophorétique (U) est calculée en divisant la mobilité électrophorétique (distance de migration moyenne (mm) / temps (s)) par le potentiel électrophorétique (voltage (V) / distance d'application du voltage sur le gel (cm)). Afin de supprimer le biais lié au pI des particules, l'équation suivante est utilisée :

$$U_{corrigé} = \frac{U_{agarose} - 0{,}136}{1{,}211}$$

Le potentiel de surface (S) des lipoprotéines est calculé en utilisant l'équation d'Henry (ABRAMSON *et al.* 1942) :

$$S = \frac{U.6.\pi.n}{D}$$

où n est le coefficient de viscosité (0,0089 poise), et D est la constante diélectrique du solvant.

11. Transferts massiques d'esters de cholestérol et de triglycérides.

Le transfert massique d'esters de cholestérol et de triglycérides entre les HDL et les lipoprotéines à apoB est mesuré durant l'incubation de plasma total à 37°C en présence d'inhibiteurs de la LCAT (BAGDADE *et al.* 1991a). Pour ce faire, une aliquote de 100 µl de plasma total est supplémentée en acide iodoacétique (concentration finale : 1,5 mmol/l) et incubée pendant 24 h à 37°C. A l'issue de l'incubation, les lipoprotéines à apoB sont précipitées sélectivement par un mélange d'acide phosphotungstique / $MgCl_2$ (Boehringer / Mannheim) selon les indications du fabriquant. Les concentrations en cholestérol non estérifié, cholestérol total et triglycérides présents dans le surnageant et la masse de cholestérol estérifié et de

triglycérides transférés sont calculées par rapport aux incubations témoins maintenues à 4°C.

12. Dosage massique de CETP par méthode ELISA.

La concentration en CETP dans le plasma humain est mesurée par une technique ELISA sur une station biorobotique Biomek 1000 (Beckman Instruments). Les calibrations sont réalisées par comparaison avec une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'un plasma standard congelé (GUYARD-DANGREMONT *et al.* 1994a). Les concentrations plasmatiques en CETP de chaque échantillon sont calculées à l'aide d'un programme d'analyse de données (Immunofit EIA/RIA Data Analysis Software, Beckman) à partir de la moyenne de quatre dosages. Les coefficients de variation intra et inter série sont de respectivement 4 % et 6 %.

13. Activité spécifique CETP.

Les activité spécifiques sont calculées en effectuant le rapport entre l'activité CETP plasmatique et la masse de CETP plasmatique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale transférée par microgramme de CETP.

14. Précipitation sélective des lipoprotéines plasmatiques.

Les lipoprotéines sont séparées des autres constituants plasmatiques par une technique d'adsorption sélective basée sur la capacité du dioxide de silicium pulvérulent (*Fumed Silicon Dioxide*: FSD) (SERVA Feinbiochemica) à adsorber des particules de

grande taille, telles que les émulsions lipidiques et les lipoprotéines, dans des milieux aqueux (WEINSTEIN 1979, BORENSZTAJN *et al.* 1988, POLETTE *et al.* 1992).

Brièvement, un volume de 100 µl de plasma est mélangé avec 1000 µl de solution de FSD de concentration variant de 0 à 35 mg/ml. Le mélange est agité pendant 30 s, puis laissé à température ambiante pendant 10 mn comme décrit précédemment (POLETTE *et al.* 1992). A l'issue de l'incubation, les mélanges sont centrifugés pendant 10 mn à 1 000 rpm sur une centrifugeuse basse vitesse (Jouan) afin d'éliminer le précipité ainsi formé. Les concentrations en cholestérol, acides gras non estérifiés, apoB, apoAI et albumine sont dosées dans le surnageant et comparées aux incubations témoins, dépourvues de FSD, traitées dans des conditions similaires. Dans la suite des expériences, la FSD est utilisée à une concentration de 2,5 mg/ml.

15. Autres méthodes analytiques.

Toutes les analyses biochimiques sont réalisées sur un analyseur centrifuge Cobas-Fara (Roche). Les concentrations en cholestérol total, cholestérol non estérifié et triglycérides sont dosées par des méthodes enzymatiques en utilisant des réactifs Boehringer. Le cholestérol HDL est dosé après précipitation des lipoportéines à apoB par un mélange d'acide phosphotungstique / $MgCl_2$. Les concentrations en apoB, apoAI, apoAII sont mesurées par immunoturbidimétrie (RIFAI et KING 1986) avec des anticorps anti-apoB, anti-apoAI, anti-apoAII provenant de chez Behring. Les standards apoAI et apoB proviennent de Behringwerke AG et les standards apoAII de chez Immuno AG. La concentration en acides gras non estérifiés est mesurée à l'aide de réactifs enzymatiques Wako Pure Chemical Industries. L'albumine est dosée grâce à un réactif A-Gent Albumin Test de chez Abbott.

III. RESULTATS.

A. Sujets normolipidémiques.

1. Corrélation entre la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés et l'activité CETP.

L'activité CETP a été évaluée en mesurant le transfert d'esters de cholestérol tritiés se produisant entre un traceur lipoprotéique exogène marqué vers des fractions lipoprotéiques endogènes. Parmi une population de 37 sujets normolipidémiques (CT: 1,21-2,40 g/l; TG: 0,27-1,42 g/l; acides gras non estérifiés: 0,07-1,02 mmol/l), le taux d'esters de cholestérol transférés de la fraction HDL_3 vers la fraction $d < 1,068$ g/ml est corrélée positivement avec la concentration en acides gras totaux ($r = 0,46$; $P < 0,005$) (figure 8). Dans certaines expériences, un transfert bidirectionnel d'esters de cholestérol a été mesuré soit à partir d'une dose traceuse de HDL_3 vers les lipoprotéines à apoB ($CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$) soit à partir d'une dose traceuse de LDL vers la fraction HDL plasmatique ($CET_{LDL \rightarrow HDL}$). Les résultats montrent une corrélation positive ($r = 0,46$; $P < 0,05$) entre la concentration en acides gras non estérifiés plasmatiques et la $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ alors qu'aucune corrélation ($r = -0,05$, *n.s.*) n'est observée entre la concentration en acides gras et la $CET_{LDL \rightarrow HDL}$.

2. Distribution des acides gras dans les plasmas humains normolipidémiques.

Afin d'évaluer la proportion relative des acides gras non estérifiés liés à l'albumine et de ceux liés aux lipoprotéines, ces dernières ont été séparées des plasmas en utilisant la FSD comme décrit précédemment. Comme le montre la figure 9, le pourcentage de cholestérol total, apoB et d'apoAI adsorbé croît progressivement lorsque

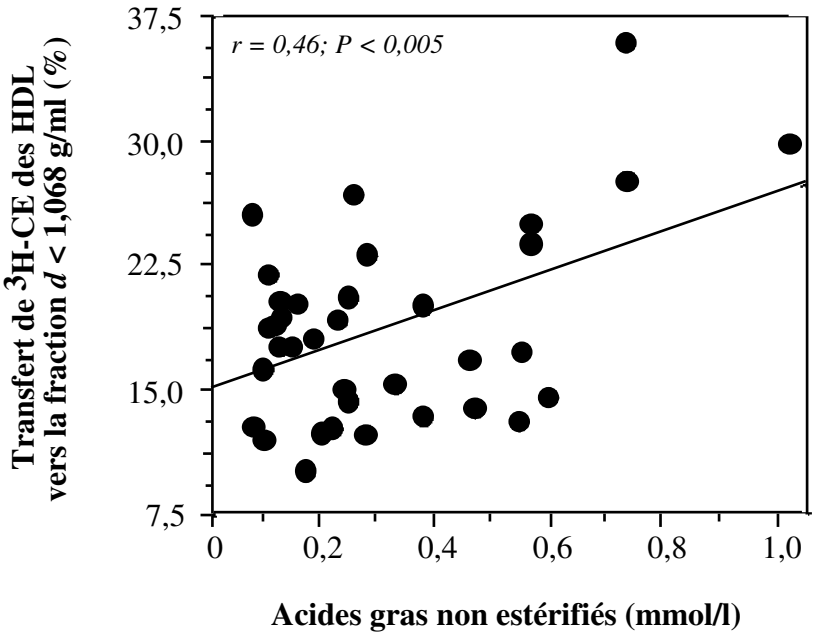


Figure 8 : **Corrélation entre la concentration en acides gras non estérifiés plasmatiques et l'activité CETP.** L'activité CETP est mesurée comme décrit précédemment entre des HDL 3 marquées et la fraction plasmatique *d* < 1,068 g/ml dans 37 plasmas normolipidémiques.

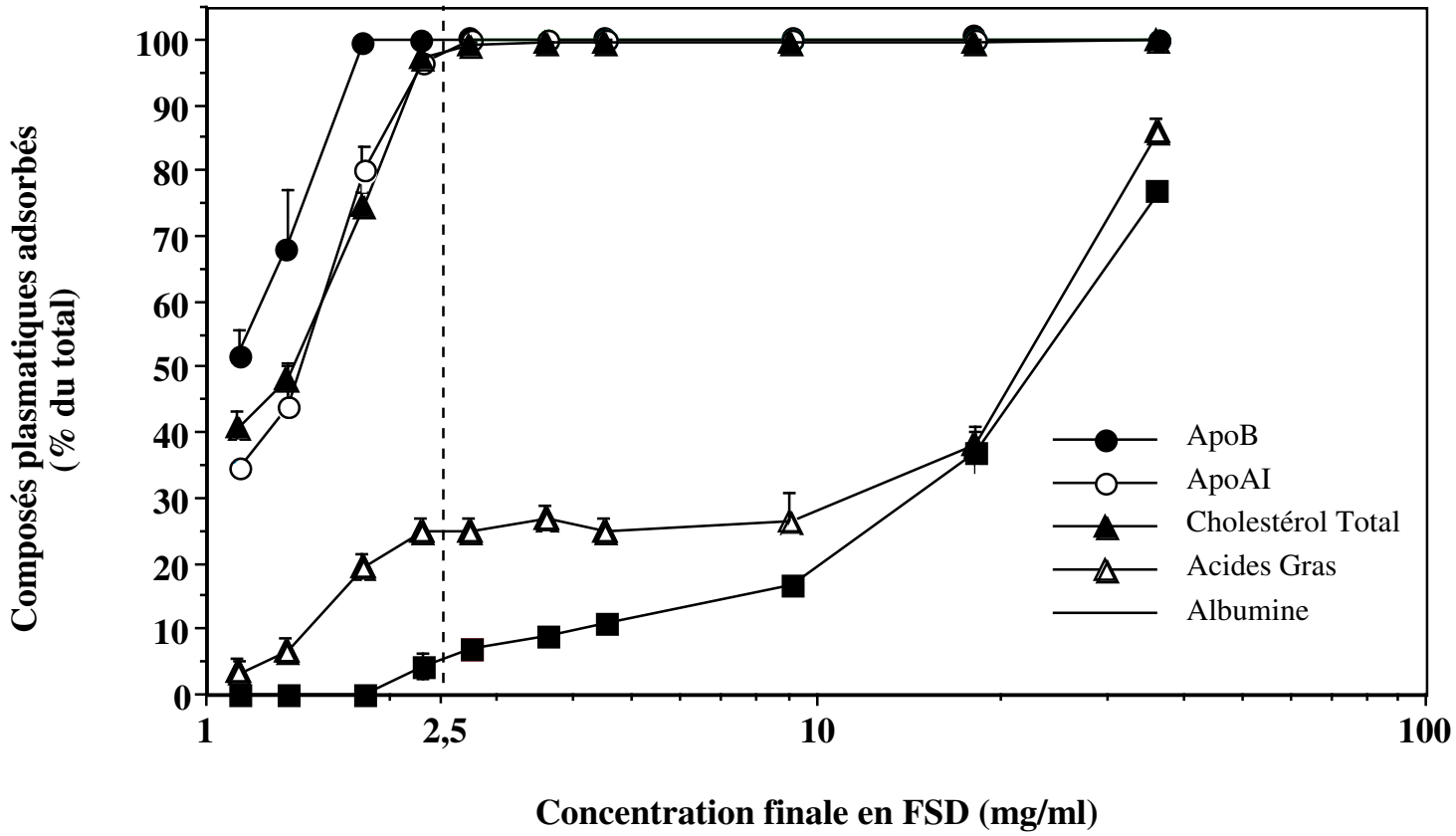


Figure 9: **Influence de la FSD sur l'adsorption de composés plasmatiques**. Des échantillons plasmatiques sont traités par des concentrations croissantes de FSD comme décrit dans "Matériels & Méthodes". Les concentrations plasmatiques en apoB, apoAI, cholestérol total, acides gras non estérifiés et albumine sont dosées avant et après adsorption sur la FSD. Les valeurs en ordonnée, exprimées en pourcentage de la concentration totale, représentent la moyenne ± écart type de trois dosages (total - nonadsorbé).

la concentration finale en FSD présente dans le milieu augmente. La FSD, à une concentration finale de 2,5 mg/ml, permet d'adsorber pratiquement 100% des composés lipoprotéiques (absence d'apoB, d'apoAI et de cholestérol total dans le surnageant) alors que seulement 5% de l'albumine est co-adsorbée. Il est à noter que cette adsorption sélective des lipoprotéines sur la FSD s'accompagne d'une diminution d'environ 25% du taux plasmatique d'acides gras non estérifiés (figure 9).

Le taux d'acides gras non estérifiés de la fraction lipoprotéique a été mesuré dans 14 plasmas dont la concentration en acides gras variait de 0,16 à 1,07 mmol/l. Comme le montre la figure 10, une corrélation positive significative ($r = 0,95$; $P < 0,0001$) est observée entre la concentration plasmatique totale en acides gras non estérifiés et le taux d'acides gras dans les fractions lipoprotéiques. En accord avec des données antérieures (SHAFRIR 1958), l'analyse de régression linéaire indique qu'environ 25% des acides gras non estérifiés plasmatiques sont localisés dans la fraction lipoprotéique et ce quelle que soit leur concentration plasmatique totale.

Des mesures effectuées sur un lot de 10 plasmas (CT: 1,45-2,4 g/l; TG: 0,49-1,42 g/l; acides gras non estérifiés: 0,16-1,02 mmol/l; albumine: 44-57 g/l), ont mis en évidence une corrélation positive entre le taux d'acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines plasmatiques et l'activité $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ ($r = 0,65$; $P < 0,05$) (figure 11).

3. Effets de l'albumine sur l'activité CETP plasmatique.

L'albumine, principal transporteur des acides gras non estérifiés dans le plasma, est susceptible de capter les acides gras à la surface des lipoprotéines lorsqu'elle est ajoutée en excès (SHAFRIR 1958). Dans cette étude, la forte affinité de l'albumine pour les acides gras non estérifiés a été utilisée afin de confirmer que les acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines peuvent être impliqués dans la modulation de la réaction de transfert des esters de cholestérol.

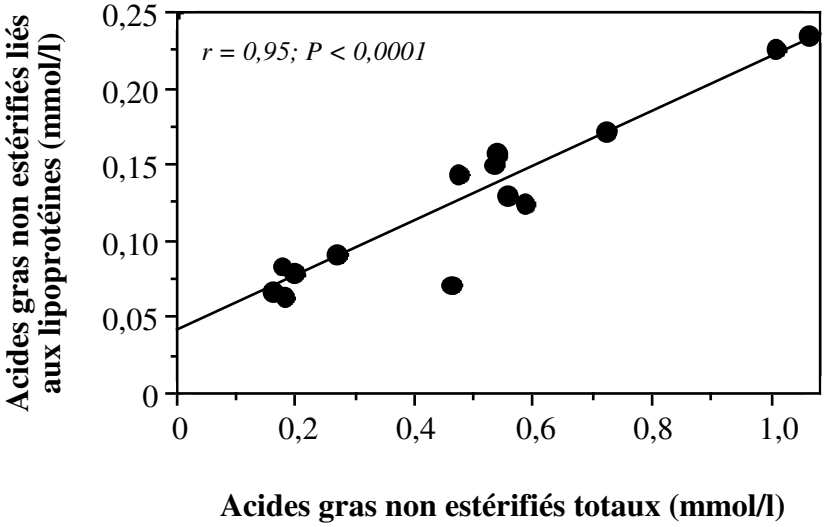


Figure 10: **Corrélation entre les concentrations en acides gras non estérifiés plasmatiques totaux et liés aux lipoprotéines** . La concentration en acides gras non estérifés est mesurée dans le plasma de 14 sujets normolipidémiques avant et après adsorption sur la FSD (concentration finale: 2,5 mg/ml). La concentration en acides gras dans la fraction lipoprotéique plasmatique est calculée par différence entre la concentration en acides gras dans les échantillons non traités et dans les échantillons adsorbés sur la FSD.

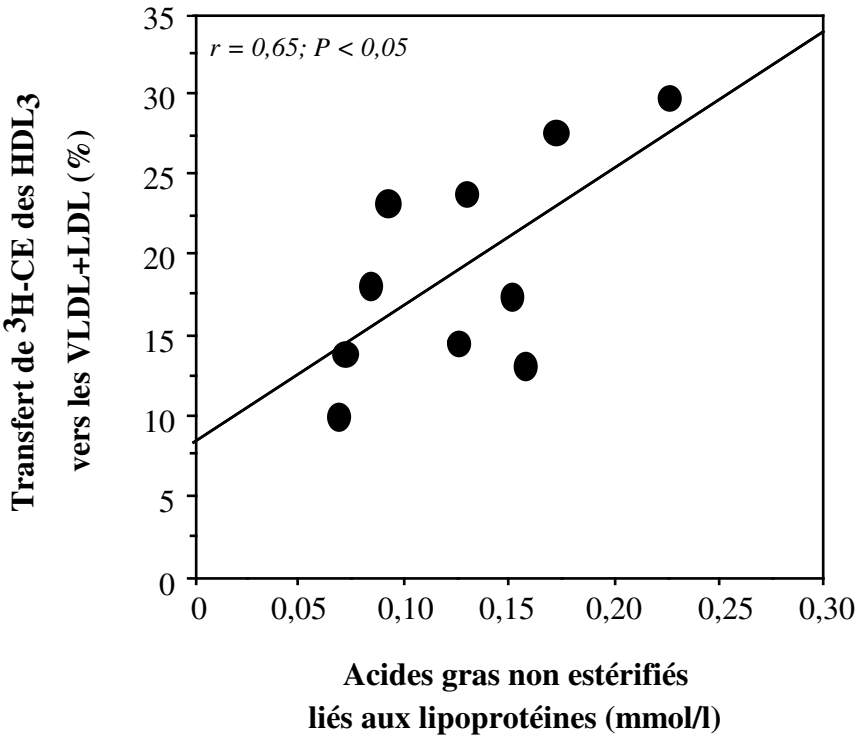


Figure 11: **Corrélation entre la concentration en acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines et l'activité CETP** . L'activité CETP est mesurée comme décrit précédemment entre des HDL 3 marquées et la fraction plasmatique de $d < 1{,}068$ g/ml dans 10 plasmas normolipidémiques. La concentration en acides gras liés aux lipoprotéines est mesurée après adsorption des lipoprotéines sur la FSD (concentration finale : 2,5 mg/ml).

Pour ce faire, des plasmas ont été supplémentés avec de l'albumine, de pureté supérieure à 99% et de concentration finale : 8 g/l, dépourvue d'acides gras. Son effet sur le taux de transfert des esters de cholestérol entre les fractions plasmatiques de $d < 1{,}068$ g/ml et $d > 1{,}068$ g/ml a été mesuré.

Les résultats montrent que l'addition d'albumine dépourvue d'acides gras entraîne une très forte réduction de l'activité $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ (18,3 ± 5,5 % *vs* 9,8 ± 3,1 %; n = 27; $P < 0{,}0001$). A l'opposé, l'activité $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ n'est pas significativement modifiée en présence d'albumine (22,3 ± 4,5 % *vs* 23,3 ± 5,1 %; n = 27; *n.s.*)

4. Transfert net massique d'esters de cholestérol et de triglycérides entre les HDL et VLDL+LDL plasmatiques.

Afin de déterminer si les acides gras non estérifiés peuvent non seulement influencer la vitesse de transfert des esters de cholestérol mais également la capacité des substrats lipoprotéiques à accepter ou à céder des lipides neutres, des plasmas totaux sont incubés pendant 24h à 37°C en présence ou en l'absence d'albumine et en présence d'un inhibiteur de la LCAT (acide iodoacétique, concentration finale : 1,5 mmol/l).

Dans les plasmas incubés en l'absence d'albumine, on observe une diminution significative du contenu en cholestérol estérifié (-4,5 ± 1,4 mg/dl; $P < 0{,}001$) et une augmentation du contenu en triglycérides (+14,4 ± 4,7 mg/dl; $P < 0{,}001$) des HDL par rapport aux plasmas témoins maintenus à 4°C.

La réduction du contenu en esters de cholestérol observée dans les plasmas incubés est significativement ($P < 0{,}001$) plus faible en présence d'albumine (-3,8 ± 1,6 mg/dl) que dans les échantillons non supplémentés (-4,5 ± 1,4 mg/dl). A l'opposé, l'augmentation du contenu en triglycérides des HDL est significativement ($P < 0{,}001$) plus importante en présence d'albumine (+17,7 ± 4,7 mg/dl) que dans les échantillons non supplémentés (+14,4 ± 4,7 mg/dl).

B. Analbuminémiques.

1. Paramètres plasmatiques.

Les résultats montrent que les patients étudiés présentent un taux d'albumine plasmatique significativement inférieur à celui des sujets témoins (20,67 ± 2,52 g/l *vs* 44,80 ± 1,09 g/l; $P < 0,036$). L'hypoalbuminémie est associée à des concentrations significativement plus élevées en cholestérol total (4,22 ± 0,47 g/l *vs* 1,86 ± 0,34 g/l; $P < 0,036$), LDL-C (2,84 ± 0,74 g/l *vs* 0,84 ± 0,20 g/l; $P < 0,036$) et triglycérides (1,56 ± 0,25 g/l *vs* 0,72 ± 0,16 g/l; $P < 0,036$) alors que le HDL-C (0,38 ± 0,05 g/l *vs* 0,47 ± 0,07 g/l; *n.s.*) est diminué comparativement aux sujets témoins. On note par conséquent une augmentation du rapport LDL-C / HDL-C chez les patients analbuminémiques (7,63 ± 2,45 *vs* 1,99 ± 0,84; $P < 0,036$).

La concentration plasmatique en acides gras non estérifiés totaux ne varie pas significativement entre les deux populations étudiées (0,22 ± 0,26 mmol/l *vs* 0,22 ± 0,15 mmol/l; $P < 0,036$).

2. Composition des lipoprotéines plasmatiques.

Les diverses fractions lipoprotéiques (VLDL, IDL, LDL, HDL_2 et HDL_3) ont été séparées par ultracentrifugation séquentielle et leur contenu en protéines, cholestérol (CT, CE), phospholipides et triglycérides a été dosé à l'aide de réactifs enzymatiques (Boehringer Mannheim) sur un analyseur Abbott-VP. Les résultats montrent que le rapport lipides / protéines est augmenté uniquement dans la fraction LDL des patients analbuminémiques (3,23 ± 0,20 *vs* 1,87 ± 0,95; $P < 0,036$). Alors que le pourcentage massique des composés de surface (phospholipides, cholestérol libre) dans chaque fraction lipoprotéique ne diffère pas entre les deux groupes étudiés, quelques différences apparaissent lorsque l'on compare leur contenu en lipides neutres (esters de cholestérol et triglycérides). En effet, les patients analbuminémiques présentent une augmentation

de leurs esters de cholestérol dans les fractions VLDL et LDL comparativement aux sujets témoins. Chez les analbuminémiques, les triglycérides sont diminués dans les VLDL et IDL et augmentés dans les HDL, sans toutefois être significativement différents par rapport aux sujets témoins. Le rapport cholestérol / triglycérides est augmenté dans les lipoprotéines à apoB des analbuminémiques (VLDL, IDL et LDL) et diminué dans la fraction HDL. Du fait du nombre restreint de patients étudiés, les différences observées dans le rapport cholestérol / triglycérides entre les deux groupes de sujets ne sont pas significativement différentes, à l'exception de la fraction VLDL.

3. Densité et taille des LDL.

Afin de déterminer si l'augmentation significative du rapport lipides / protéines, observé au niveau des LDL des patients analbuminémiques, peut être dû à une modification de la taille et de la densité de ces particules, les LDL ont été séparées d'une part par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives et d'autre part par ultracentrifugation en gradient de densité. Comparées aux LDL des sujets témoins, les LDL des analbuminémiques présentent une taille supérieure ($27{,}0 \pm 0{,}5$ nm *vs* $26{,}6 \pm 0{,}2$ nm; *n.s.*) et une densité moyenne significativement inférieure ($1{,}041 \pm 0{,}041$ *vs* $1{,}045 \pm 0{,}001$; $P < 0{,}036$).

4. Distribution des acides gras non estérifiés parmi les lipoprotéines plasmatiques.

Afin de déterminer si l'hypoalbuminémie est associée à une modification dans la répartition plasmatique des acides gras non estérifiés, les lipoprotéines plasmatiques ont été adsorbées sur la FSD comme décrit précédemment, et le contenu en acides gras de la fraction dépourvue de lipoprotéines a été dosé par des techniques enzymatiques. Bien

que présentant des concentrations plasmatiques en acides gras non estérifiés similaires (analbuminémiques: 0,22 ± 0,26 mmol/l; témoins: 0,22 ± 0,15 mmol/l; $P < 0,036$), de fortes différences apparaissent au niveau de la distribution de ces composés dans les lipoprotéines de ces deux groupes (figure 12). Ainsi, la majeure partie des acides gras non estérifiés est retrouvée dans la fraction lipoprotéique des analbuminémiques (BR: 59 ± 3 %; RR: 68 ± 3 %; ZA: 88 ± 20 %). Les sujets témoins présentent quant à eux un maximum de 10 % de leurs acides gras dans la fraction lipoprotéique.

La séparation des lipoprotéines par ultracentriguation séquentielle a permis de quantifier plus finement la répartition des acides gras non estérifiés au sein des particules lipoprotéiques. En accord avec les données obtenues par adsorption des lipoprotéines plasmatiques sur la FSD, chez les analbuminémiques la majorité des acides gras non estérifiés se retrouvent dans les fractions LDL, HDL_2, HDL_3. A l'opposé, seule une petite partie des acides gras non estérifiés est retrouvée dans la fraction contenant les lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL et IDL), que ce soit chez les patients analbuminémiques ou les sujets témoins. Ainsi, la forte proportion en acides gras non estérifiés dans les LDL des patients analbuminémiques comparée à celle des sujets témoins (33,9 ± 4,3 % *vs* 3,2 ± 2,3 % des acides gras plasmatiques) augmente l'électronégativité de ces particules qui en gel d'agarose migrent plus loin en direction de l'anode (figure 13-A). En effet, les LDL de sujets analbuminémiques présentent une distance de migration (7,1 ± 0,3 mm) significativement ($P < 0,036$) supérieure à celle des LDL de sujets témoins (5,4 ± 0,4 mm) (figure 13-B). De plus, la distance de migration des LDL en gel d'agarose est corrélée positivement avec leur contenu en acides gras ($r = 0,78$; $P = 0,04$).

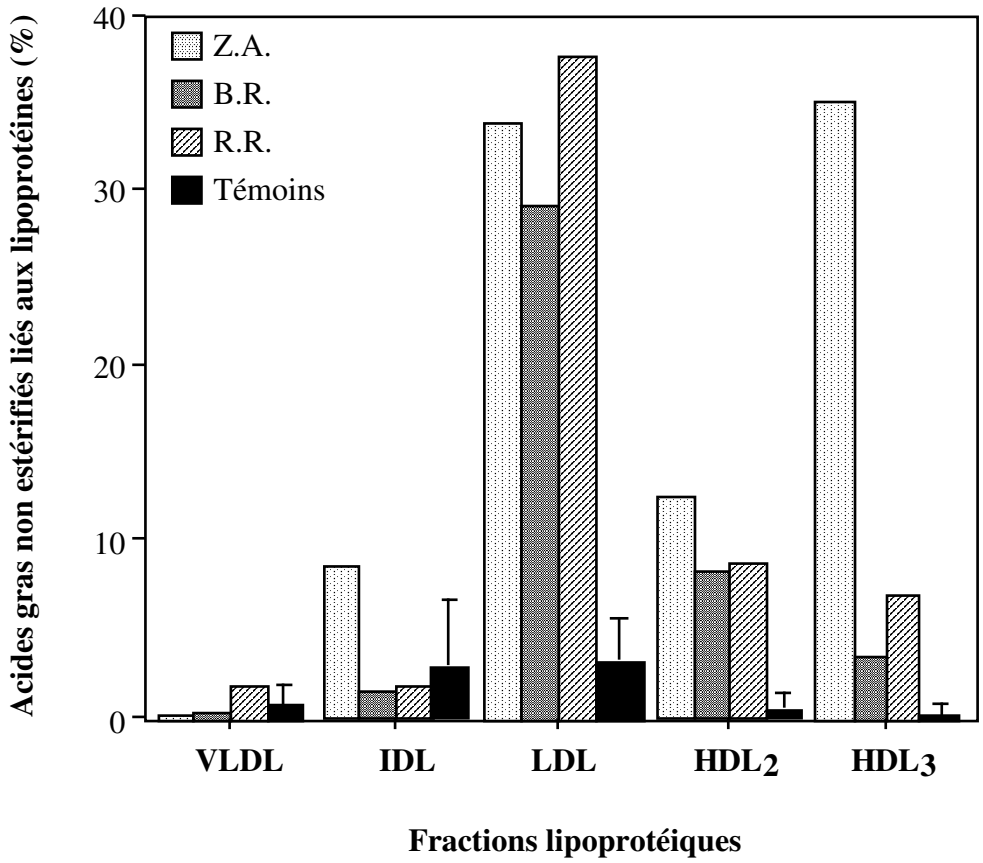


Figure 12 : **Distribution des acides gras non estérifiés au sein des lipoproteines**. Les fractions lipoprotéiques plasmatiques (VLDL, IDL, LDL et HDL) sont séparées par ultracentrifugation séquentielle. Les résultats sont exprimés en pourcentage des acides gras non estérifiés plasmatiques liés à chaque fraction lipoprotéique chez les trois patients analbuminémiques (ZA, BR, RR) et chez les cinq sujets témoins.

Les valeurs pour les analbuminémiques représentent la moyenne de trois mesures et pour les témoins la moyenne± écart type de cinq sujets.

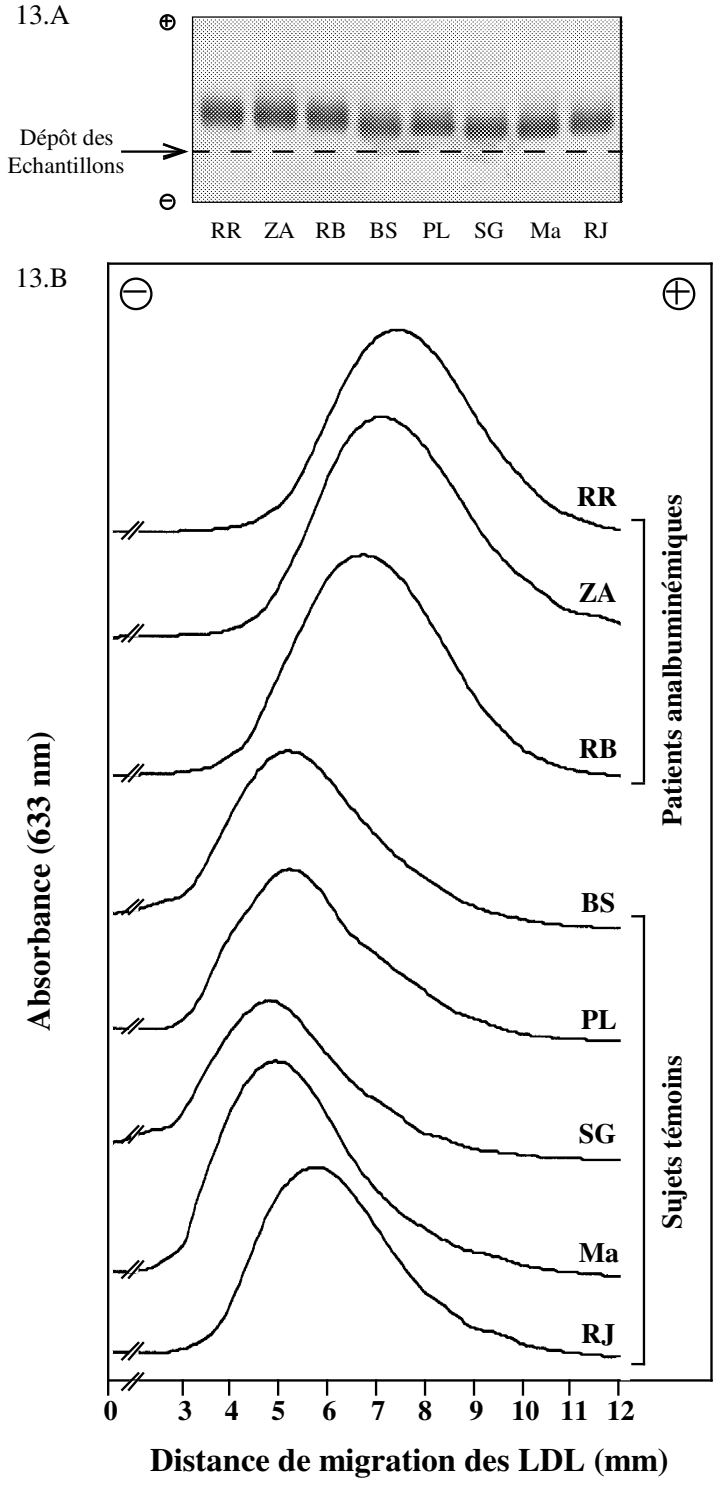


Figure 13 : **Profils électrophorétiques en gel d'agarose de LDL isolées à partir de plasmas de patients analbuminémiques ou de sujets témoins** . Les LDL plasmatiques sont isolées par ultracentrifugation et leur mobilité électrophorétique est déterminée, comme décrit dans la section "sujets et méthodes", par électrophorèse sur gel d'agarose et analyse d'image.

5. Transferts d'esters de cholestérol radioactifs chez les analbuminémiques et les témoins.

Comme le montre la figure 14, le taux de transfert des esters de cholestérol vers la fraction de $d < 1{,}068$ g/ml augmente progressivement durant les 3 premières heures d'incubation jusqu'à atteindre un plateau pour les temps d'incubation supérieurs à 4,5h. Durant la période étudiée, l'activité de transfert des esters de cholestérol chez les patients analbuminémiques est constamment et significativement ($P < 0{,}036$) supérieure à celle des sujets témoins. Après 3h d'incubation, l'activité moyenne de transfert des esters de cholestérol, exprimée en pourcentage de radioactivité transférée des HDL_3 vers les lipoprotéines à apoB par heure et par millilitre de plasma, est significativement supérieure ($P < 0{,}036$) chez les patients analbuminémiques ($473{,}6 \pm 107{,}3$ $\%.h^{-1}.ml^{-1}$) comparativement aux sujets témoins ($227{,}5 \pm 84{,}0$ $\%.h^{-1}.ml^{-1}$).

6. Effets de la supplémentation en albumine sur l'activité de transfert.

In vitro, l'albumine est susceptible de capter les acides gras présents à la surface des substrats lipoprotéiques lorsqu'elle est ajoutée à des plasmas normaux ou hypoalbuminémiques (SHAFRIR 1958). Dans cette étude, nous avons utilisé la forte capacité de l'albumine à lier les acides gras afin de confirmer que des concentrations élevées en acides gras liés aux lipoprotéines peuvent expliquer, au moins en partie, l'augmentation de l'activité de transfert.

Pour ce faire, des plasmas de patients analbuminémiques ou de sujets témoins ont été supplémentés avec des concentrations croissantes d'albumine dépourvue en acides gras. Après ajout de 5, 10, 15 et 20 g/l d'albumine l'activité de transfert chez les sujets témoins a été réduite de respectivement $-28{,}3 \pm 16{,}4$, $-42{,}2 \pm 20{,}7$, $-47{,}1 \pm 25{,}6$, $-50{,}1 \pm 23{,}7$ $\%.h^{-1}.ml^{-1}$, comparativement aux incubations homologues non supplémentées en albumine.

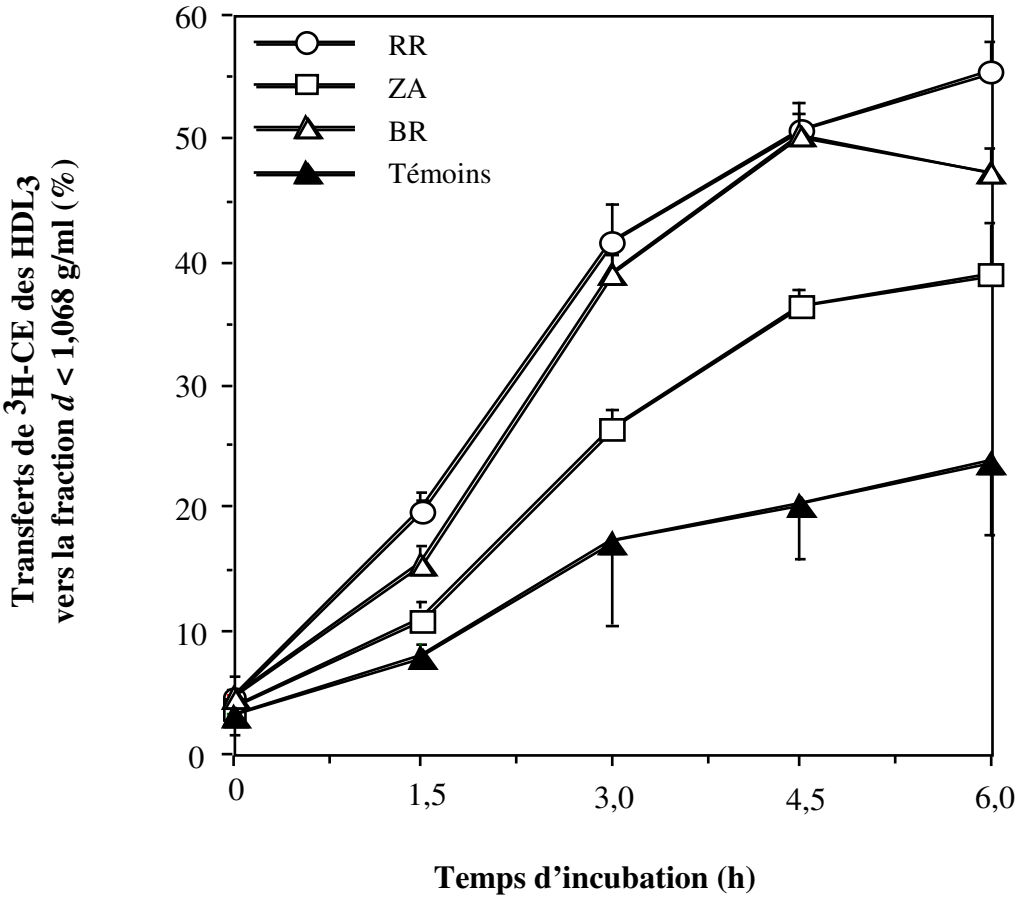


Figure 14: **Transferts d'esters de cholestérol radioactifs des HDL 3 vers la fraction plasmatique de *d* < 1,068 g/ml.** L'activité de transfert des esters de cholestérol est mesurée comme décrit précédemment dans les sérums de trois patients analbuminémiques (ZA, BR et RR) et cinq sujets témoins. Pour les analbuminémiques, les valeurs représentent la moyenne ± écart type de trois mesures chez chaque sujet. Pour les témoins, les valeurs représentent la moyenne ± écart type des cinq sujets normolipidémiques.

Chez les patients analbuminémiques et dans des conditions similaires, cette réduction a été de -54,4 ± 46,6, -92,4 ± 46,6, -122,2 ± 31,1 et -144,6 ± 66,2 $\%.h^{-1}.ml^{-1}$. L'activité observée entre les deux types de sujets est significativement différente aux plus fortes concentrations en albumine étudiées 15 g/l ($P = 0,05$) et 20 g/l ($P = 0,027$) (figure 15).

L'activité spécifique CETP dans les plasmas supplémentés en albumine est estimée en calculant le rapport entre l'activité de transfert des esters de cholestérol et la concentration massique en CETP. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'esters de cholestérol radioactifs transférés par heure et par microgramme de CETP ($\%.h^{-1}.\mu g^{-1}$). Les sujets analbuminémiques présentent une activité spécifique, augmentée par rapport aux sujets témoins, respectivement 93,4 ± 10,1 et 78,1 ± 15,9 $\%.h^{-1}.\mu g^{-1}$, bien que non significativement différente. Lorsque des plasmas analbuminémiques sont supplémentés avec des concentrations croissantes en albumine dépourvue d'acides gras, l'activité spécifique moyenne est diminuée de manière quasiment linéaire dans la gamme de concentration étudiée (figure 15). A l'opposé, dans les plasmas des sujets témoins l'activité spécifique CETP diminue très rapidement pour de faible concentrations en albumine dépourvue d'acides gras ajoutées (5 et 10 g/l). Au delà de ces concentrations, l'addition supplémentaire d'albumine n'entraîne plus de réduction significative de l'activité de transfert. A la concentration la plus élevée étudiée (20 g/l), les activités spécifiques CETP mesurées chez les patients analbuminémiques et les sujets témoins sont pratiquement identiques (66,1 ± 7,7 *vs* 61,7 ± 15,1 $\%.h^{-1}.\mu g^{-1}$). L'analyse de régression linéaire met en évidence une forte corrélation ($r = 0,94$) entre d'une part la concentration en albumine dépourvue d'acides gras ajoutée dans le milieu et d'autre part la variation d'activités de transfert. Comme le montre la figure 15 (graphe supérieur), lorsque la concentration en albumine ajoutée augmente, la variation d'activité de transfert diminue progressivement jusqu'à atteindre virtuellement une différence d'activité de transfert nulle pour une concentration en albumine ajoutée égale à 28 g/l.

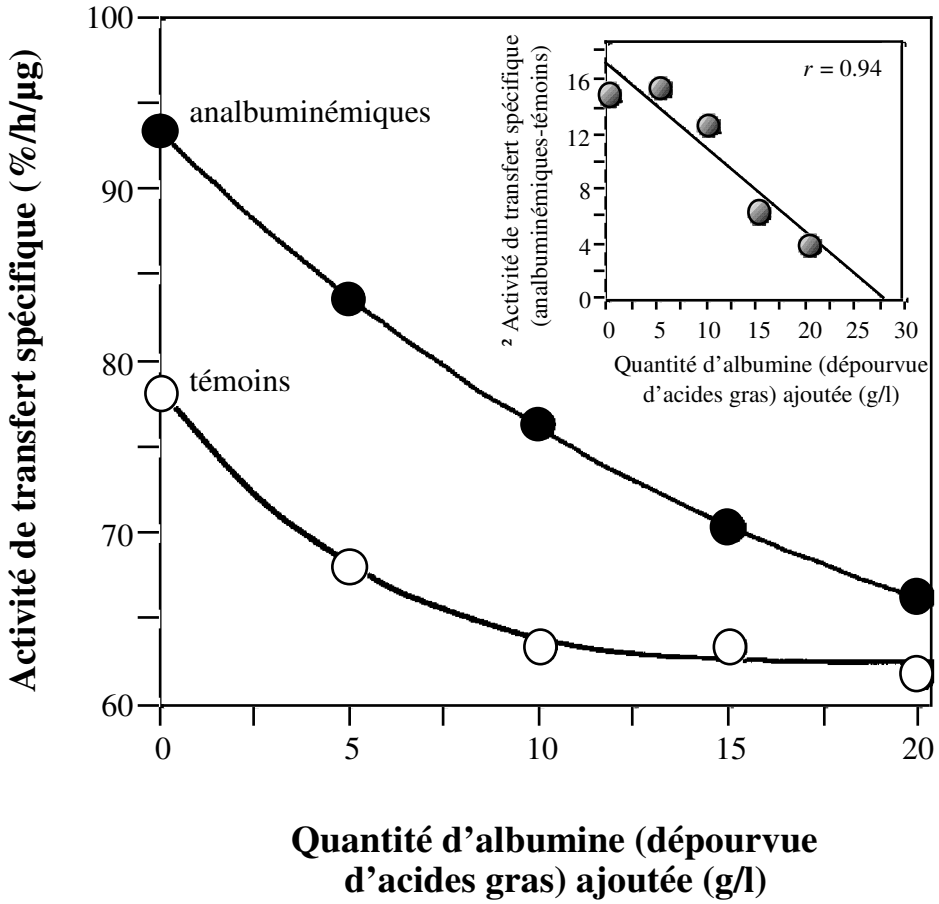


Figure 15: **Effets de la supplémentation de plasmas totaux en albumine (dépourvue d'acides gras) sur l'activité spécifique CETP** . L'activité spécifique est mesurée des HDL 3 vers les lipoprotéines à apo.B. Les valeurs représentent la moyenne de trois plasmas de patients analbuminémiques (cercles pleins) et de cinq plasmas de sujets témoins. Les différences entre les échantillons analbuminémiques et témoins sont calculées et corrélées avec la concentration en albumine (dépourvue d'acides gras) ajoutée dans le milieu d'incubation (graphe supérieur).

C. Syndromes néphrotiques.

1. Paramètres plasmatiques.

Les résultats montrent, chez les patients présentant un syndrome néphrotique, une augmentation significative du cholestérol total (3,48 ± 0,28 g/l *vs* 1,77 ± 0,11 g/l, $P < 0{,}001$), du cholestérol LDL (2,73 ± 0,27 g/l *vs* 1,21 ± 0,10 g/l, $P < 0{,}001$) et des triglycérides (1,95 ± 0,25 g/l *vs* 0,76 ± 0,05 g/l, $P < 0{,}001$) et une diminution du cholestérol HDL (0,36 ± 0,04 g/l *vs* 0,41 ± 0,01 g/l, $P < 0{,}01$) comparativement aux sujets témoins. Par ailleurs, le taux d'acides gras non estérifiés plasmatiques, bien que se situant dans des gammes normales de concentration chez ces deux populations, sont légèrement augmentés chez les patients présentant un syndrome néphrotique (0,193 ± 0,028 mmol/l *vs* 0,121 ± 0,060 mmol/l; $P < 0{,}05$), lesquels ont également un taux d'albumine plasmatique effondré (25 ± 1 g/l *vs* 45 ± 1 g/l; $P < 0{,}001$).

2. Activité CETP plasmatique.

Les activités de transfert ont été déterminées, comme décrit précédemment, en mesurant le taux d'esters de cholestérol radioactifs transferés d'un substrat lipoprotéique donneur marqué ([^{3}H]CE-HDL$_3$) vers des lipoprotéines à apoB. Chez les sujets présentant un syndrome néphrotique l'activité CETP est augmentée comparativement aux sujets témoins (46,9± 4,4 % *vs* 18,5 ± 2,9 %; $P < 0{,}001$). Cette activité augmentée s'explique en partie par une augmentation de la masse CETP chez les néphrotiques (3,2 ± 0,9 *vs* 1,9 ± 0,1 mg/l; $P < 0{,}001$). Cependant, il faut noter que non seulement la concentration massique en CETP mais également la capacité de la CETP à interagir avec les lipoprotéines plasmatiques sont augmentées chez les néphrotiques. En effet, chez ces sujets, l'activité spécifique exprimée en taux d'esters de cholestérol transférés par nanogramme de CETP est significativement supérieure à celle des sujets témoins (0,59 ± 0,04 %/ng *vs* 0,38 ± 0,06 %/ng; $P < 0{,}05$).

3. Effets des acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines sur la charge électrostatique des lipoprotéines et sur l'activité CETP.

Les patients présentant un syndrome néphrotique, outre une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés (0,193 ± 0,028 mmol/l *vs* 0,121 ± 0,060 mmol/l; $P < 0,05$), montrent une distribution augmentée de ces acides gras dans leurs lipoprotéines plasmatiques (34,4 ± 7,7 % chez les néphrotiques *vs* 7,6 ± 3,0 % chez les témoins). On observe par ailleurs une corrélation négative ($r = -0,56$; $P < 0,05$) entre la proportion d'acides gras liés aux lipoprotéines et la concentration plasmatique d'albumine. Le taux d'acides gras liés aux lipoprotéines est augmenté dans toutes les fractions lipoprotéiques chez les néphrotiques, cependant, les différences observées entre ces deux populations ne sont significatives que pour la fraction LDL (14,8 ± 3,5 % des acides gras totaux dans les LDL chez les néphrotiques *vs* 0,4 ± 0,4 % chez les témoins).

La mobilité électrophorétique des LDL plasmatiques, mesurée par électrophorèse sur gel d'agarose, montre une diminution de la charge électrostatique - c'est à dire une augmentation d'électronégativité - des LDL (-4,3 ± 0,1 mV *vs* -3,9 ± 0,1 mV; $P < 0,05$) et des HDL (-11,5 ± 0,1 mV *vs* -11,1 ± 0,2 mV; $P < 0,05$) chez les sujets néphrotiques comparativement aux sujets témoins. De plus, la charge électronégative, des fractions LDL et HDL plasmatiques, est corrélée positivement avec la concentration plasmatique en albumine parmi les deux populations ($r = 0,77$; $P < 0,0001$ et $r = 0,52$; $P = 0,01$, respectivement) suggérant par là même un rôle direct de l'hypoalbuminémie sur l'augmentation d'électronégativité des lipoprotéines. Enfin, les résultats montrent une corrélation positive et significative entre la proportion d'acides gras plasmatiques liés aux lipoprotéines et l'activité CETP plasmatique ($r = 0,55$; $P < 0,01$).

4. Effets de la supplémentation en albumine sur la charge des lipoprotéines plasmatiques et sur l'activité CETP.

Afin de démontrer que l'hypoalbuminémie, associée aux syndromes néphrotiques, peut expliquer au moins en partie les variations d'activité de transfert des esters de cholestérol observées, des plasmas ont été supplémentés en albumine - dépourvue d'acides gras - et l'activité de transfert ainsi que la charge électronégative des LDL et HDL plasmatiques ont été mesurées.

Les résultats montrent que la captation par l'albumine des acides gras non estérifiés, liés aux lipoprotéines, induit une augmentation de la charge électrostatique - c'est à dire une diminution de l'électronégativité - des LDL (-4,3 ± 0,1 mV avant supplémentation *vs* -4,1 ± 0,1 mV après supplémentation; $P < 0,05$) chez les néphrotiques alors qu'aucune variation n'est observée chez les témoins (-3,9 ± 0,1 mV avant et après supplémentation). La charge des HDL varie quant à elle de -11,5 ± 0,1 mV (avant supplémentation) à -10,6 ± 0,1 mV (après supplémentation) chez les néphrotiques ($P < 0,0001$) et de -11,1 ± 0,1 mV (avant supplémentation) à -10,3 ± 0,1 mV (après supplémentation) chez les témoins. La supplémentation en albumine induit par ailleurs une réduction de l'activité CETP de 46,9 ± 4,4 % à 37,1 ± 3,6 % chez les néphrotiques et de 18,4 ± 2,9 % à 14,4 ± 2,2 % chez les témoins.

IV. DISCUSSION.

Les acides gras non estérifiés constituent une source importante d'énergie pour divers tissus et de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les propriétés et les états physiques des acides gras durant leur transport dans les milieux biologiques tels que les compartiments intracellulaires ou plasmatiques. Les acides gras peuvent ainsi être impliqués dans divers processus biologiques parmi lesquels l'agrégation plaquettaire (HOAK *et al.* 1970), la liaison des LDL à leur récepteurs cellulaires de surface (BIHAIN *et al.* 1989), la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (YEN *et al.* 1994), l'estérification du cholestérol plasmatique par la LCAT (HOMMA 1989),

l'hydrolyse des triglycérides par la LPL (SAXENA *et al.* 1989) ou bien encore la secrétion de la CETP par des lignées cellulaires type CaCo2 (FAUST *et al.* 1988) ou HepG2 (SPERKER *et al.* 1993).

In vitro, il a été clairement démontré que les acides gras modulaient l'interaction de la CETP avec les substrats lipoprotéiques (SAMMETT et TALL 1985, BARTER *et al.* 1990b, LAGROST et BARTER 1991b, NISHIDA *et al.* 1993) et que leur ionisation, leur concentration finale, leur degré d'insaturation, la configuration *cis* ou *trans* de leur double liaison ou leur aptitude à modifier la fluidité les lipoprotéines (SAMMETT et TALL 1985, LAGROST et BARTER 1991b, LAGROST 1992a, NISHIDA *et al.* 1993, FOUCHER *et al.* 1996) étaient des facteurs importants du mécanisme de régulation de l'activité de la CETP. Par ailleurs, *in vitro*, la faculté des acides gras à moduler cette activité est inhibée en présence d'albumine dépourvue d'acides gras (SAMMETT et TALL 1985, BARTER *et al.* 1990b, LAGROST et BARTER 1991b). En fait, l'effet observé lors de la supplémentation en albumine semble être principalement dû à la capacité de l'albumine à lier les acides gras plutôt qu'à un rôle hypothétique direct de l'albumine sur l'activité de transfert. SAMMETT et TALL (1985) ont ainsi démontré que cette supplémentation inhibait l'aptitude des acides gras à moduler l'échange (CETP dépendant) d'esters de cholestérol entre des substrats lipoprotéiques isolés. A l'opposé, l'addition d'albumine seule, en absence d'acides gras, n'affecte pas cette réaction de transfert (LAGROST et BARTER 1991).

In vivo, les acides gras sont majoritairement liés à l'albumine (SHAFRIR 1958), mais ils peuvent également être retrouvés dans les membranes des cellules endothéliales et sanguines et au niveau des particules lipoprotéiques (SMALL 1992). Dans des conditions physiologiques normales, les acides gras peuvent se lier à trois sites spécifiques de haute affinité sur l'albumine (CISTOLA *et al.* 1986, 1987a-b) (figures 16 et 17). En considérant l'existence de ces trois sites de haute affinité, on peut envisager que lorsque le rapport molaire acides gras / albumine est supérieur à trois on puisse, *in vivo*, avoir une redistribution des acides gras plasmatiques vers les membranes cellulaires et les lipoprotéines. Cependant des études ont révélé que des modifications de la distribution plasmatique des acides gras pouvaient être observées à de plus faibles rapport molaires.

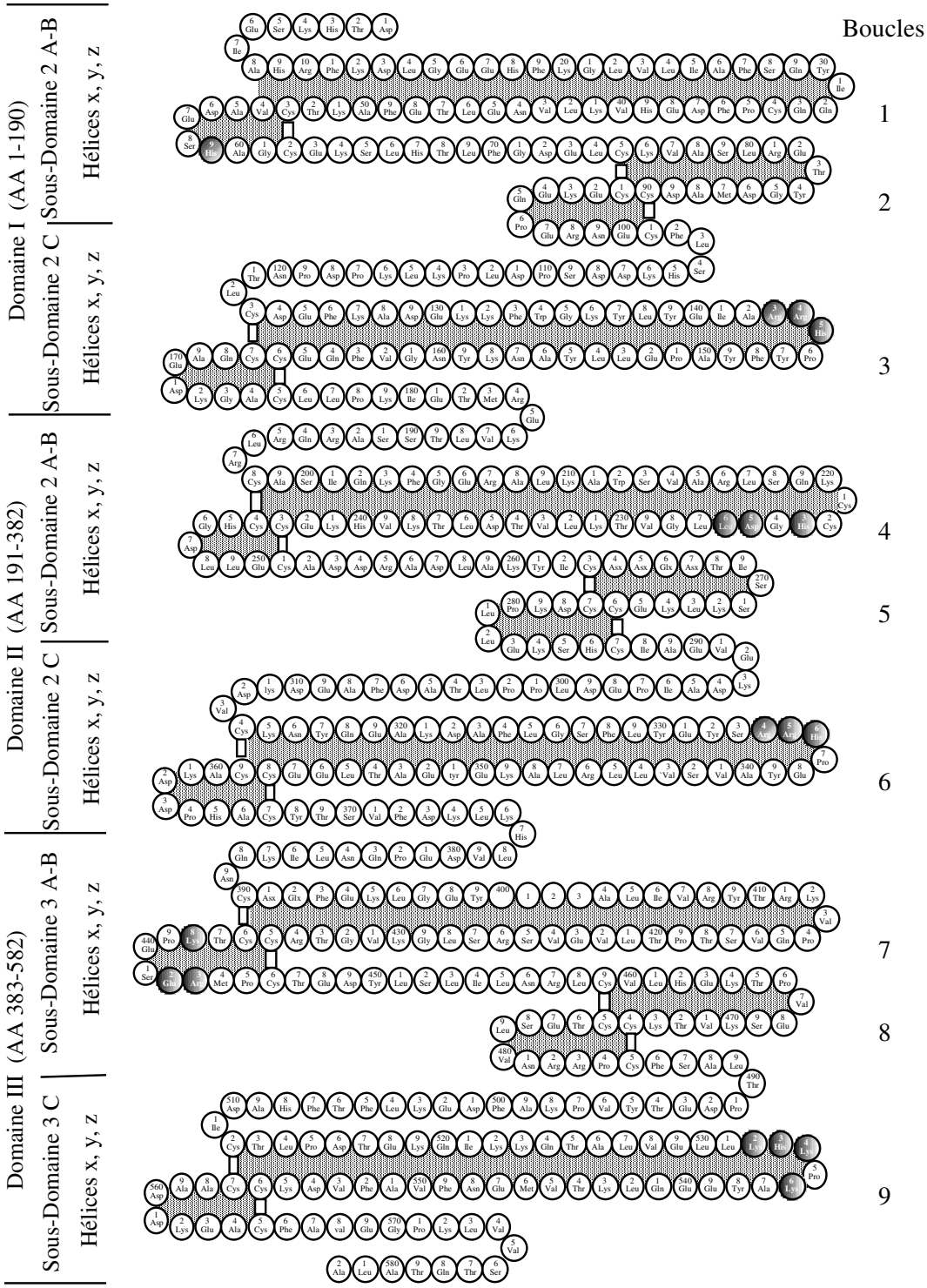


Figure 16: **Structure primaire de l'albumine bovine.** Sur ce schéma sont figurés les divers acides aminés constitutifs de la molécule d'albumine bovine ((6 Lys) ainsi que ceux intervenant dans les sites de liaison des acides gras ((532 Lys)).
Sont également représentés les ponts disulfure ( ) et les boucles de repliement constitutives de la molécule ( ).

D'après :

Kragh-Hansen (1981) *Pharmacological Review* **33**, 17-53.
Panjenshahin (1992) *Biochem. Pharma.* **44**, 873-879.

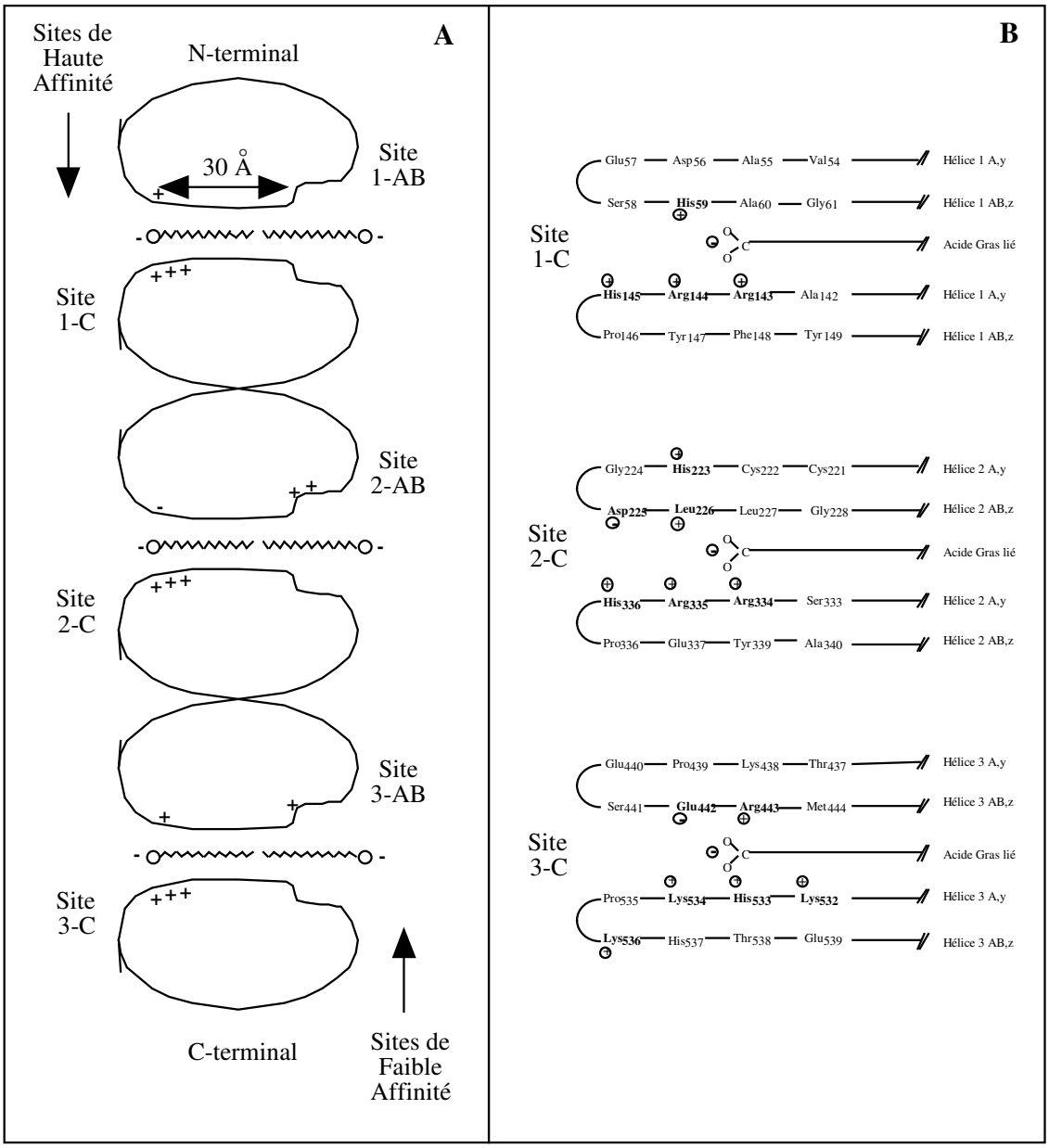


Figure 17: **Schéma de la molécule d'albumine et des sites de liaison des acides gras.** Les acides gras à chaîne longue occupent 3 sites de haute affinité (1C, 2C, 3 C) avec leur tête carboxylique a l'entrée du canal et leur chaîne carbonée à l'intérieur du canal. Les sites 1AB, 2AB et 3AB étant des sites de plus faible affinité pour les acides gras à longue chaîne et à chaîne courte. Les molécules d'acides gras représentent environ 200 nm (C16:0). La longueur du canal de liaison (environ 300 nm) ne permet pas de lier entièrement 2 molécules de C16:0. Ainsi, dans certains sites de liaison, les molécules d'acide gras font saillie hors du site de liaison.

d'après:

Brown (1982) Lipid and protein interactions, John Willey & Sons, New York
Cistola (1987)*J. Biol. Chem.* **262**, 10971-10979.
Cistola (1987)*J. Biol. Chem.* **262**, 10980-10985.

Les acides gras totaux peuvent donc être redistribués progressivement vers les membranes cellulaires et les lipoprotéines plasmatiques lorsque le rapport molaire acides gras / albumine augmente (CISTOLA et SMALL 1991). On peut ainsi supposer que toute augmentation anormale du rapport molaire acides gras / albumine, résultant soit d'une augmentation la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés soit d'une diminution du taux plasmatique d'albumine, puisse être associée à un accroissement du contenu en acides gras non estérifiés des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques.

Jusqu'à présent, peu d'études avaient posé la question de savoir si, *in vivo*, les acides gras non estérifiés, liés aux lipoprotéines, malgré leur faible concentration, pouvaient avoir une influence quelconque sur l'activité CETP. Nous avons donc étudié une population normolipidémique, facilement recrutable, mais chez laquelle les acides gras, liés aux lipoprotéines, représentaient une fraction minoritaire des acides gras non estérifiés totaux (SHAFRIR 1958), ce qui pouvait poser des problèmes quant à la significativité des résultats. Si dans ces conditions il nous était possible de démontrer un effet des acides gras liés aux lipoprotéines, celui-ci pourrait être considérablement augmenté dans toutes situations entraînant une redistribution préférentielle des acides gras de l'albumine vers les lipoprotéines. Nous avions émis l'hypothèse que cette redistribution des acides gras non estérifiés de l'albumine vers les lipoprotéines devait augmenter l'électronégativité de ces macromolécules induisant consécutivement une augmentation de l'activité CETP dans ces plasmas. Nous avons ainsi été amenés à nous intéresser à deux types de pathologies (analbuminémie et syndrome néphrotique) dans lesquelles on pouvait s'attendre à observer une augmentation anormale du rapport molaire acides gras / albumine, résultant soit d'une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés (comme c'est le cas chez les personnes présentant un syndrome néphrotique) soit d'une diminution du taux plasmatique d'albumine (observé chez des analbuminémiques et des syndromes néphrotiques).

En accord avec les données de SHAFRIR (1958), nous avons pu confirmer dans cette étude, soit en utilisant des techniques d'adsorption sur la FSD soit par ultracentrifugation que, bien que les acides gras soient majoritairement liés à l'albumine chez les témoins normolipidémiques, une fraction faible est liée aux lipoprotéines. L'analyse du contenu en acides gras non estérifiés des lipoprotéines des populations

hypoalbuminémiques (analbuminémiques et syndromes néphrotiques), qui présentent un taux d'albumine plasmatique très faible (inférieur à 25 g/l) et une activité de transfert des lipides neutres très augmentée comparativement aux sujets témoins, montrent, que ces patients présentent un taux plasmatique d'acides gras similaire (analbuminémiques) ou augmenté (néphrotiques) par rapport à celui des témoins, une redistribution préférentielle des acides gras au niveau de la fraction lipoprotéique (principalement LDL).

Par ailleurs, nous avons clairement démontré, chez les témoins normolipidémiques, l'existence d'une corrélation positive significative ($r = 0,95$; $P < 0,0001$) entre le taux d'acides gras non estérifiés et la concentration en acides gras liés aux lipoprotéines (figure 10). Il existe par ailleurs une corrélation qui, bien que faible, n'en demeure pas moins significative ($r = 0,46$; $P < 0,005$), entre d'une part la concentration en acides gras plasmatiques et d'autre part l'activité CETP. Cette corrélation est renforcée lorsque l'activité de transfert est comparée non plus à la concentration plasmatique en acides gras totaux mais à la concentration en acides gras liés aux lipoprotéines que ce soit chez des sujets normolipidémiques ($r = 0,65$; $P < 0,05$) (figure 11) ou chez des sujets néphrotiques ($r = 0,55$; $P < 0,01$). Ces résultats permettent de penser que si, *in vivo*, les acides gras non estérifiés sont susceptibles de moduler l'activité CETP, ce sont principalement les acides gras liés aux lipoprotéines et non ceux liés à l'albumine qui peuvent jouer ce rôle.

Des expériences de capture des acides gras à la surface des lipoprotéines par l'albumine dépourvue d'acides gras (SHAFRIR 1958) montrent que cette supplémentation, qui n'entraîne qu'une très faible diminution d'activité chez des sujets normolipidémiques, induit une très forte réduction de l'activité de transfert dans des plasmas hypoalbuminémiques. De plus, l'activité CETP ayant tendance à diminuer jusqu'à une valeur de base lorsque la concentration plasmatique en albumine est normalisée, l'augmentation d'activité CETP plasmatique associée à l'analbuminémie semble être directement liée à une augmentation du contenu en acides gras des lipoprotéines plasmatiques.

En fait, chez les analbuminémiques, la distribution différente des acides gras non estérifiés entre l'albumine et les lipoprotéines induit une augmentation significative de

la mobilité électrophorétique des particules LDL, en direction de l'anode sur gel d'agarose, indiquant par là même une augmentation de leur électronégativité (figure 13) dûe aux acides gras présents à la surface des lipoprotéines. Chez les patients présentant un syndrome néphrotique la charge électrostatique (SPARKS et PHILIPPS 1992) des LDL et des HDL plasmatiques est corrélée positivement avec la concentration en albumine plasmatique parmi les sujets étudiés. En d'autres termes une augmentation de la sévérité de l'hypoalbuminémie est associée avec une électronégativité accrue des lipoprotéines. Chez les patients présentant un syndrome néphrotique, l'addition d'albumine induit une diminution de la charge électronégative des LDL et HDL plasmatiques entrainant consécutivement une réduction de l'activité de transfert des lipides neutres. A l'opposé, chez des témoins normolipidémiques, on observe une diminution de l'électronégativité des HDL alors que la charge des LDL n'est pas modifiée. La réduction d'électronégativité des HDL n'entraîne pas de modification de l'activité de transfert des esters de cholestérol. Comme nous le montrerons au chapitre suivant, nous avons pu constater que chez les analbuminémiques les LDL les plus électronégatives constituaient des accepteurs préférentiels dans la réaction de transfert des esters de cholestérol.

En conclusion, nos résultats tendent à démontrer que dans des conditions physiologiques normales la faible proportion des acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines peut avoir une influence, qui bien que faible n'en demeure pas moins significative, sur l'activité de la protéine de transfert des esters de cholestérol. Le rôle de ces acides gras en tant qu'activateurs de la CETP est augmenté dans certaines situations pathologiques associées à une redistribution des acides gras de l'albumine vers les lipoprotéines, comme nous l'avons mis en évidence dans les deux types d'hypoalbuminémies étudiées (analbuminémie et syndrome néphrotique). En fait, il semble probable que ce phénomène d'activation, par les acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines, ne soit pas circonscrit aux seules hypoalbuminémies mais qu'il puisse être également appliqué à d'autres modèles physiopathologiques tels que l'anorexie mentale ou bien encore le diabète non insulino-dépendant. Mais au delà du rôle des acides gras proprement dit, il nous paraît important de considérer qu'il existe un "effet charge" qui serait à même de réguler l'activité de la CETP (MASSON *et al.* 1996).

Dans la suite de notre travail, nous avons essayé de mieux préciser ce mécanisme et notamment nous avons cherché à savoir si d'autres composés, présentant des structures chimiques similaires à celles des acides gras, étaient susceptibles d'induire des modifications de l'électronégativité des lipoprotéines, augmentant d'une part l'interaction de la CETP avec les lipoprotéines et d'autre part l'activité de cette protéine.

DEUXIEME PARTIE

EXPLORATION PAR UNE NOUVELLE METHODE DE MESURE DU TRANSFERT DES ESTERS DE CHOLESTEROL ENTRE LES DIVERSES FRACTIONS LIPOPROTEIQUES DU PLASMA PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN GRADIENT.

cf. Annexe 2:

Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from analbuminemic patients.

BRASCHI, S., LAGROST, L., FLORENTIN, E., MARTIN, C., ATHIAS, A., GAMBERT, P., KREMPF, M., LALLEMANT, C. & JACOTOT, B.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **16**, 441-449 (1996)

cf. Annexe 4:

Polyacrylamide gradient gel electrophoresis as a method to measure transfers of radiolabeled cholesteryl esters between several plasma lipoprotein fractions.

FLORENTIN, E., LAGROST, L., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P.

Anal. Biochem. **216**, 352-357 (1994)

I. INTRODUCTION

La CETP constituant un des facteurs susceptibles d'influencer la distribution du cholestérol entre les LDL et HDL, de nombreuses méthodes de dosage ont été développées afin de mesurer l'activité de transfert des esters de cholestérol dans divers échantillons biologiques, parmi lesquels le plasma humain. La plupart des méthodes utilisées pour quantifier l'activité de transfert sont basées sur la mesure du taux de transfert des esters de cholestérol d'un substrat lipoprotéique donneur vers un substrat accepteur (QUIG et ZILVERSMIT 1990). Cependant, la réaction de transfert, catalysée par la CETP est très complexe et les transferts d'esters de cholestérol ont lieu entre toutes les fractions lipoprotéiques. Ainsi, la mesure du taux de transfert des esters de cholestérol d'un substrat lipoprotéique marqué vers un substrat lipoprotéique accepteur unique reflète de manière partielle les transferts d'esters de cholestérol tels qu'ils se produisent dans le plasma. Par conséquent, une évaluation complète de cette activité devrait prendre en compte ces transferts dans leur globalité. Cette mesure, impliquant le fractionnement de toutes les classes de lipoprotéines, s'avère être quelque peu fastidieuse en utilisant des techniques telles que l'ultracentrifugation séquentielle ou la précipitation.

Dans cette étude, les transferts multiples d'esters de cholestérol ont été évalués en utilisant une approche différente consistant à séparer les diverses classes de lipoprotéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration 20-160 g/l, à découper, puis à dissoudre le gel par l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et finalement à mesurer la radioactivité contenue dans les diverses fractions lipoprotéiques par comptage des fragments de gels de polyacrylamide dissous (Figure 18).

A titre d'exemple, cette méthode électrophorétique a été appliquée, chez des sujets normolipidémiques, à la mesure du taux d'esters de cholestérol radioactifs transférés soit à partir de HDL_3 vers les deux autres fractions lipoprotéiques plasmatiques principales les VLDL et LDL ($CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$) soit à partir de LDL vers les HDL ($CET_{LDL \rightarrow HDL}$). Dans un second temps, cette technique a été appliquée à la mesure du transfert d'esters de cholestérol au sein de plasmas de patients analbuminémiques en comparaison avec des plasmas de sujets témoins.

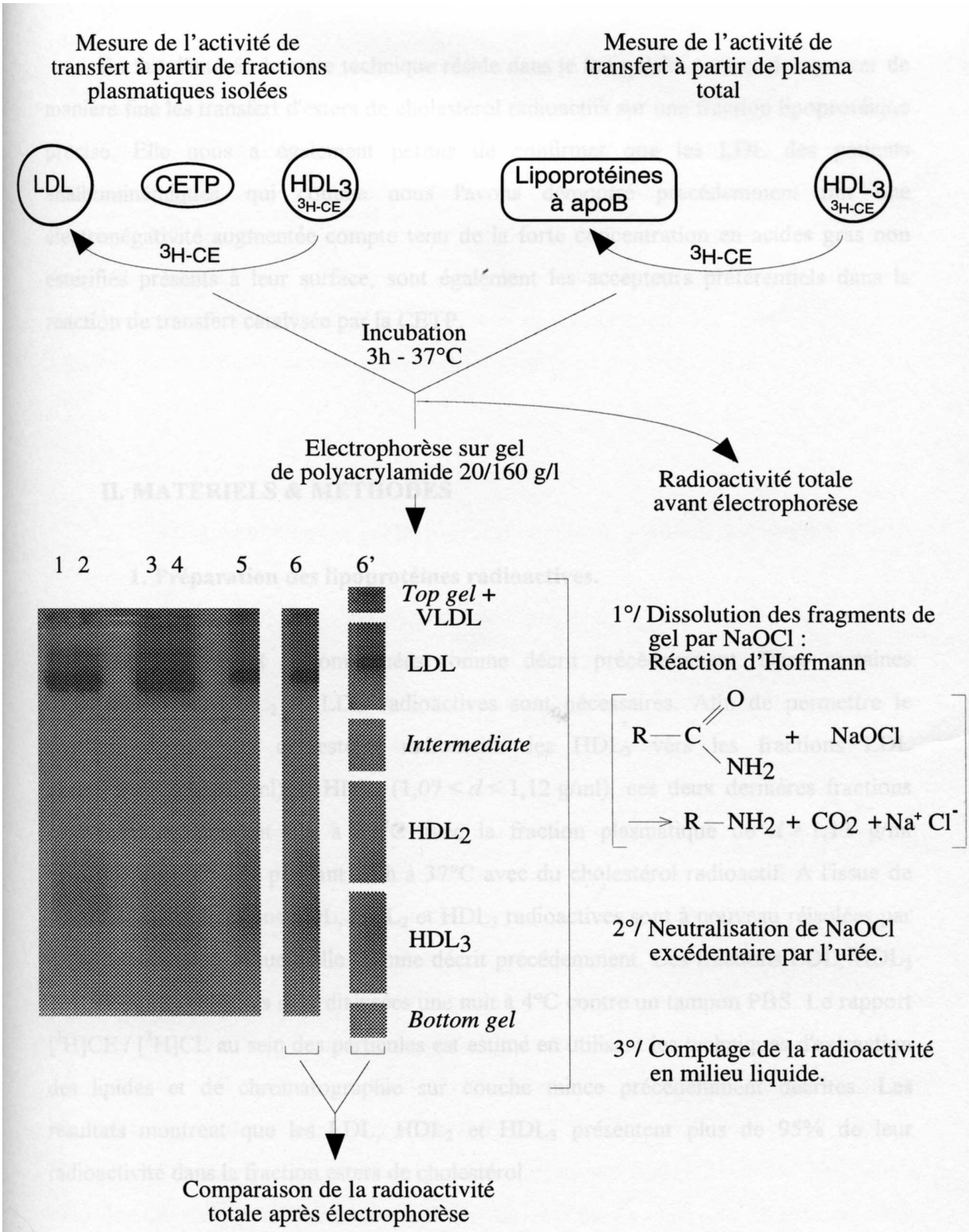


Figure 18: **Principe de mesure de l'activité de transfert des esters de cholestérol sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration 20-160 g/l.**

En fait, l'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'elle permet de mesurer de manière fine les transfert d'esters de cholestérol radioactifs sur une fraction lipoprotéique précise. Elle nous a également permis de confirmer que les LDL des patients analbuminémiques, qui comme nous l'avons démontré précédemment ont une électronégativité augmentée compte tenu de la forte concentration en acides gras non estérifiés présents à leur surface, sont également les accepteurs préférentiels dans la réaction de transfert catalysée par la CETP.

II. MATERIELS & METHODES

1. Préparation des lipoprotéines radioactives.

Des HDL_3 sont radiomarquées comme décrit précédemment. Dans certaines expériences, des HDL_2 et LDL radioactives sont nécessaires. Afin de permettre le transfert d'esters de cholestérol radioactifs des HDL_3 vers les fractions LDL ($1,019 < d < 1,055$ g/ml) et HDL_2 ($1,07 < d < 1,12$ g/ml), ces deux dernières fractions sont incubées pendant 6 h à 37°C avec la fraction plasmatique de $d > 1,13$ g/ml préalablement incubée pendant 24 h à 37°C avec du cholestérol radioactif. A l'issue de l'incubation, les fractions LDL, HDL_2 et HDL_3 radioactives sont à nouveau réisolées par ultracentrifugation séquentielle comme décrit précédemment. Les fractions LDL, HDL_2 et HDL_3 ainsi obtenues sont dialysées une nuit à 4°C contre un tampon PBS. Le rapport [^{3}H]CE / [^{3}H]CL au sein des particules est estimé en utilisant les techniques d'extraction des lipides et de chromatographie sur couche mince précédemment décrites. Les résultats montrent que les LDL, HDL_2 et HDL_3 présentent plus de 95% de leur radioactivité dans la fraction esters de cholestérol.

2. Milieu d'incubation.

Une dose traceuse de HDL_3 (HDL_2 ou LDL) radiomarquées (10 nmol de cholestérol) est ajoutée à 150 µl de plasma humain dans un volume final de 200 µl. L'activité de la lecithine:cholesterol acyltransferase (LCAT) plasmatique est bloquée par ajout d'iodoacétate au milieu réactionnel (concentration finale : 1,5 mmol/l). Les mélanges sont incubés 3h à 37°C. A l'issue de l'incubation, les lipoprotéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient.

3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration.

Avant l'électrophorèse, un volume de lipoprotéines plasmatiques des milieux d'incubation est précoloré par 0,5 volume d'une solution de Noir Soudan B à 5 g/l dans l'ethylène glycol comme décrit par GAMBERT *et al.* (1990). Les échantillons sont ajoutés au noir soudan sous agitation douce puis placés à 4°C pendant 15 mn. Par la suite, les échantillons sont soumis à centrifugation pendant 10 mn à la vitesse de 13 000 rpm dans une centrifugeuse Biofuge A Heraeus Christ. L'électrophorèse se déroule suivant la procédure décrite précédemment (GAMBERT *et al.* 1990). Après une préélectrophorèse de 1 h à 50 V, une aliquote de 10 µl du milieu d'incubation coloré au noir soudan est déposée sur un gel de polyacrylamide en gradient 20-160 g/l dans des puits de 3 mm de large. L'électrophorèse se déroule à 4°C pendant 2 h à 30 V, 1 h à 60 V et 14 h à 80 V dans un tampon de migration composé de 14 mmol/l de Tris, 110 mmol/l de glycine, 1,5 mmol/l de NaN_3 (pH 8,4). A l'issue de l'électrophorèse, les portions de gel contenant les fractions lipoprotéiques ("*Top gel*+VLDL", "LDL", "*Intermediate*", "HDL_2", "HDL_3" et "*Bottom gel*") sont découpées avec un scalpel (figure 18-19) et transférées dans des tubes de polyethylène à vis de 20 ml. Une bande complète de gel contenant l'ensemble des lipoprotéines d'un même sérum est également découpée afin d'estimer la radioactivité totale (figure 18).

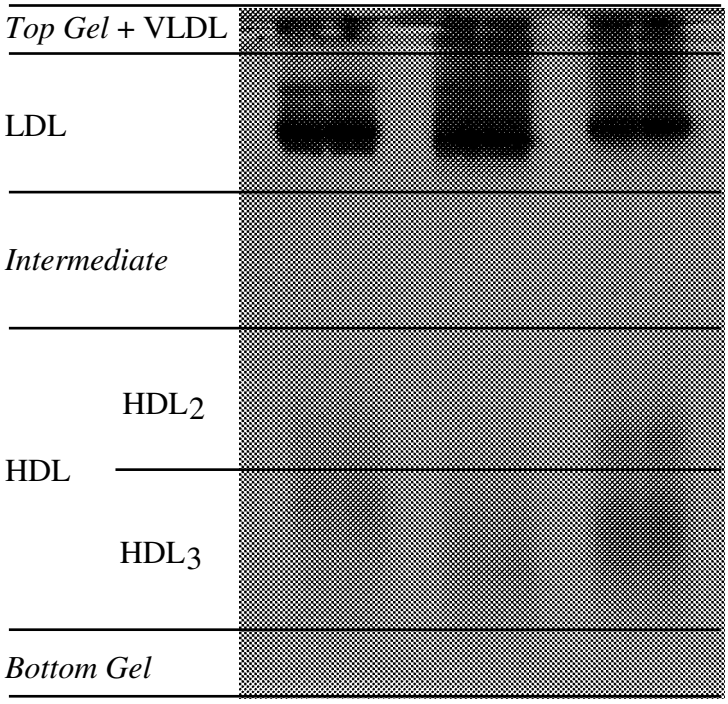


Figure 19: **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration 20-160 g/l de 3 plasmas totaux, après coloration au noir soudan.** Des aliquotes de 10µl de plasma précoloré au noir soudan B sont déposées sur un gel de polyacrylamide en gradient de concentration 20-160 g/l puis soumis à électrophorèse. A l'issue de l'électrophorèse, des portions " *Top Gel* +VLDL", "LDL", "*Intermediate*", "HDL" et "*Bottom Gel*"sont identifiées puis découpées avec une lame de scalpel comme indiqué sur cette figure.

4. Comptage radioactif des fragments de gel.

La radioactivité totale retrouvée dans les fragments de gels de polyacrylamide est mesurée après dissolution de ces derniers en présence d'hypochlorite de sodium (NaOCl) (S.A. Gédé, Lyas Privas 07, France). La dissolution des gels est basée sur la conversion des groupements amides en amines par un traitement par NaOCl d'après la réaction d'Hoffmann (WALLIS et LANE 1948) (figure 18). De façon pratique, les fragments de gels sont mélangés avec 6 ml d'une solution d'hypochlorite de sodium à 12,5% de chlore actif (48° chlorométriques). Les mélanges sont laissés à température ambiante pendant une nuit sous hotte jusqu'à dissolution complète des fragments de gels. Après dissolution complète, l'excès de NaOCl est neutralisé par ajout de 400 µl d'une solution aqueuse d'urée 8 M. Cette réaction étant très exothermique, il est nécessaire d'ajouter l'urée par petites aliquotes de 50 à 100 µl. Enfin, un volume de 12 ml de liquide de scintillation est ajouté à chaque tube, et la radioactivité est mesurée pendant 5 mn dans un compteur à scintillation liquide Wallac 1410 (Pharmacia).

5. Ultracentrifugations.

Dans certaines expériences, les VLDL+LDL plasmatiques sont séparées des autres composants plasmatiques par une ultracentrifugation unique à la densité de 1,063 g/ml.

Les densités sont ajustées par ajout de KBr solide. Les ultracentrifugations se déroulent pendant 16 h à la vitesse de 37 000 rpm (140 000 *g*) dans un rotor 50.4 Ti d'une ultracentrifugeuse Beckman L7-65B. Les fractions contenant les VLDL + LDL ($d < 1{,}063$ g/ml) ou les HDL ($d > 1{,}063$ g/ml) sont récupérées, après découpe des tubes d'ultracentrifugation, dans un volume d'environ 1 ml puis transférées dans des tubes de comptage. Un volume de 2 ml de liquide de scintillation est ensuite ajouté à chaque tube de comptage et la radioactivité est mesurée pendant 5 mn. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale transférée des [^{3}H]CE-HDL$_3$ vers la fraction plasmatique de $d < 1{,}063$ g/ml.

6. Analyses statistiques.

Les résultats expérimentaux sont comparés par analyse de variance à un facteur (ANOVA) et analyse de régression linéaire à l'aide d'un programme informatique.

III. RESULTATS & DISCUSSION.

1. Séparation des lipoprotéines plasmatiques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Comme le montre la figure 19, les trois principales fractions lipoprotéiques : VLDL, LDL et HDL (HDL_2, HDL_3) sont séparées de manière satisfaisante par l'électrophorèse. Les bandes de gels, correspondant à chaque fraction, sont découpées en 5 fractions distinctes: "*top gel* +VLDL", "LDL", "*Intermediate"*, "HDL", et "*bottom gel"*. Les traitements proposés précédemment pour dissoudre les gels de polyacrylamide, par des agents oxydants forts tels que l'acide perchlorique ($HClO_4$), l'acide periodique (H_5IO_6) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (PAUS 1971, SPÄTH et KOBLET 1979, MOORE 1980, GAMBERT *et al.* 1982), se sont avérés inadaptés pour dissoudre les gels de polybisacrylamide utilisés dans cette étude. Par conséquent, nous avons développé une autre méthode consistant à dissoudre les fragments de gels par NaOCl. Par ailleurs, nous avons montré que le volume de NaOCl nécessaire à la dissolution complète des fragments de gels croît linéairement avec le poids sec de polyacrylamide (figure 20). Dans nos conditions expérimentales, le contenu en polyacrylamide des fragments de gels n'excédant pas 90 mg, tous les fragments de gels sont dissous par 6 ml d'une solution de NaOCl à 12,5% de chlore actif.

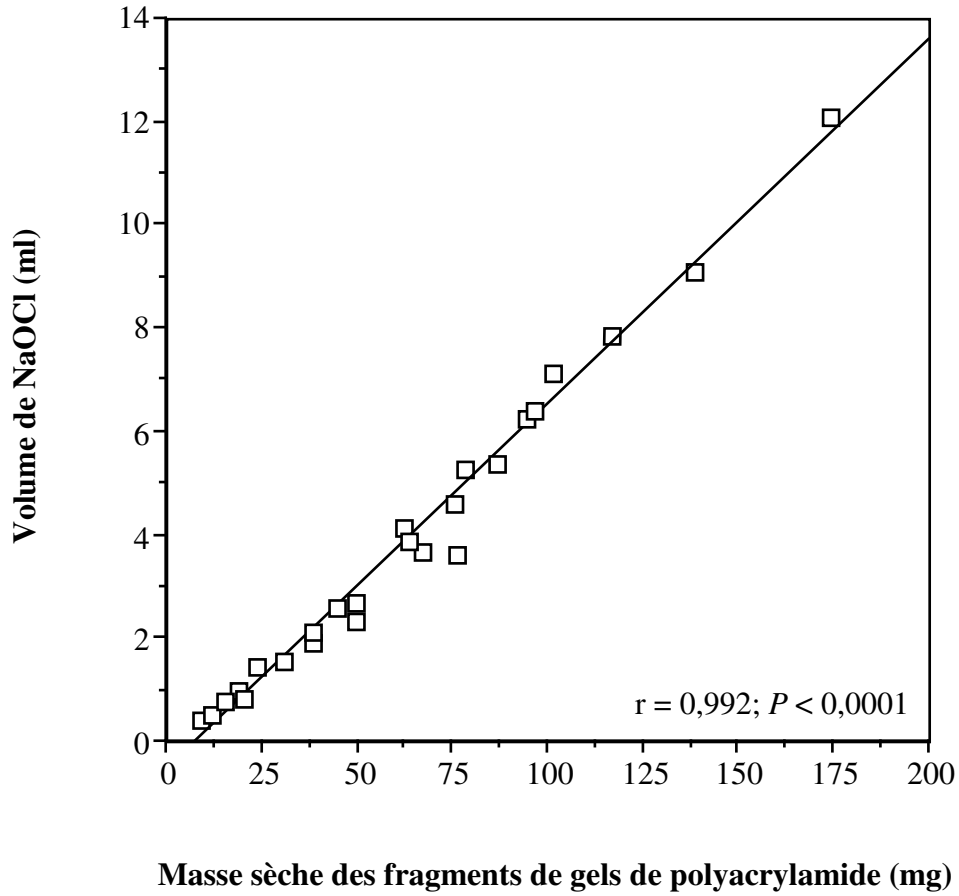


Figure 20: **Détermination de la quantité de NaOCl nécessaire à la dissolution de fragments de gels de polyacrylamides déshydratés de masse variable** . Des fragments de gels de polyacrylamides sont maintenus une nuit à 60°C jusqu'à dessiccation complète. Par la suite, 50µl d'une solution de NaOCl à 12,5% de chlore actif (48° chlorométrique) sont ajoutés de manière progressive jusqu'à dissolution complète des fragments de polyacrylamide.

2. Comptage radioactif des fragments de gels.

Après séparation des différentes classes de lipoprotéines plasmatiques marquées, il est nécessaire de quantifier leur contenu radioactif. MOORE (1980) a mis en évidence que la solubilisation de gels de polyacrylamide par des agents oxydants forts type peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou acide perchlorique ($HClO_4$) était souvent incomplète et conduisait à une diminution artéfactuelle de la radioactivité liée à des phénomènes de chimiluminescence. Afin de déterminer si le NaOCl interférait dans la procédure de comptage radioactif, une aliquote d'une solution de cholestérol radioactif a été ajoutée dans des tubes de comptage contenant 6 ml d'une solution de NaOCl de concentration variant de 0 à 8,5 % de chlore actif. Un volume de 12 ml de liquide de scintillation a été ajouté à chaque tube et la radioactivité a été mesurée pendant 5 mn. Comme le montre la figure 21, NaOCl induit une décroissance progressive dans les comptages radioactifs.
La décroissance de radioactivité observée est fonction de la concentration de la solution de NaOCl ajoutée au milieu. Il est donc nécessaire de neutraliser l'excès de NaOCl, ce qui peut être réalisé par ajout d'un excès d'une solution aqueuse d'urée (0,5 mol/l) aux tubes de comptage avant l'addition de liquide de scintillation (figure 21). Alors que l'urée seule, à une concentration de 0,5 mol/l n'altère pas le comptage de radioactivité, elle est capable de supprimer totalement la diminution du nombre de cpm induite par NaOCl. Dans les expériences ultérieures, les fragments de gels sont dissous dans un volume de 6 ml d'une solution de NaOCl à 12,5 % de chlore actif. Après dissolution, l'excès de NaOCl n'ayant pas réagi avec les groupements amides des gels de polybisacrylamide est neutralisé par ajout de 400 µl d'une solution aqueuse d'urée à 8 mol/l. Dans ces conditions, le rendement moyen, déterminé en comparant la radioactivité retrouvée dans les gels traités par NaOCl avec leur radioactivité totale (connue) est toujours supérieur à 95%.

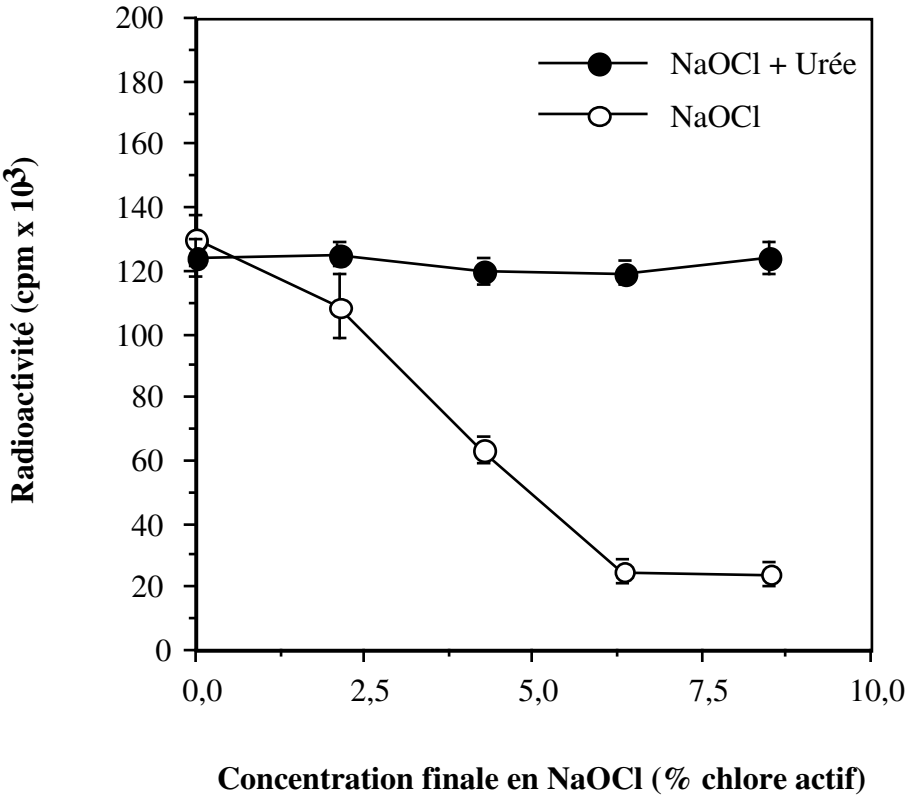


Figure 21: **Effets de NaOCl et de l'urée sur le comptage de radioactivité** . Des volumes constants de cholestérol tritié sont mélangés avec 6ml d'une solution de NaOCl de concentration variant de 0 à 8,5% de chlore actif. Un volume de 0,5ml d'une solution soit de PBS (cercles blancs) soit d'une solution aqueuse d'urée à 8 mol/l (cercles noirs) est ajouté à chaque tube. Après addition de 12ml de liquide de scintillation, la radioactivité totale est mesurée pendant 5mn. Les résultats représentent la moyenne ± écart-type de trois mesures.

3. Transfert de [^{3}H]CE des HDL_3 vers les fractions plasmatiques VLDL et LDL.

A titre d'exemple, la présente méthode électrophorétique a été appliquée à la mesure du taux de transfert d'esters de cholestérol radioactifs des HDL_3 vers les fractions plasmatiques VLDL et LDL.

Une aliquote de 150µl de plasma total est incubée pendant 0, 4 ou 8h à 37°C en présence de HDL_3 radioactives (50 µmol/l de cholestérol) et d'iodoacétate (1,5 mmol/l) dans un volume final de 200 µl. A l'issue de l'incubation, les fractions lipoprotéiques plasmatiques sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration 20-160 g/l. Les fragments de gels ont été découpés comme décrit figure 19 et leur contenu en esters de cholestérol radioactifs a été dosé comme décrit précédemment (figure 18).

Comme le montre le tableau 3-A, lorsque des incubations sont maintenues à 4°C (t = 0), 78,4 ± 2,7 % de la radioactivité totale se trouve localisée dans la bande "HDL". Durant l'incubation du plasma à 37°C, la proportion relative de la radioactivité totale dans la bande "HDL" décroît de manière significative tandis qu'elle augmente significativement dans les bandes "*top gel*+VLDL" et "LDL". Le contenu radioactif des bandes "*intermediate*" et "*bottom gel"* ne varie pas significativement durant l'incubation à 37°C. Dans les incubations témoins maintenues à 4°C, 11,3 ± 1,9 % de la radioactivité totale est retrouvée dans les bandes "*top gel*+VLDL". Cette valeur relativement élevée observée précédemment pourrait s'expliquer par une accumulation, aux points de dépôts, d'une certaine quantité de matériel radioactif lié à des lipoprotéines agrégées qui ne pénétreraient pas dans le gel de polyacrylamide.

Des expériences complémentaires effectuées avec des incubations dépourvues de VLDL indiquent que le contenu radioactif des fractions "top gel+VLDL" ne varie pas de manière significative durant l'incubation à 37°C.

Lorsqu'un volume de lipoprotéines est précoloré avec 0,5 volume de noir soudan B à 5 g/l au lieu de 1 volume, le contenu radioactif de la bande "*top gel* + VLDL" dans les incubations témoin est réduit à 6,4 ± 0,6 % (tableau 3-B) alors que la radioactivité retrouvée dans la fraction HDL augmente de 78,4 ± 2,7 % à 84,5 ± 0,3 %.

Tableau 3: **Transfert de [^{3}H]CE des HDL_3 vers les autres fractions lipoprotéiques plasmatiques.** Tous les mélanges d'incubation contiennent du plasma (150 µl) et des [^{3}H]CE-HDL_3 (10 nmol de cholestérol) dans un volume final de 200µl. Les échantillons sont soit maintenus à 4°C (t = 0) soit incubés pendant 4 ou 8 h à 37°C (t = 4 et t = 8). A l'issue de l'incubation, les échantillons sont précolorés en présence de noir soudan B (1 volume, tableau 3-A; 0,5 volume; tableau 3-B) puis soumis à électrophorèse sur gels de polyacrylamide en gradient. Les gels sont découpés et dissous par NaOCl. Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type de 4 mesures. Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage de différence par rapport aux fragments homologues maintenus à 4°C.

3-A

Fractions Electrophorétiques	Temps d'incubation à 37°C		
	0 h	4 h	8 h
Top Gel + VLDL	11,3 ± 1,9 ***a***	20,6 ± 4,0 ***a*** **(+ 9,3)**	25,0 ± 7,1 ***b*** **(+ 13,7)**
LDL	6,1 ± 0,6 ***a***	19,2 ± 5,3 ***c*** **(+ 13,1)**	33,1 ± 6,2 ***d*** **(+ 27,0)**
Intermediate	2,6 ± 0,4	1,6 ± 0,5	1,35 ± 0,4
HDL	78,4 ± 2,7 ***a***	57,0 ± 9,5 ***c*** **(- 21,4)**	39,2 ± 9,9 ***d*** **(- 39,2)**
Bottom Gel	1,7 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,5

a 4h *vs* 0h, $P < 0,01$; ***b*** 8h *vs* 4h, $P < 0,01$; ***c*** 4h *vs* 0h, $P < 0,001$; ***d*** 8h *vs* 4h, $P < 0,001$

3-B

Fractions Electrophorétiques	Temps d'incubation à 37°C		
	0 h	4 h	8 h
Top Gel + VLDL	6,4 ± 0,6***a***	8,7 ± 0,3 ***a*** **(+ 2,3)**	9,4 ± 0,5 **(+ 3,0)**
LDL	6,6 ± 0,4***a***	21,0 ± 1,5 ***a*** **(+ 14,4)**	29,2 ± 1,2 ***b*** **(+ 32,8)**
Intermediate	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1
HDL	84,5 ± 0,3***a***	67,4 ± 1,4 ***a*** **(- 17,1)**	58,4 ± 1,8 ***b*** **(- 26,1)**
Bottom Gel	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2

a 4h *vs* 0h, $P < 0,001$; ***b*** 8h *vs* 4h, $P < 0,001$.

Cependant dans ces conditions, la localisation des fractions lipoprotéiques faiblement colorées devient plus difficile. Lorsque le taux de transfert des esters de cholestérol est calculé par différence avec les incubations témoins maintenues à 4°C, respectivement 9,3 et 13,1 % du contenu en esters de cholestérol des HDL_3 sont transférés vers les VLDL et LDL après 4h d'incubation à 37°C. Après 8h d'incubation à 37°C, le taux de transfert vers les VLDL et LDL s'élève respectivement à 13,7 et 27,0 %. La différence entre les transferts vers les VLDL et vers les LDL est significative ($P < 0,05$). Ces données indiquent que la proportion relative des esters de cholestérol radioactifs transférés peut différer d'une fraction lipoprotéique plasmatique à une autre. Le taux de radioactivité des fragments de gels dépourvus de lipoprotéines (bandes "*intermediate*" et "*bottom gel*") demeure très faible (moins de 3 % de la radioactivité totale) durant l'incubation à 37°C.

Par conséquent, ces résultats indiquent, comme précédemment décrit (TALL 1986b), que les esters de cholestérol sont transférés spécifiquement des HDL vers les fractions VLDL et LDL.

Lorsqu'une aliquote de 10 µl du milieu d'incubation, contenant une radioactivité totale de 4732 ± 278 dpm, est appliquée sur le gel de polyacrylamide en gradient, la somme de la radioactivité dans les fractions de gel correspondantes est de respectivement 4755 ± 272, 5202 ± 259 et 5079 ± 272 pour les échantillons incubés à 37°C pendant 0, 4 ou 8h.

Ainsi, malgré le transfert d'esters de cholestérol des HDL_3 vers les fractions VLDL et LDL, la totalité de la radioactivité appliquée au gel est retrouvée après séparation électrophorétique des lipoprotéines. La radioactivité totale n'étant pas modifiée après la redistribution des esters de cholestérol radioactifs entre les diverses classes de lipoprotéines, cette technique électrophorétique permet un taux de récupération satisfaisant de chaque classe de lipoprotéines.

Afin de déterminer la précision de la méthode décrite, le taux d'esters de cholestérol radioactifs transférés des HDL_3 vers les fractions VLDL+LDL durant une incubation de 4h à 37°C a été déterminée dans 16 plasmas normolipidémiques après séparation des fractions HDL et VLDL+LDL par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient et par ultracentrifugation (figure 22).

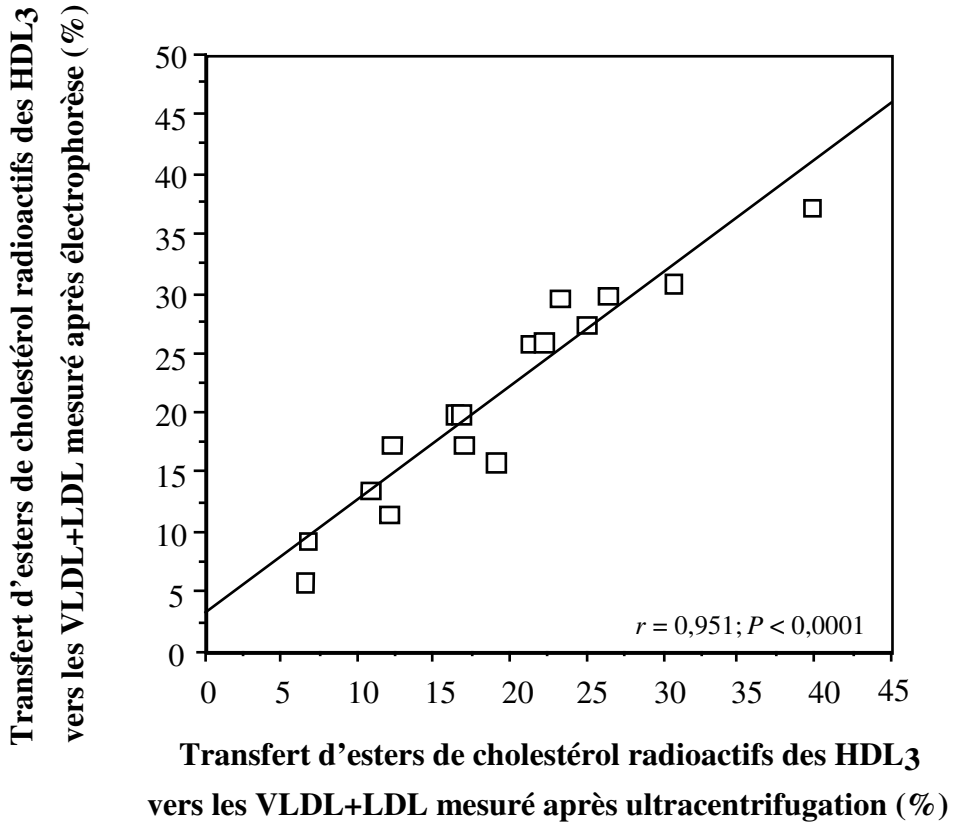


Figure 22: **Corrélations entre le transfert d'esters de cholestérol radioactifs des HDL 3 vers les VLDL+LDL mesuré après séparation des lipoprotéines soit par ultracentrifugation soit par fractionnement sur gels de polyacrylamide en gradient** . Des plasmas de sujets normolipidémiques sont incubés pendant 4 h à 37°C en présence de HDL 3 radioactives (10 nmol de cholestérol) et d'iodoacétate (concentration finale: 1,5 mmol/l) dans un volume final de 200 µl. A l'issue de l'incubation, la radioactivité des fractions VLDL+LDL et HDL séparées soit par une ultracentrifugation unique à la densité de 1,063 g/ml (abcisses) est mesurée, soit par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration 20-160 g/l (ordonnées). Les résultats sont calculés par comparaison avec des incubations témoins maintenues à 4°C et exprimés en pourcentage d'esters de cholestérol radioactifs transférés des HDL vers les fractions plasmatiques VLDL+LDL.

Les mesures faites par électrophorèse ont été réalisées comme décrit précédemment si ce n'est que les fractions "*top gel*+VLDL" et "LDL" ont été combinées. De manière similaire, les fractions plasmatiques VLDL+LDL et HDL ont été séparées des milieux d'incubation, par ultracentrifugation à la densité 1,063 g/ml comme décrit précédemment. Les moyennes (± écart type) des taux de transfert des esters de cholestérol mesurés, sur les 16 plasmas normolipidémiques, soit par ultracentrifugation (19,0 ± 8,8 %) soit par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (21,2 ± 8,8 %) ne diffèrent pas de manière significative ($P < 0{,}001$). En outre, l'analyse de régression linéaire met en évidence une bonne corrélation entre les deux techniques indépendantes ($r \approx 0{,}96 \pm 0{,}01$, $P < 0{,}0001$) (figure 22). Une corrélation significative similaire est également observée dans l'étude réalisée sur des sujets analbuminémiques ($r = 0{,}969$; $P < 0{,}0001$).

4. Transferts de [^{3}H]CE des LDL vers les fractions HDL_2 ou HDL_3.

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences dans la capacité de diverses fractions HDL à accepter des esters de cholestérol, la présente méthode électrophorétique a été appliquée à la mesure du taux d'esters de cholestérol radioactifs transférés des LDL vers les HDL_2 et HDL_3, préalablement isolées à partir de plasma humain.

Pour ce faire, une fraction HDL_2 froide (200 µmol/l de cholestérol) et une fraction HDL_3 froide (200 µmol/l de cholestérol) sont incubées avec des LDL froides (200 µmol/l de cholestérol) et des LDL radioactives (50 µmol/l de cholestérol) pendant 3 h à 4°C ou à 37°C en présence de concentrations croissantes de CETP purifiée dans un volume final de 50 µl. Comme le montre le tableau 4, lorsque les incubations sont maintenues à 4°C, en l'absence ou en présence de CETP purifiée, 84,6 ± 0,8 % de la radioactivité totale est retrouvée dans la bande "*Top gel*+VLDL+LDL". Lors de l'incubation des plasmas à 37°C, la proportion relative de radioactivité dans la bande "*Top gel*+VLDL+LDL" décroît de manière significative alors qu'elle augmente dans les

Tableau 4: **Transfert de [^{3}H]CE des LDL vers les HDL_2 et HDL_3.** Tous les mélanges d'incubation contiennent des fractions HDL_2, HDL_3 et LDL froides (200 µmol/l de cholestérol), des LDL radioactives (50 µmol/l de cholestérol) et de la CETP purifiée (0 à 20 µl), dans un volume final de 50 µl. Les échantillons sont soit maintenus à 4°C (t = 0) soit incubés pendant 3 h à 37°C (t = 3). A l'issue de l'incubation, les échantillons sont soumis à électrophorèse sur gels de polyacrylamide en gradient de concentration et les fragments de gels sont découpés et traités comme décrit précédemment. Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type de 5 mesures. Les valeurs entre parenthèses représentent la différence en pourcentage entre les résultats obtenus après incubation à 37°C et ceux obtenus après incubation à 4°C.

Fractions Electro- -phorétique	Transfert de [^{3}H]CE des LDL vers les HDL_2 et HDL_3 (%)					
	CETP 0 µl		CETP 10 µl		CETP 20 µl	
	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C
Top gel + VLDL + LDL	84,0 ± 2,0	84,6 ± 1,5 **(+ 0,6)**	85,5 ± 0,3	78,0 ± 3,0 [a] **(- 7,5)**	84,4 ± 0,8	68,6 ± 1,2 [b] **(- 15,8)**
HDL_2	7,3 ± 1,1	6,6 ± 0,8 **(- 0,7)**	6,6 ± 0,3	9,4 ± 1,3 [a] **(+ 2,8)**	6,0 ± 0,5	11,6 ± 0,4 [c] **(+ 5,6)**
HDL_3	5,7 ± 0,6	6,0 ± 0,4 **(+ 0,3)**	5,3 ± 0,3	9,4 ± 1,4 [a] **(+ 4,1)**	5,9 ± 0,2	13,1 ±0,7 [b,d] **(+ 7,2)**
Bottom gel	3,0 ± 0,4	2,8 ± 0,4 **(- 0,2)**	2,6 ± 0,2	3,2 ± 0,6 **(+ 0,6)**	3,6 ± 0,3	6,7 ± 0,4 [b] **(+ 3,1)**

[a] 10µl/37°C *vs* 0µl/37°C, $P<0,001$; [b] 20µl/37°C *vs* 10µl/37°C, $P<0,001$; [c] 20µl/37°C *vs* 10µl/37°C, $P<0,01$;
[d] HDL_3/37°C *vs* HDL_2/37°C, $P<0,05$.

fractions "HDL_2" et "HDL_3" ($P < 0,001$). Le taux de radioactivité des fragments de gels dépourvus de lipoprotéines (bande "*bottom gel*") reste très faible (moins de 7 % du total) durant l'incubation de ces mélanges en présence ou en l'absence de CETP purifiée. Par ailleurs, ce transfert d'esters de cholestérol est corrélé positivement avec l'augmentation de la quantité de CETP présente dans le milieu d'incubation. Bien que le transfert d'esters de cholestérol ait lieu à la fois sur la fraction HDL_2 et sur la fraction HDL_3, la radioactivité est transférée préférentiellement sur la fraction HDL_3 ($P < 0,05$). On note par ailleurs, une augmentation significative ($P < 0,001$) du transfert d'esters de cholestérol radioactifs dans la fraction "*bottom gel*" lors de l'incubation à 37°C en présence de 20 µl de CETP purifiée. Il a été démontré (BARTER *et al.* 1990c, LAGROST *et al.* 1990, LAGROST 1992b) que durant l'incubation à 37°C, la CETP entraînait une redistribution en taille des HDL_3 (8,5 nm de diamètre) en générant des particules de diamètre inférieur (7,4 et 7,8 nm) et des particules de diamètre surpérieur (9,4 nm de diamètre). Ainsi, cette augmentation significative dans la fraction "*bottom gel*" pourrait s'expliquer par la formation de faibles quantités de particules de petit diamètre durant l'incubation en présence de CETP.

5. Transferts de [^{3}H]CE soit des HDL_2 soit des HDL_3 vers les fractions VLDL+LDL plasmatiques.

Afin de déterminer l'influence de la structure et de la composition des traceurs lipoprotéiques marqués sur le taux de transfert des esters de cholestérol, l'activité CETP a été mesurée sur 14 plasmas normolipidémiques soit en présence de [^{3}H]CE-HDL_2 soit de [^{3}H]CE-HDL_3 (figure 23). Le taux de transfert des esters de cholestérol est significativement plus élevé lorsqu'il est mesuré à partir de HDL_3 qu'à partir de HDL_2 (respectivement 24,0 ± 6,8 % et 7,1 ± 2,6 %, $P < 0,001$). Cette observation confirme que des variations de la composition lipidique (MORTON et ZILVERSMIT 1983, EISENBERG 1985, SPARKS et PRITCHARD 1989a, FIELDING *et al.* 1984, MORTON 1988a) et apolipoprotéique (SON et ZILVERSMIT 1984, NISHIDA *et al.* 1990, MILNER *et al.*

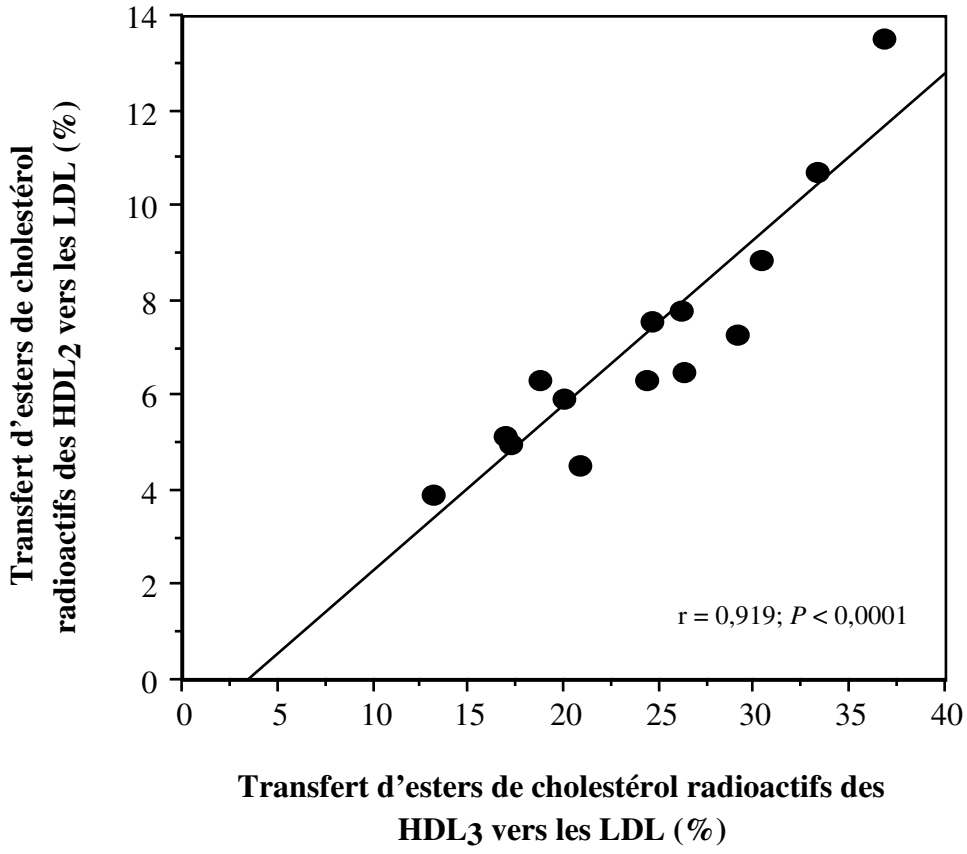


Figure 23: **Correlation entre le transfert d'esters de cholestérol radioactifs à partir soit de HDL 2 soit de HDL 3 mesuré par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient**. 14 plasmas sont incubés pendant 4h à 37°C en présence soit de HDL 2 radioactives soit de HDL 3 radioactives (10 nmol de cholestérol) et d'iodoacétate (1,5 mmol/l) dans un volume final de 200 µl. A l'issue de l'incubation, les lipoprotéines plasmatiques sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient. Le taux d'esters de cholestérol transférés est calculé en comparaison avec des témoins non incubés, maintenus à 4°C et exprimé en pourcentage de la quantité d'esters de cholestérol transférés soit des HDL 2 (ordonnées) soit des HDL3 (abcisses) vers la fraction LDL plasmatique.

1991, KINOSHITA *et al.* 1993, GUYARD-DANGREMONT 1994b, LAGROST *et al.* 1994C, MASSON *et al.* 1996) des substrats lipoprotéiques peuvent influencer la réaction de transfert des esters de cholestérol. Cependant, l'analyse de régression linéaire met en évidence une corrélation significative entre le taux d'esters de cholestérol radioactifs transférés d'une part des [^{3}H]CE-HDL$_2$ vers les VLDL+LDL et d'autre part des [^{3}H]CE-HDL$_3$ vers les VLDL+LDL ($r = 0,919$, $P < 0,0001$) (Figure 23). Ces résultats indiquent donc qu'une fraction lipoprotéique HDL donnée constitue un substrat approprié pour l'évaluation relative de l'activité CETP dans divers échantillons plasmatiques.

6. Transferts de [^{3}H]CE des HDL$_3$ vers les fractions plasmatiques VLDL+LDL de patients analbuminémiques.

Afin de déterminer la répartition préférentielle des esters de cholestérol soit au sein d'un plasma total normolipidémique soit d'un plasma analbuminémique, des plasmas de ces deux types de sujets ont été incubés pendant 3h à 37°C en présence d'une dose traceuse de [^{3}H]CE-HDL$_3$ puis séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient. Comme le montre la figure 24, 88,8 ± 1,8 % de la radioactivité sont retrouvés au niveau la fraction HDL dans les plasmas témoins maintenues à 4°C. Lors de l'incubation à 37°C, on note une faible redistribution, non significative, de la radioactivité sur la fraction VLDL que ce soit chez les analbuminémiques (15,6 ± 4,3 %) ou chez les témoins (9,8 ± 1,8 %) en comparaison avec les incubations témoins maintenues à 4°C (8,3 ± 1,4 %). A l'opposé une augmentation significative ($P = 0,036$) du transfert d'esters de cholestérol radioactifs est observée vers la fraction LDL chez les patients analbuminémiques (40,5 ± 8,1 %). Dans la fraction LDL des sujets témoins, la radioactivité, bien qu'augmentée (14,6 ± 4,5 %) n'est pas significativement différente de la fraction homologue maintenue à 4°C (2,87 ± 0,6 %).

Comme il a été montré au chapitre précédent, les patients analbuminémiques présentent, par rapport aux témoins, une répartition préférentielle de leurs acides gras non estérifiés au niveau des lipoprotéines (71,7 ± 14,8 % *vs* < 10 %) et principalement

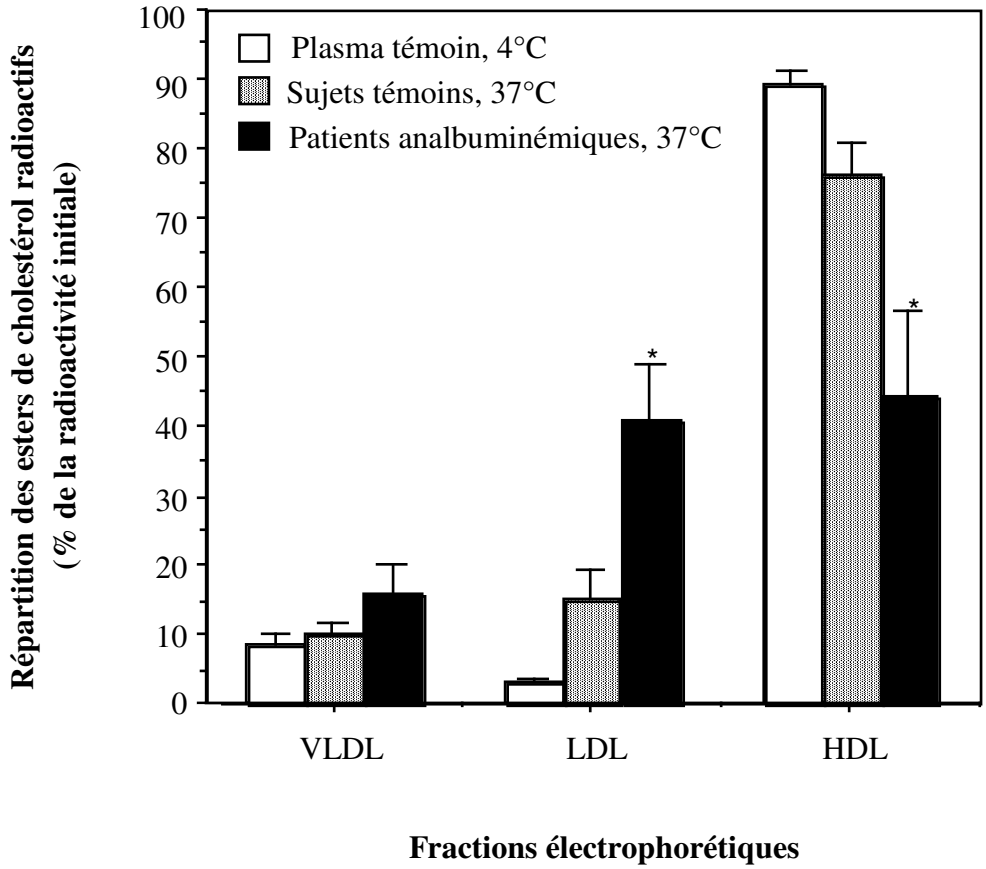


Figure 24: **Distribution des esters de cholestérol radioactifs des HDL vers la fraction lipoprotéique à apoB dans le plasma de patients analbuminémiques et de sujets témoins** . Des plasmas totaux sont incubés pendant 3h à 37°C en présence d'une dose traceuse de HDL 3 radiomarquées. Les lipoprotéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient. Les fragments de gels contenant les fractions lipoprotéiques sont dissouts et le contenu radioactif est mesuré comme décrit dans la section "Matériel et Méthodes". Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité initiale retrouvée dans chaque fraction. Les valeurs représentent la moyenne ± écart type des résultats obtenus chez trois patients analbuminémiques et cinq sujets témoins.

* $P = 0.036$ *vs* sujets témoins.

au niveau de leurs LDL (33,9 ± 4,3 % *vs* 3,2 ± 2,3 %). Ainsi, on peut envisager que de fortes concentrations de molécules chargées négativement présentes à la surface des LDL puissent faciliter l'interaction de la CETP avec ces substrats lipoprotéiques augmentant par là même l'activité de transfert des lipides neutres sur ces fractions. En d'autres termes, la concentration élevée en acides gras non estérifiés au niveau des LDL serait à même d'expliquer une interaction préférentielle de la CETP avec ces lipoprotéines et une redistribution majoritaire des esters de cholestérol vers cette fraction.

IV. CONCLUSION.

Comparée aux méthodes classiques d'ultracentrifugation séquentielle, ou de précipitation, la technique mise au point au cours de ce travail, en alliant les possibilités de séparation des lipoprotéines sériques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la précision du comptage de scintillation en milieu liquide, a permis de quantifier de manière plus complète le taux de transfert d'esters de cholestérol radioactifs à partir d'un traceur lipoprotéique marqué (LDL, HDL_2 ou HDL_3) vers divers substrats lipoprotéiques accepteurs. Nous avons pu montrer qu'il n'y avait pas de modification de la radioactivité totale à l'issue de l'électrophorèse autorisant par là même une récupération satisfaisante (supérieure à 95%) des diverses fractions lipoprotéiques permettant une évaluation précise du transfert d'esters de cholestérol sur les diverses fractions lipoprotéiques.

Compte tenu de l'approche plus globale des réactions de transfert d'esters de cholestérol qu'autorise ce dosage, nous avons appliqué cette technique de mesure à des sérums de patients analbuminémiques. Chez ces derniers nous avons pu observer une redistribution préférentielle de la radioactivité au niveau de la fraction LDL plasmatique. Compte-tenu de la forte concentration en acides gras non estérifiés présents dans cette fraction on peut imaginer que chez ces sujets, la CETP a une affinité augmentée pour les LDL, au détriment des VLDL, conduisant à une redistribution préférentielle des esters

de cholestérol radioactifs sur la fraction LDL plasmatique. En d'autres termes, chez les patients analbuminémiques, les LDL, qui présentent une électronégativité augmentée par rapport à des sujets témoins, seraient de meilleurs accepteurs dans la réaction de transfert des esters de cholestérol. Cette observation confirme le rôle potentiel des acides gras non estérifiés en tant que modulateur de l'activité de transfert des esters de cholestérol.

Cependant, cette technique ne permet pas d'évaluer de façon totalement satisfaisante les transferts d'esters de cholestérol marqués lorsque ceux-ci ont lieu en direction d'une fraction (froide) homologue à la fraction donneuse (radiomarquée). En d'autres termes, lorsque l'activité de transfert est mesurée à partir de [^{3}H]CE-HDL_3 vers les autres fractions lipoprotéiques plasmatiques, on ne peut mesurer à l'issue de l'incubation qu'une perte de radioactivité sur la fraction HDL_3 et non pas une redistribution réelle de radioactivité sur cette même fraction. Une technique dérivée de la présente méthode et de celle de SPARKS *et al*. (1987), en cours de mise au point, consistant à fixer le substrat lipoprotéique donneur marqué sur sur un support d'affinité, tel que des billes de CNBr-Sépharose, éliminé avant l'électrophorèse, permettrait de mesurer de manière encore plus fine les transferts d'esters de cholestérol tritiés sur l'ensemble des fractions lipoprotéiques plasmatiques, y compris sur les fractions homologues à la fraction marquée de départ.

En conclusion, le comptage de radioactivité des fragments de gels de polyacrylamide en gradient en milieu liquide fournit une méthode aisée et précise pour déterminer le taux d'esters de cholestérol transférés entre plusieurs fractions lipoprotéiques tel qu'il se produit dans le plasma total. Cette méthode pourrait également constituer un outil intéressant pour étudier l'échange d'autres composants lipoprotéiques entre les substrats lipoprotéiques de tailles différentes.

TROISIEME PARTIE

REGULATION DE L'ACTIVITE CETP PAR DES DERIVES CARBOXYLES : EFFETS DE L'ACIDE RETINOIQUE.

cf. Annexe 5:

Modulation of the activity of the human cholesteryl ester transfer protein by carboxylated derivatives. Evidence for 13-*cis* retinoic acid as a potent regulator of the protein's activity in plasma.

FLORENTIN, E., ATHIAS, A. & LAGROST, L.

Eur. J. Biochem. **240**, 699-706 (1996)

I. INTRODUCTION

Dans cette étude, nous avons mesuré la capacité de l'acide 13-*cis* rétinoïque, un rétinoïde synthétique utilisé dans les traitements d'acnés sévères, mais également d'autres dermatoses (PECK *et al.* 1979, JONES *et al.* 1980, LYONS *et al.* 1982b), à moduler *in vitro* l'activité de transfert des esters de cholestérol.

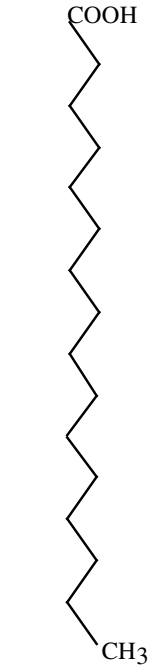
De nombreux travaux (DICKEN et CONNALLY 1980, KATZ *et al.* 1980, GOLLNICK *et al.* 1981, LYONS *et al.* 1982a, ZECH *et al.* 1983, MARSDEN *et al.* 1984, BERSHAD *et al.* 1985, VAHLQUIST *et al.* 1985, FEX *et al.* 1996) ont mis en évidence que les traitements par l'acide 13-*cis* rétinoïque (isotrétinoïne ou roaccutane®) étaient susceptibles d'induire des modifications du profil lipoprotéique. Les lipoprotéines de ces patients présentent, durant leur traitement, un profil de type "athérogène", et plus particulièrement une augmentation du rapport d'athérogénicité :

(VLDL + LDL)~Cholestérol / (HDL~Cholestérol)

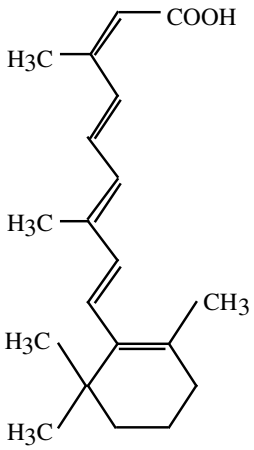
Il a par ailleurs été montré, dans de nombreuses autres conditions physio-pathologiques (HA *et al.* 1985, QUIG et ZILVERSMIT 1986, AGELLON *et al.* 1991, MANN *et al.* 1991, LAGROST *et al.* 1993, LAGROST *et al.* 1995, BRASCHI *et al.* 1996), que de telles altérations du profil lipoprotéique pouvaient s'expliquer par une augmentation de l'activité CETP plasmatique.

L'acide 13-*cis* rétinoïque présentant les caractéristiques principales des acides gras non estérifiés (figure 25), qui ont été démontrés comme étant des activateurs de la CETP (LAGROST 1994a), il est de ce fait envisageable que non seulement les acides gras non estérifiés, mais également d'autres composés présentant des structures similaires, et en particulier des groupements carboxyliques ionisés, puissent réguler le mécanisme de transfert des lipides et induire de telles modifications du profil lipoprotéique.

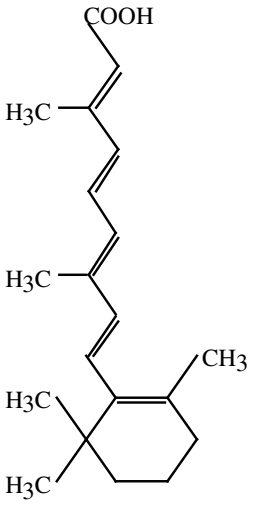
De ce fait, nous avons comparé la capacité de l'acide palmitique (l'un des meilleurs activateurs de la CETP parmi les acides gras non estérifiés) (LAGROST et BARTER 1991b) et de l'acide 13-*cis* rétinoïque à moduler l'activité de transfert des esters de cholestérol, que ce soit dans des mélanges de lipoprotéines ou dans un plasma humain total.



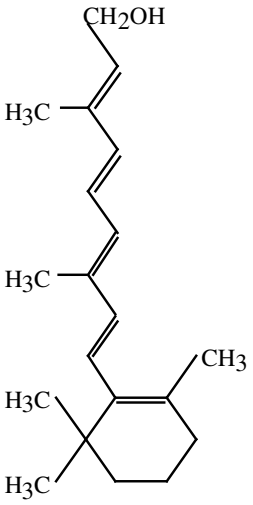
acide palmitique



acide 13-*cis* rétinoïque



acide tout-*trans* rétinoïque



tout-*trans* rétinol

Figure 25 : **Structure des dérivés carboxylés étudiés.** Les divers composés présentent des homologies structurelles. Les acides palmitique et rétinoïque possèdent une chaîne carbonée hydrophobe terminée par une fonction carboxylique ionisable. Le rétinol présente également une chaîne carbonée, mais la fonction carboxylique est remplacée par un groupement alcool.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Séparation du plasma.

Du sang de sujets normolipidémiques est prélevé, après une nuit de jeûne, dans des tubes contenant de l'EDTA-Na_2. Les plasmas sont séparés rapidement par une centrifugation de 15 mn à 3 000 rpm dans une centrifugeuse Jouan, puis placés immédiatement à 4°C.

2. Activité de transfert des esters de cholestérol.

Cette activité est évaluée en mesurant le transfert d'esters de cholestérol radioactifs à partir de [^{3}H]CE-HDL_3 donneuses vers des lipoprotéines acceptrices contenant l'apoB comme décrit précédemment (TOLLEFSON *et al.* 1988, LAGROST *et al.* 1994c).

2.1. Mesure d'activité entre lipoprotéines isolées.

Des milieux d'incubation sont reconstitués en mélangeant des [^{3}H]CE-HDL_3 (2,5 nmol de cholestérol), des LDL (10 nmol de cholestérol) et de la CETP purifiée (4,5 µg). Un volume de 1 µl d'une solution éthanolique des composés à étudier (acides palmitique, 13-*cis* rétinoïque, tout-*trans* rétinoïque ou rétinol) est ajouté au milieu d'incubation, à une concentration finale variant de 0 à 100 µmol/l, dans un volume final de 50 µl. Les incubations sont réalisées dans un tampon PBS, pH 7,4. Compte-tenu de la dégradation potentielle des rétinoïdes par photoisomérisation (MCCLEAN *et al.* 1982), les acides 13-*cis* rétinoïque, tout-*trans* rétinoïque et le rétinol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) sont conservés à -20°C dans des tubes scellés sous atmosphère d'azote à l'obscurité et les expériences sont conduites à l'abri de la lumière. Dans certaines expériences, de l'albumine humaine dépourvue d'acides gras (contenu en acides gras <

0,005 %) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) est ajoutée au milieu d'incubation à une concentration finale variant de 0 à 10 g/l. Dans d'autres séries d'expériences, l'activité de transfert des esters de cholestérol est mesurée pour différents rapports cholestérol LDL / [^{3}H]CE-HDL$_3$ (soit 10 / 2,5 soit 6,25 / 6,25 nmol / nmol).

A l'issue d'une incubation de 3 h à 37°C, les tubes sont immédiatement centrifugés pendant 1 mn sur centrifugeuse Eppendorf, afin de recueillir l'eau de condensation. Une aliquote de 45 µl des mélanges réactionnels est ensuite ajoutée à 2 ml d'une solution de KBr de densité d = 1,07 g/ml dans des tubes d'ultracentrifugation Beckman Quickseal. Les tubes sont ensuite soumis à ultracentrifugation durant 16 h à la vitesse de 40 000 rpm (172 000 g) dans un rotor 50.4 Ti d'une ultracentrifugeuse L7-65B Beckman. Les fractions de densité $d < 1{,}068$ g/ml et $d > 1{,}068$ g/ml sont ensuite recueillies dans un volume de 1 ml environ après découpe des tubes d'ultracentrifugation et transférés dans des tubes de comptage. Un volume de 2 ml de liquide de scintillation (OptiPhase "HiSafe" 3, LKB Scintillation Products, FSA Laboratories Supplies, Loughbourough, Leics, Angleterre) est ajouté à chaque tube et la radioactivité est mesurée pendant 5 mn dans un compteur à scintillation liquide Pharmacia Wallac 1410.

2.2. Mesure d'activité dans un plasma total.

Dans ce cas, l'activité de transfert est mesurée dans des mélanges reconstitués contenant 18 µl de plasma humain normolipidémique (CT : 2,30 g/l; TG : 1,2 g/l), et une dose traceuse de [^{3}H]CE-HDL$_3$ (2,5 nmol de cholestérol). Un volume de 1 µl d'une solution éthanolique des dérivés carboxylés à étudier (acides palmitique ou 13-*cis* rétinoïque) est ajouté au milieu d'incubation, à une concentration finale variant de 0 à 700 µmol/l, dans un volume final de 50 µl. L'activité de la lecithine:cholesterol acyltransferase (LCAT) plasmatique est bloquée par ajout d'acide iodoacétique (concentration finale: 1,5 mmol/l). Les incubations sont réalisées dans un tampon PBS, pH 7,4 pendant 3 h à 37°C. A l'issue de l'incubation, les lipoprotéines sont séparées et la radioactivité est mesurée comme décrit précédemment.

3. Analyses statistiques.

La comparaison des valeurs moyennes est effectuée en utilisant une analyse de variance à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett ou Newman-Keuls (KIRK 1982). Les coefficients de corrélation (*r*) sont calculés par analyse de régression.

III. RESULTATS

1. Effets comparatifs des différents dérivés carboxylés sur le transfert de [^{3}H]CE des HDL_3 vers des LDL isolées.

Des HDL_3 radiomarquées ([^{3}H]CE-HDL_3), des LDL et de la CETP purifiée ont été incubées pendant 3 h à 37°C en présence soit d'acides 13-*cis* rétinoïque, tout-*trans* rétinoïque ou palmitique, soit de rétinol (gamme de concentration : 0 à 100 µmol/l).

Comme le montre la figure 26, tous les dérivés carboxylés entraînent une augmentation, concentration-dépendante, du transfert d'esters de cholestérol radioactifs des [^{3}H]CE-HDL_3 vers les LDL.

A l'opposé des dérivés carboxylés, le rétinol n'affecte que très peu la réaction de transfert des lipides neutres. Toutefois, à la plus forte concentration étudiée (100 µmol/l) (Figure 26) l'augmentation de transfert devient significative ($P < 0,01$).

L'acide 13-*cis* rétinoïque, à des concentrations de 60, 80, ou 100 µmol/l, s'avère être le meilleur activateur de la CETP parmi les dérivés carboxylés étudiés et notamment supérieur à l'acide palmitique qui avait été montré comme étant le meilleur activateur de la CETP parmi les acides gras saturés (LAGROST et BARTER 1991b) ($P < 0,01$ dans tous les cas).

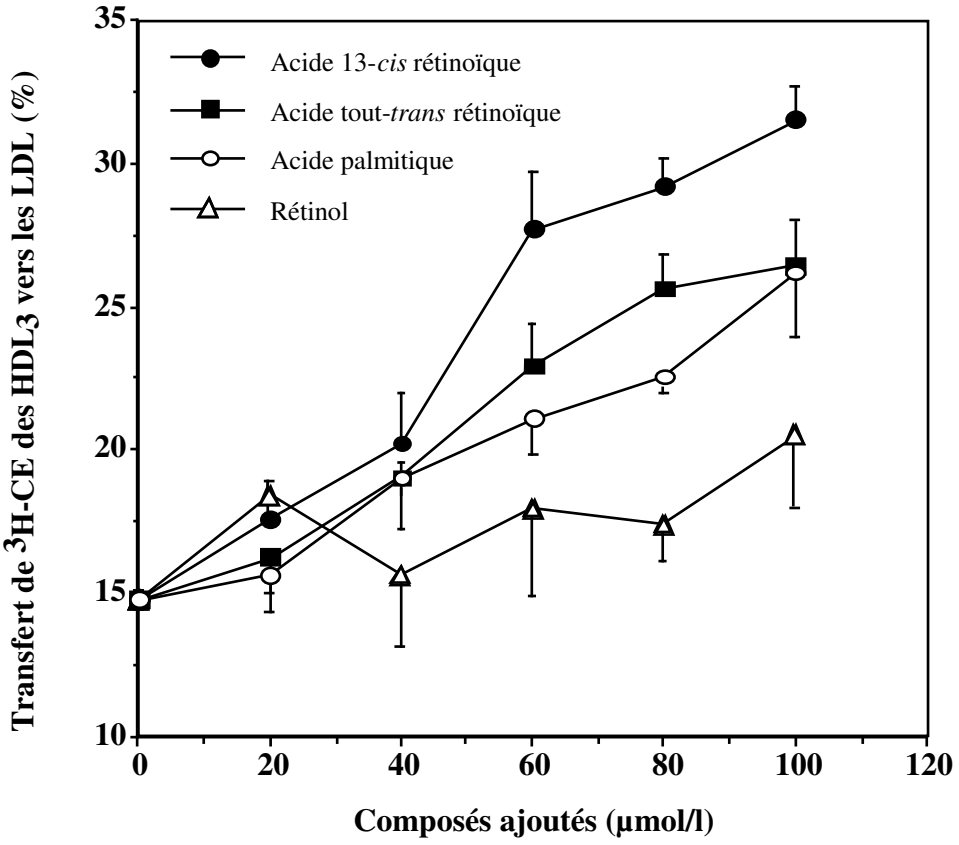


Figure 26 : **Effets des acides 13-*cis* rétinoïque, tout-*trans* rétinoïque, palmitique et du rétinol sur le transfert de [^{3}H]CE des HDL$_3$ vers les LDL.** Chaque incubation contient des HDL$_3$ radioactives (2,5 nmol de cholestérol), des LDL (10 nmol de cholestérol), de la CETP purifiée (4,5 µg) et soit des acides 13-*cis* rétinoïque, tout-*trans* rétinoïque, palmitique ou du rétinol (concentration finale: 0 à 100 µmol/l) dans un volume final de 50µl. Les échantillons sont incubés pendant 3h à 37°C puis soumis à ultracentrifugation à la densité 1,068 g/ml. Le taux de transfert est exprimé en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans la fraction de $d < 1,068$ g/ml. Chaque point représente la moyenne ± écart-type de trois mesures.

2. Influence du rapport cholestérol LDL / cholestérol HDL_3 sur l'effet activateur de l'acide 13-*cis* rétinoïque.

Afin de déterminer si la modification du rapport LDL / [^{3}H]CE-HDL_3 cholestérol peut influencer l'effet activateur de l'acide 13-*cis* rétinoïque, des substrats lipoprotéiques ont été ajoutés au milieu d'incubation à des rapports en cholestérol variant de 1 à 4.

Comme le montre la figure 27, le taux de transfert des esters de cholestérol des [^{3}H]CE-HDL_3 vers les LDL est significativement plus important lorsque le rapport en cholestérol LDL / [^{3}H]CE-HDL_3 augmente de 1 à 4. Néanmoins, dans les deux cas, l'acide 13-*cis* rétinoïque augmente de façon concentration-dépendante le transfert d'esters de cholestérol des HDL_3 vers les LDL.

3. Effet comparatif des acides 13-*cis* rétinoïque et palmitique sur l'activité de transfert des esters de cholestérol dans le plasma humain total.

Un plasma total normolipidémique (CT : 2,30 g/l; TG : 1,2 g/l) a été incubé pendant 3 h à 37°C en présence de concentrations croissantes soit d'acide 13-*cis* rétinoïque soit d'acide palmitique (gamme de concentrations : 0 à 700 µmol/l). Comme le montre la figure 28, l'acide 13-*cis* rétinoïque entraîne une stimulation, concentration-dépendante, du transfert d'esters de cholestérol radioactifs des HDL_3 vers les fractions lipoprotéiques plasmatiques VLDL + LDL.

A l'opposé, et dans des conditions expérimentales similaires, l'activité plasmatique de transfert d'esters de cholestérol n'est pas modifiée significativement en présence d'acide palmitique (figure 28).

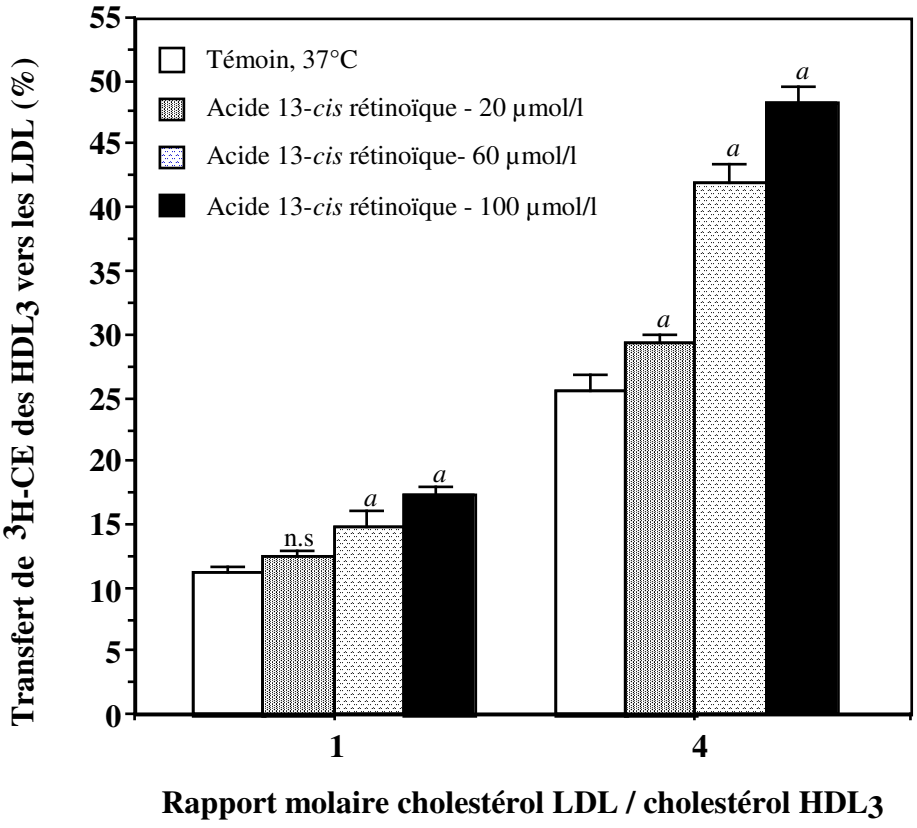


Figure 27 : **Influence de la variation du rapport LDL/[^{3}H]CE-HDL3 sur la modulation de l'activité CETP sous l'influence de l'acide 13-** ***cis*** **rétinoïque.** Les mélanges d'incubation contiennent de la CETP purifiée (4,5 µg), des [^{3}H]CE-HDL3, des LDL et de l'acide 13- *cis* rétinoïque (concentrations de 20 à 100µmol/l) dans un volume final de 50µl. Le rapport molaire en cholestérol LDL/[^{3}H]CE-HDL3 est de 1 (LDL-C: 6,25 nmol; HDL 3-C: 6,25 nmol) ou 4 (LDL-C: 10,0 nmol; HDL3-C: 2,5 nmol). Les échantillons sont incubés pendant 3h à 37°C puis soumis à ultracentrifugation à la densité de 1,068 g/ml. Le taux de transfert est exprimé en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans la fraction de $d < 1,068$ g/ml. Chaque point représente la moyenne ± écart-type de trois expériences.
(***n.s.*** non significatif; ***a*** significativement différent du témoin ($P < 0,01$)).

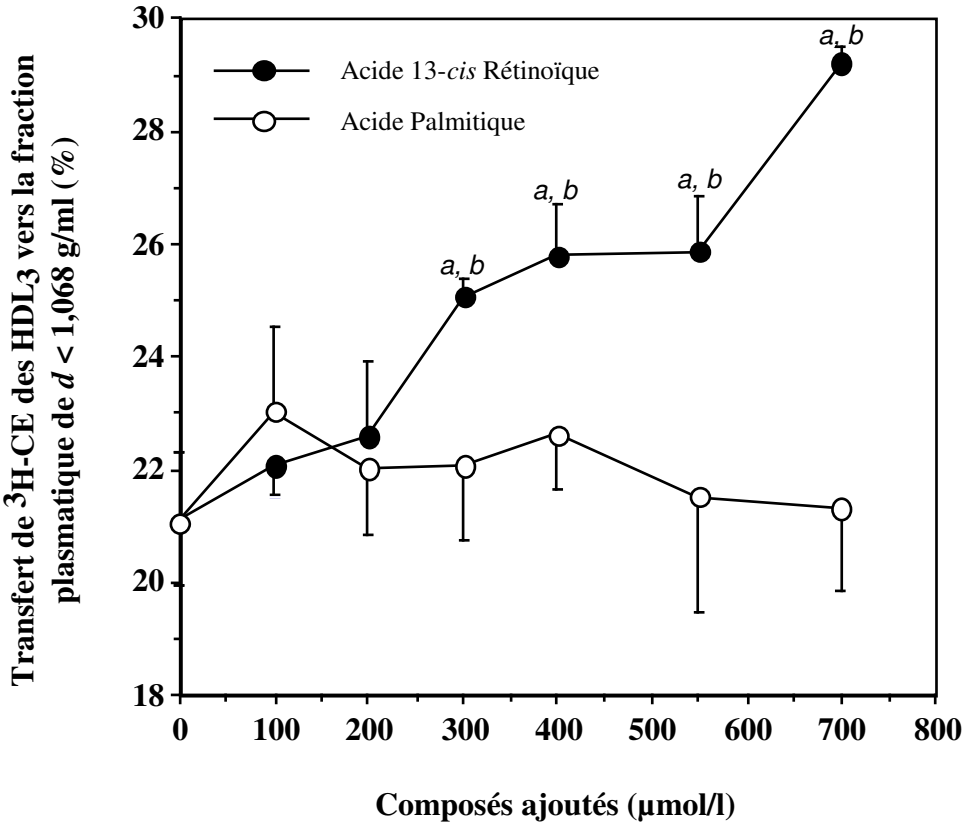


Figure 28 : **Effets des acides 13-*cis* rétinoïque et palmitique sur le transfert de ^{3}H-CE des HDL 3 vers la fraction plasmatique de *d* < 1,068 g/ml.** Chaque mélange d'incubation contient des HDL 3 radioactives (2,5 nmol de cholestérol), 18µl de plasma humain normolipidémique (CT: 2,30 g/l; TG: 1,2 g/l), de l'iodoacétate (concentration finale: 1,5 mmol/l) et soit de l'acide 13-cis rétinoïque soit de l'acide palmitique (concentration finale: 0-700 µmol/l) dans un volume final de 50µl. Les échantillons sont incubés pendant 3h à 37°C puis soumis à ultracentrifugation à la densité 1,068 g/ml. Chaque point représente la moyenne ± écart-type de trois mesures.

a significativement différent du mélange témoin non supplémenté ($P < 0,01$)

b significativement différent des mélanges homologues contenant de l'acide palmitique ($P < 0,005$).

4. Effets de l'albumine dépourvue d'acides gras sur le transfert de [^{3}H]CE des HDL_3 vers les LDL induit par les acides palmitique ou 13-*cis* rétinoïque.

Afin de déterminer si l'albumine peut modifier les capacités de l'acide 13-*cis* rétinoïque et de l'acide palmitique à activer le transfert d'esters de cholestérol, une nouvelle expérience a été réalisée.

Le transfert d'esters de cholestérol, des [^{3}H]CE-HDL_3 (concentration en cholestérol : 50 mmol/l) vers les LDL (concentration en cholestérol : 200 mmol/l), a été mesuré dans un plasma humain total en présence soit d'acide 13-*cis* rétinoïque soit d'acide palmitique à une concentration finale de 100 µmol/l. Des concentrations croissantes (0 à 10 g/l) d'albumine dépourvue d'acides gras (teneur en acides gras inférieure à 0,005 %) ont également été ajoutées au milieu d'incubation. Comme le montre la figure 29, en l'absence d'albumine, le taux de transfert d'esters de cholestérol est significativement plus élevé en présence d'acide 13-*cis* rétinoïque (41,6 ± 1,6 %) et d'acide palmitique (38,6 ± 1,5 %) que dans les incubations témoin dépourvues de dérivés carboxylés (13,9 ± 0,7 %) ($P < 0,01$ dans tous les cas).

L'ajout d'albumine entraîne une diminution, concentration-dépendante, de la susceptibilité des acides 13-*cis* rétinoïque et palmitique à activer le transfert d'esters de cholestérol. Lorsque l'albumine, à une concentration de 4 g/l, est ajoutée aux incubations contenant de l'acide palmitique, le taux de transfert des esters de cholestérol est ramené à une valeur de base non significativement différente de celle mesurée dans l'incubation témoin (16,1 ± 1,0 % *vs* 13,9 ± 0,7 % respectivement; *n.s.*). Il est à noter que l'albumine diminue de manière moins efficace le transfert d'esters de cholestérol induit par l'acide 13-*cis* rétinoïque que celui induit par l'acide palmitique. En effet, alors que l'albumine à une concentration de 2 g/l diminue significativement le taux de transfert de 38,6 ± 1,5 % à 17,9 ± 2,0 % dans les incubations contenant de l'acide palmitique, elle ne diminue pas significativement le taux de transfert dans les incubations contenant de l'acide 13-*cis* rétinoïque (41,6 ± 1,6 % sans albumine *vs* 36,3 ± 2,5 % en présence d'albumine à 2 g/l, *n.s.*). De plus, à la concentration maximale en albumine étudiée (10 g/l), l'effet stimulant de l'acide 13-*cis* rétinoïque n'a pas totalement été supprimé et le taux de transfert des

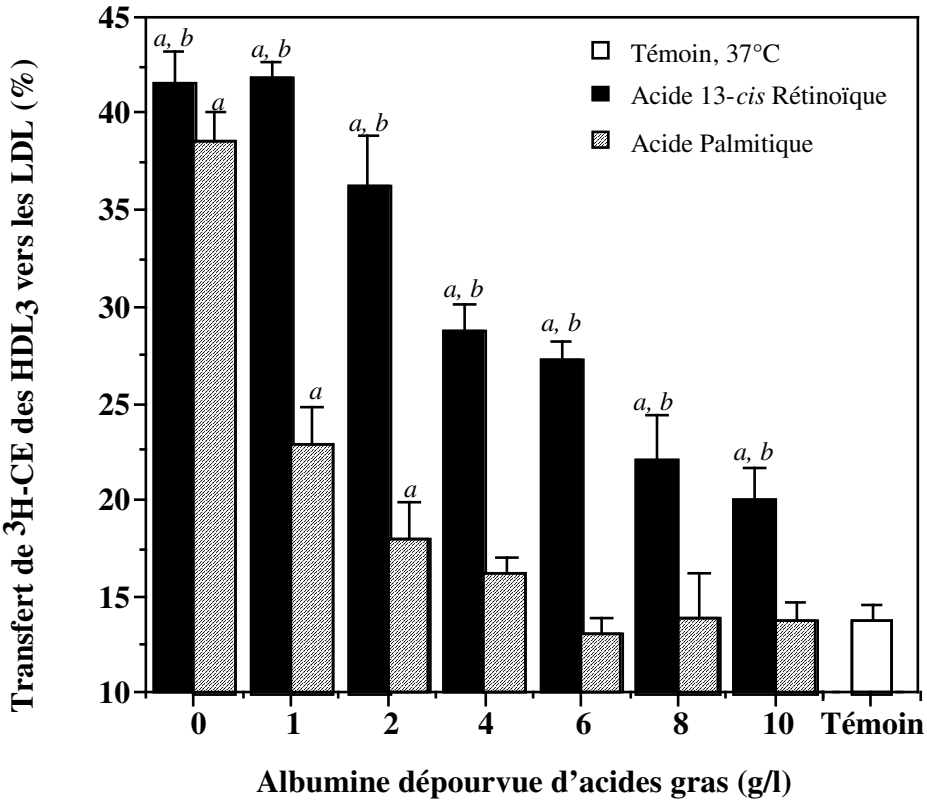


Figure 29: **Effets de l'albumine dépourvue d'acides gras sur la capacité des acides 13-*cis* rétinoïque et palmitique à modifier le transfert d'esters de cholestérol des [^{3}H]CE-HDL$_3$ vers les LDL.** Les incubations contiennent des HDL 3 marquées (2,5 nmol de cholestérol), des LDL (10 nmol de cholestérol), de la CETP purifiée (4,5 µg) et soit de l'acide 13-*cis* rétinoïque soit de l'acide palmitique (concentration finale: 0 à 100 µM). Le mélange est incubé 3h à 37°C en présence de concentrations variables d'albumine humaine dépourvue en acides gras (gamme de concentration: 0 à 10 g/l) dans un volume final de 50µl. A la fin de l'incubation, les échantillons sont soumis ultracentrifugation à *d* 1,068 g/ml. Le taux de transfert est exprimé en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans la fraction de *d* < 1,068 g/ml. Chaque point représente la moyenne ± écart-type de quatre expériences. (***a*** significativement différent des témoins incubés dépourvus de CETP ($P<0,01$); ***b*** significativement différent des échantillons homologues supplémentés en acide palmitique ($P<0,005$)).

esters de cholestérol dans les incubations contenant de l'acide 13-*cis* rétinoïque demeure significativement plus élevé que dans les incubations témoins (20,0 ± 1,4 % *vs* 13,9 ± 0,7 %, respectivement; $P < 0,01$). Quelles que soient les concentrations en albumine étudiées, et dans des conditions similaires, l'activité de transfert induite par l'acide 13-*cis* rétinoïque demeure très supérieure à celle mesurée en présence d'acide palmitique ($P < 0,005$ pour toutes les incubations supplémentées en albumine dans une gamme de concentration de 1 à 10 g/l) (figure 29).

5. Effet comparatif de l'acide palmitique et de l'acide 13-*cis* rétinoïque sur la mobilité électrophorétique des LDL et HDL_3.

Des expériences complémentaires ont été mises en oeuvre afin de déterminer si l'acide palmitique et l'acide 13-*cis* rétinoïque étaient susceptibles d'influencer l'électronégativité des substrats lipoprotéiques dans diverses conditions expérimentales. Pour ce faire, un plasma humain total a été incubé pendant 3h à 37°C en présence de concentrations croissantes (0 à 700 µmol/l) soit d'acide palmitique, soit d'acide 13-*cis* rétinoïque. L'effet de ces dérivés carboxylés sur la mobilité électrophorétique des particules LDL et HDL a été déterminé en utilisant des gels préformés d'agarose (figures 30 et 31), comme décrit précédemment.

Comme le montrent les figures 30 à 32, l'addition d'acide 13-*cis* rétinoïque à un plasma humain total augmente la migration électrophorétique à la fois des LDL et des HDL plasmatiques de façon concentration dépendante.

A l'opposé de l'acide 13-*cis* rétinoïque l'addition à un plasma humain d'acide palmitique, à diverses concentrations, ne modifie pas significativement la mobilité électrophorétique des LDL et des HDL à l'exception des plus fortes concentrations étudiées (700 µmol/l) qui semblent augmenter la distance de migration des HDL plasmatiques (figures 30-32).

Lorsque des fractions LDL et HDL_3 isolées sont incubées en présence de concentrations croissantes soit d'acide 13-*cis* rétinoïque soit d'acide palmitique (dans une

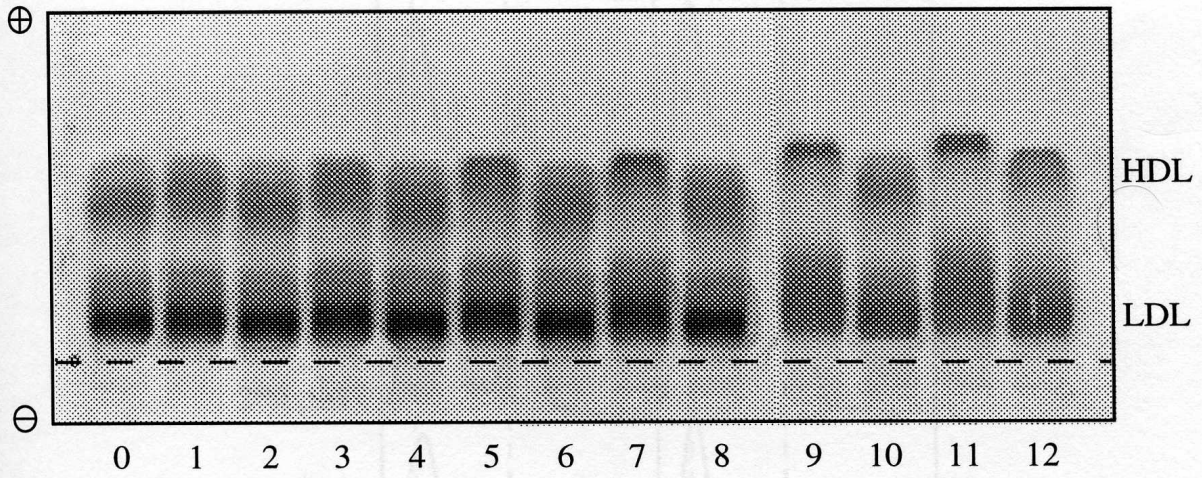


Figure 30: **Effets comparatif des acides 13-*cis* rétinoïque et palmitique sur la mobilité électrophorétique de fractions LDL et HDL plasmatiques.** Un plasma humain normolipidémique est incubé en l'absence de dérivés carboxylés (0) ou en présence soit d'acide 13-*cis* rétinoïque (1, 3, 5, 7, 9, 11) soit d'acide palmitique (2, 4, 6, 8, 10, 12) à des concentrations finales de 100 (1, 2); 200 (3, 4); 300 (5, 6); 400 (7, 8); 550 (9, 10) ou 700µM (11, 12). A l'issue de 3h d'incubation à 37°C, les échantillons sont soumis à électrophorèse sur gel d'agarose puis le gel est soumis à une analyse d'image (figure 31). Sur ce graphique: (+) représente l'anode; (-) la cathode et les pointillés indiquent les puits de dépôt des échantillons.

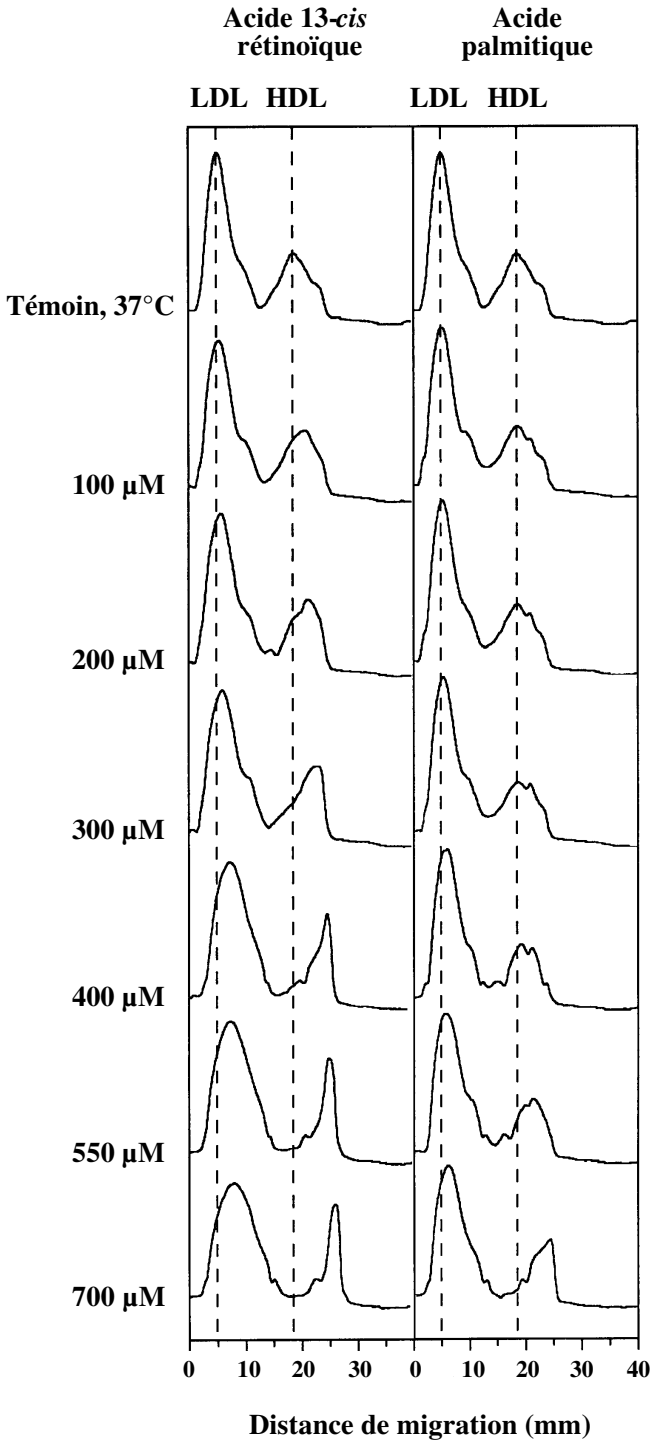


Figure 31 : **Profils électrophorétiques des fractions LDL et HDL après incubation en présence d'acide 13-*cis* rétinoïque ou plamitique.** Un plasma humain normolipidémique est incubé en présence soit d'acide 13- *cis* rétinoïque soit d'acide palmitique à des concentrations finales variant de 0 à 700µmol/l. A l'issue de 3h d'incubation à 37°C, les échantillons sont soumis à électrophorèse sur gel d'agarose (figure 30) puis analysés grâce à un analyseur d'image Bio-Rad GS-670.

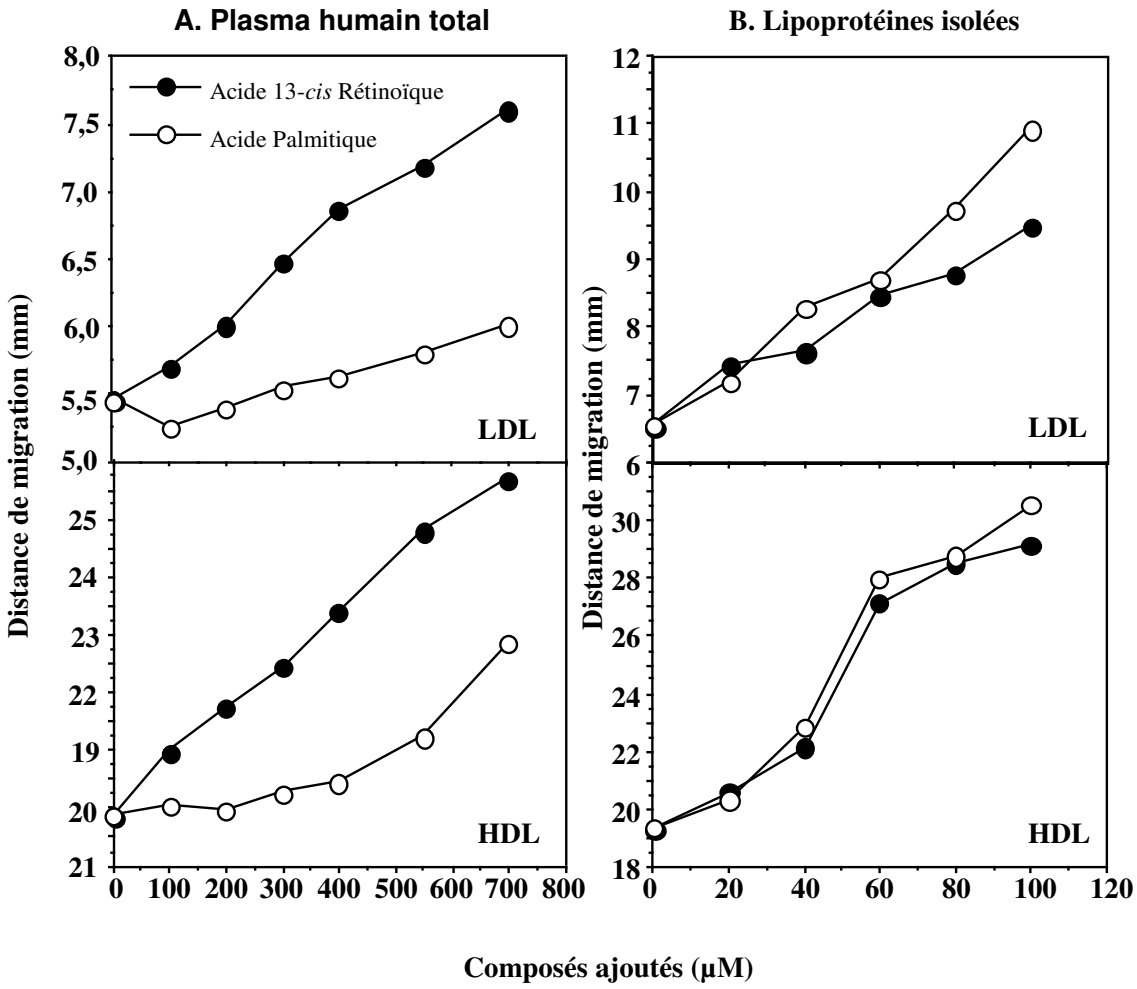


Figure 32 : **Effets comparatifs de l'acide 13-** ***cis*** **rétinoïque et de l'acide palmitique sur la mobilité électrophorétique des LDL et HDL.** Les mélanges d'incubation contiennent soit un plasma humain normolipidémique (A) soit des lipoprotéines isolées [LDL: 10 nmol de cholestérol; HDL 3: 2,5 nmol de cholestérol] et de la CETP purifiée (4,5 µg)] (B), dans un volume final de 50µl. Les mélanges d'incubation contenant du plasma humain (A) sont supplémentés avec des concentrations croissantes (0-700 µM) soit d'acide 13- *cis* rétinoïque soit d'acide palmitique. Les mélanges d'incubation contenant des lipoprotéines isolées et de la CETP (B) sont supplémentés avec des concentrations croissantes (0-100 µM) soit d'acide 13- *cis* rétinoïque soit d'acide palmitique. Après 3h d'incubation à 37°C, les échantillons sont soumises à électrophorèse sur gel d'agarose (figure 30) et la distance de migration des LDL et HDL est mesurée par analyse d'image (figure 31).

gamme de concentration variant de 0 à 100 µmol/l), un déplacement progressif des LDL et des HDL est observé en direction de l'anode (figure 31). Ce déplacement indique que l'acide palmitique et l'acide 13-*cis* rétinoïque induisent une augmentation progressive du nombre de charges électronégatives à la surface des lipoprotéines.

L'acide palmitique et l'acide 13-*cis* rétinoïque semblent augmenter de manière similaire les distances de migration des fractions lipoprotéiques isolées. Cependant, la plus faible augmentation de mobilité électrophorétique des lipoprotéines observée dans le plasma total en présence d'acide palmitique, comparativement à l'acide 13-*cis* rétinoïque, pourrait être expliquée par une distribution plasmatique différente de ces deux dérivés plutôt que par des différences de charges électronégatives qu'ils induisent.

Comme le montre la figure 33, une corrélation positive significative a été observée entre d'une part l'activité CETP plasmatique et d'autre part la distance de migration à la fois des LDL ($r = 0,98$, $P = 0,0002$) et des HDL ($r = 0,98$, $P = 0,0008$) dans le plasma contenant l'acide 13-*cis* rétinoïque mais pas dans les plasmas supplémentés en acide palmitique. A l'opposé des observations faites dans le plasma total, l'acide 13-*cis* rétinoïque et l'acide palmitique induisent tous deux une corrélation positive entre d'une part l'activité CETP plasmatique et d'autre part la distance de migration des LDL et des HDL dans les incubations reconstituées (figure 33).

IV. DISCUSSION.

Les réactions d'échange des lipides neutres entre les substrats lipoprotéiques sont des procédés complexes faisant intervenir une succession d'événements (LAGROST 1994a). Bien que les différentes étapes de la réaction de transfert des lipides ne soient pas encore clairement identifiées, il est maintenant généralement admis que la liaison entre la CETP et les lipoprotéines constitue une étape préliminaire et limitante (LAGROST 1994a). Cette liaison, de nature électrostatique, implique des interactions entre des groupements chargés positivement (résidus Lys_{233} et Arg_{259}) (JIANG *et al.* 1995) présents à la surface de la CETP et des groupements chargés négativement

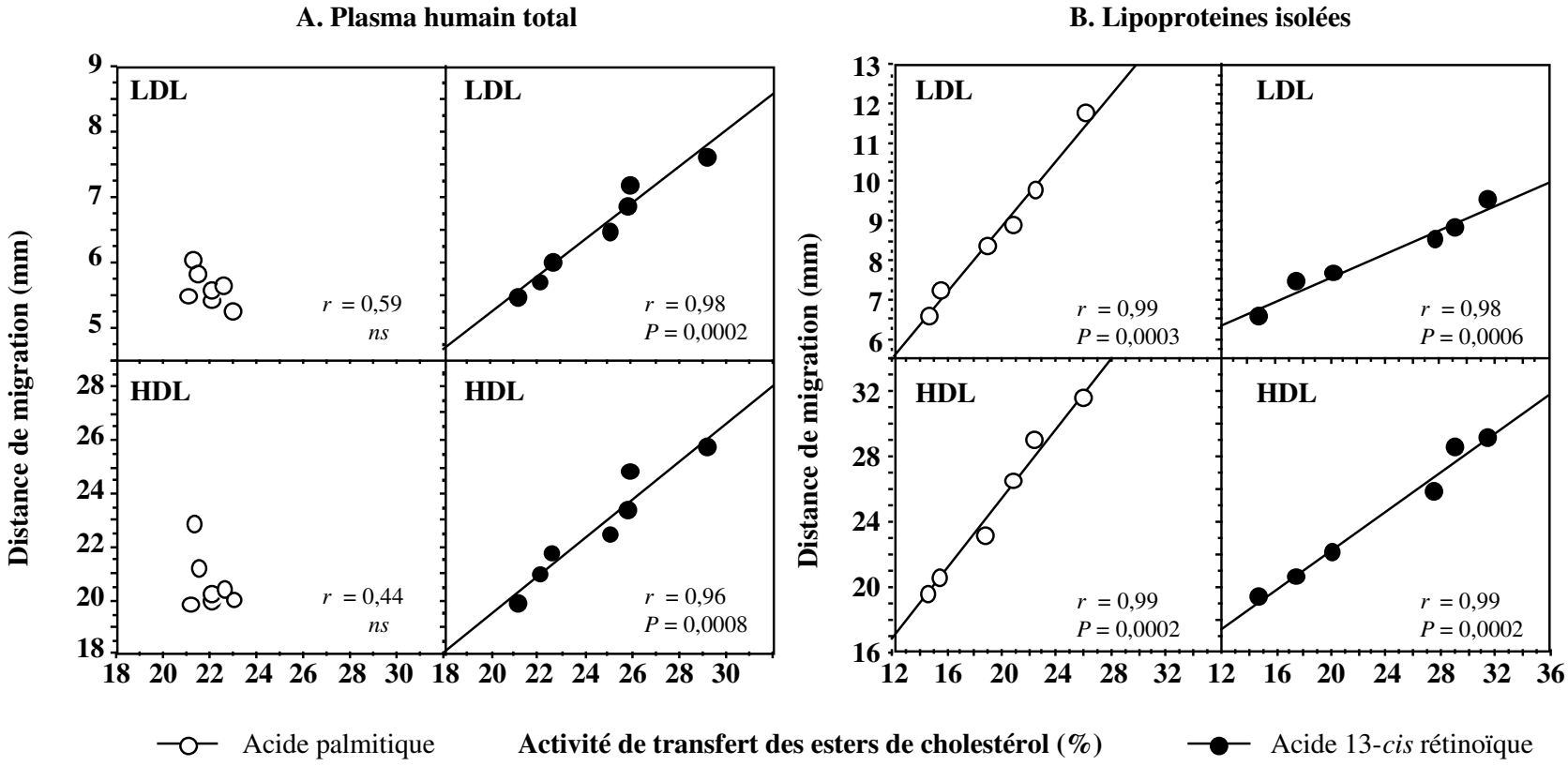


Figure 33 : **Corrélation entre l'activité de transfert et la migration électrophorétique des LDL et HDL** . Les mélanges d'incubation contiennent soit un plasma humain normolipidémique, de l'iodoacétate (1,5 mM), et une dose traceuse de [^{3}H]CE-HDL$_3$ (2.5 nmol de cholestérol) (A), soit des lipoprotéines isolées (LDL, 10 nmol de cholestérol; [^{3}H]CE-HDL$_3$ (2.5 nmol de cholestérol)) et de la CETP purifiée (B) dans un volume final de 50µl. Les mélanges d'incubation contenant du plasma humain total (A) sont supplémentés avec des concentrations croissantes (0-700 µmol/l) soit d'acide 13- *cis* rétinoïque soit d'acide palmitique. Les mélanges d'incubation contenant les lipoprotéines isolées et la CETP purifiée (B) sont supplémentés avec ces même dérivés à des concentrations variant de 0 à 100 µmol/l. A l'issue de 3h d'incubation à 37°C, le pourcentage de [^{3}H]CE transférés vers la fraction de $d < 1,068$ g/ml ainsi que la distance de migration en gel d'agarose des fractions LDL et HDL sont déterminés comme décrit dans la section "matériels et méthodes".

(groupement phosphate des phospholipides, groupement carboxylique des acides gras non estérifiés ou charge négative des molécules d'apolipoprotéine) présents à la surface de la lipoprotéine (PATTNAIK et ZILVERSMIT 1979, SAMMETT et TALL 1985, KATO *et al.* 1989, NISHIDA *et al.* 1993, WANG *et al.* 1995, MASSON *et al.* 1996).

En se fondant sur des études précédentes réalisées avec des acides gras non estérifiés, nous avons supposé que des molécules similaires, constituées d'un groupement carboxylique ionisé et d'une chaîne carbonée hydrophobe pouvaient être des activateurs potentiels de la réaction de transfert des lipides neutres. Cette hypothèse nous a permis de montrer que l'acide rétinoïque, un dérivé carboxylé utilisé dans le traitement des acnés sévères et d'autres dermatoses (PECK *et al.* 1979, JONES *et al.* 1980, LYONS *et al.* 1982) ou bien encore dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes de type 3 (LAM_3) (TOHDA *et al.* 1992, SAKASHITA *et al.* 1993, NOTARIO *et al.* 1996, TALLMAN 1996), constituait un nouvel activateur puissant de la CETP.

Dans cette étude, nous avons comparé les capacités de l'acide palmitique (un des activateurs les plus puissants de la CETP parmi les acides gras non estérifiés), de l'acide 13-*cis* rétinoïque, de l'acide tout-*trans* rétinoïque et du rétinol à moduler l'activité de transfert des esters de cholestérol radioactifs entre des HDL et des lipoprotéines contenant l'apoB. Ces divers composés présentent entre eux des homologies structurelles. Ainsi, les acides rétinoïque (isomères *cis* ou *trans*) et palmitique sont constitués d'une chaîne carbonée hydrophobe terminée par un groupement carboxylique ionisable. Le rétinol, homologue de l'acide tout-*trans* rétinoïque, présente une fonction alcool à la place du groupement carboxylique.

Nos résultats montrent que les dérivés carboxylés étudiés (acides rétinoïques et palmitique) induisent une augmentation, concentration-dépendante, de l'activité de transfert des esters de cholestérol alors que le rétinol n'affecte que faiblement cette dernière. On peut donc en déduire, et ce en accord avec des études précédentes (PATTNAIK et ZILVERSMIT 1979, SAMMET et TALL 1985), que la présence de groupements carboxyliques, chargés négativement, peut être responsable en partie des variations de l'activité de transfert des lipides neutres. De fait, l'addition soit d'acide palmitique soit d'acide 13-*cis* rétinoïque à des fractions lipoprotéiques isolées (HDL_3 et LDL) entraîne une augmentation de leur migration électrophorétique en direction de

l'anode sur gel d'agarose. Une corrélation positive significative est observée entre les distances de migration des substrats lipoprotéiques et l'activité CETP que ce soit en présence d'acide palmitique ou d'acide 13-*cis* rétinoïque. A l'opposé, dans un plasma total, seul l'acide 13-*cis* rétinoïque est capable d'induire une corrélation positive entre la distance de migration électrophorétique des substrats lipoprotéiques et l'activité CETP plasmatique. La charge des composés carboxylés ainsi que la structure de leur chaîne carbonée semblent être déterminantes dans la capacité de ces molécules à moduler l'activité CETP. En effet, des différences significatives ont pu être observées entre les acides palmitique, 13-*cis* rétinoïque et tout-*trans* rétinoïque. Ces observations sont en accord avec des résultats, précédemment obtenus au laboratoire, qui avaient montré que la modification de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras non estérifiés, mais également leur degré d'insaturation (LAGROST et BARTER 1991a-b), ou bien encore la configuration *cis* ou *trans* de leur double liaison (LAGROST 1992a), constituaient des facteurs importants de régulation de l'activité CETP. En fait, il semble que les variations d'activité observées avec les différents composés (acides palmitique, 13-*cis* rétinoïque et tout-*trans* rétinoïque) puissent être expliquées par des modifications structurelles, induites par ces derniers, à la surface des lipoprotéines (FOUCHER *et al.* 1996). La structure de la chaîne carbonée des acides gras pourrait ainsi modifier la fluidité des lipoprotéines.

Il est intéressant de noter que l'acide 13-*cis* rétinoïque augmente l'activité CETP non seulement dans des milieux d'incubation reconstitués, contenant des particules lipoprotéiques isolées, mais également dans un plasma humain. On peut toutefois remarquer qu'une concentration en acide 13-*cis* rétinoïque dix fois supérieure à celle utilisée dans les mélanges reconstitués est nécessaire pour observer cette augmentation d'activité dans le plasma humain total. Au moins deux raisons peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. 1°/ La concentration en lipoprotéines (concentration finale en cholestérol : 0,25 mmol/l) dans le milieu d'incubation contenant des lipoprotéines isolées est très nettement inférieure à celle retrouvée dans les milieux d'incubation contenant du plasma total (concentration finale en cholestérol : 2,15 mmol/l); 2°/ Contrairement aux incubations contenant des lipoprotéines isolées et de la CETP purifiée, le plasma total contient l'albumine qui est susceptible de modifier

la distribution plasmatique de l'acide 13-*cis* rétinoïque. Par ailleurs, l'acide palmitique, contrairement à l'acide 13-*cis* rétinoïque, ne modifie pas significativement l'activité de transfert lorsqu'il est ajouté à des milieux d'incubation contenant du plasma humain total. Cette différence peut s'expliquer par la capacité qu'a l'albumine à déplacer les acides gras non estérifiés de la surface des lipoprotéines (SAMMET et TALL 1985, BARTER *et al.* 1990b, LAGROST et BARTER 1991b). Bien que l'acide palmitique et l'acide 13-*cis* rétinoïque augmentent la distance de migration de lipoprotéines isolées de manière similaire, l'acide palmitique ne modifie pratiquement pas cette distance de migration dans un plasma total.

Il a été clairement démontré que l'albumine, en captant les acides gras non estérifiés à la surface des lipoprotéines (SHAFRIR 1958), pouvait supprimer leur capacité à augmenter l'interaction de la CETP avec les substrats lipoprotéiques (SAMMET et TALL 1985, BARTER *et al.* 1990b, LAGROST et BARTER 1991). En se fondant sur des observations faites en présence d'acides gras non estérifiés (LAGROST et BARTER 1991b, LAGROST 1992a), on peut supposer que la capacité différente de l'acide palmitique et l'acide 13-*cis* rétinoïque à augmenter l'activité de transfert des esters de cholestérol au niveau plasmatique puisse s'expliquer par une affinité différente de ces deux composés vis-à-vis de l'albumine et des lipoprotéines. Dans cette étude, nous avons montré que l'albumine dépourvue d'acides gras, réduisait de manière significativement plus importante l'activité de transfert induite par l'acide palmitique que celle induite par l'acide 13-*cis* rétinoïque dans des conditions expérimentales similaires. Ces observations sont en accord avec d'autres études qui ont démontré que dans le plasma humain, les acides gras non estérifiés sont majoritairement transportés par l'albumine alors que seule une fraction minoritaire est liée aux lipoprotéines (SHAFRIR 1958, SPECTOR 1975). Au contraire, ZECH *et al.* (1981) ont démontré que plus de 75% de l'acide 13-*cis* rétinoïque et d'autres analogues, contrairement aux acides gras non estérifiés, sont associés aux fractions VLDL et LDL. Plus récemment URIEN *et al.* (1994) ont confirmé que l'acide 13-*cis* rétinoïque présente une haute affinité à la fois pour l'albumine et les lipoprotéines.

Bien que les données de cette étude suggèrent qu'une augmentation du contenu en acide rétinoïque au niveau des lipoprotéines, chez des patients traités par isotrétinoïne,

puisse induire secondairement des modifications de l'activité CETP plasmatique, la signification de ces observations, réalisées *in vitro*, demeure incertaine d'un point de vue physiopathologique. En effet, une augmentation de l'activité de transfert a pu être observée dans le plasma total à des concentrations en acide 13-*cis* rétinoïque supérieures à celles retrouvées dans le plasma de patients traités par isotrétinoïne (ROLLMAN et VAHLQUIST 1986).

Cependant plusieurs arguments nous permettent de penser que les acides rétinoïques peuvent, *in vivo*, induire des modifications de l'activité de transfert. 1°/ Il a été clairement démontré que des patients sous isotrétinoïne présentent, durant leur traitement, une altération du profil lipoprotéique et en particulier une augmentation du rapport d'athérogénécité (VLDL + LDL)~Cholestérol / (HDL~Cholestérol) (KATZ *et al.* 1980, DICKEN *et al.* 1980, GOLLNICK *et al.* 1981, LYONS *et al.* 1982, ZECH *et al.* 1983, MARSDEN *et al.* 1984, BERSHAD *et al.* 1985, VAHLQUIST *et al.* 1985, FEX *et al.* 1996), lequel est, dans de nombreuses conditions physiopathologiques, associé à une augmentation de l'activité CETP plasmatique (HA *et al.* 1985, QUIG et ZILVERSMIT 1986, AGELLON *et al.* 1991, MANN *et al.* 1991, LAGROST *et al.* 1993, LAGROST *et al.* 1995, BRASCHI *et al.* 1996). 2°/ En préambule à des études cliniques en développement, des dosages réalisés par HPLC, au sein du laboratoire, chez un patient traité par isotrétinoïne en comparaison d'un sujet témoin, ont montré que les acides 13-*cis* rétinoïque et tout-*trans* rétinoïque sont retrouvés majoritairement associé à la fraction lipoprotéique plasmatique de $d < 1{,}21$ mg/l alors que les acides gras non estérifiés sont quant à eux retrouvés associés à la fraction protéique de $d > 1{,}21$ g/ml. On sait par ailleurs que, dans le plasma humain total, les acides gras non estérifiés peuvent réguler l'activité CETP (LAGROST *et al.* 1995, BRASCHI *et al.* 1996). Il nous paraît de ce fait tout à fait envisageable de penser que l'acide 13-*cis* rétinoïque, lié aux lipoprotéines, puisse de manière identique augmenter l'activité CETP plasmatique chez des patients traités par isotrétinoïne et ce compte tenu d'une part de ses homologies structurelles avec les acides gras non estérifiés et d'autre part de sa capacité similaire à augmenter l'électronégativité des lipoprotéines comme nous l'avons démontré dans nos études *in vitro*. 3°/ Il a été montré chez 18 patients sous isotrétinoïne un abaissement significatif ($P < 0{,}02$) de leur concentration en albumine plasmatique (LYONS *et al.* 1982). On peut

ainsi imaginer que cette diminution de la concentration plasmatique en albumine (de 48,9 ± 0,7 à 46,6 ± 0,5 g/l) puisse induire dans un premier temps une redistribution des acides rétinoïques de l'albumine vers la fraction lipoprotéique tout comme nous l'avons mis en évidence, pour les acides gras non estérifiés, chez des patients analbuminémiques ou atteints de syndrome néphrotique. Ces acides rétinoïques induiraient secondairement une augmentation de l'électronégativité des lipoprotéines, d'où une interaction accrue avec la CETP.

L'ensemble de ces données nous permettent de considérer que les modifications du profil lipoprotéique, observées chez des patients traités par isotrétinoïne, résultent d'une augmentation de l'activité CETP plasmatique sous l'influence des acides rétinoïques.

Des études cliniques, que nous souhaitons mettre en oeuvre très prochainement, devraient nous permettre de confirmer ces hypothèses et de démontrer *in vivo* l'effet des acides rétinoïques sur l'activité CETP plasmatique.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Durant ces dernières années, de nombreuses études se sont attachée à mettre en évidence le rôle des acides gras non estérifiés, *in vitro*, sur l'activité de transfert des lipides neutres et à comprendre leur mécanisme d'action.

Or peu d'équipes s'étaient posé la question de savoir si ces mêmes acides gras non estérifiés pouvaient, *in vivo*, induire des variations de l'activité de transfert, vraisemblablement parce que, dans ces conditions, ces molécules sont majoritairement liées à l'albumine. De ce fait, il paraissait fort peu probable que la faible fraction liée aux lipoprotéines puisse influencer l'activité CETP plasmatique. Nos études nous ont permis de mettre en évidence, chez des sujets normolipidémiques, l'existence d'une corrélation significative entre le taux d'acides gras non estérifiés, liés aux lipoprotéines, et l'activité de transfert des esters de cholestérol. Cette corrélation est renforcée dans des situations physiopathologiques liées à une hypoalbuminémie (analbuminémie et syndrome néphrotique) impliquant une redistribution des acides gras non estérifiés de l'albumine vers les lipoprotéines. Cette redistribution est bien mise en évidence par des techniques d'électrophorèse sur gel d'agarose qui montrent nettement une augmentation de la charge électronégative des lipoprotéines chez ces patients. Dans ces conditions, nous avons également pu montrer qu'il existait une corrélation significative entre la distance de migration des lipoprotéines en gel d'agarose - laquelle reflète leur électronégativité - et l'activité CETP plasmatique. De plus, toutes les expériences consistant à supplémenter les milieux d'incubation avec de l'albumine, capable de capter les acides gras à la surface de lipoprotéines, ont clairement montré qu'il y avait parallèlement à l'augmentation de la concentration en albumine dans le milieu une réduction de l'activité de transfert des esters de cholestérol.

Afin de pouvoir mesurer les transferts multiples d'esters de cholestérol radioactifs entre diverses fractions lipoprotéiques plasmatiques, nous avons mis au point une technique de mesure de l'activité CETP après séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration. Cette technique nous a permis de montrer que, chez des sujets analbuminémiques, la fraction LDL plasmatique qui présente une forte concentration en acides gras non estérifiés à sa

surface, donc une électronégativité augmentée, était un accepteur préférentiel de la réaction de transfert des esters de cholestérol.

Les expériences réalisées, *in vitro*, en présence d'acide rétinoïque nous permettent cependant de considérer que les acides gras non estérifiés, liés aux lipoprotéines, ne sont pas les seuls composés susceptibles de moduler l'activité CETP. Il nous apparaît intéressant de prendre en compte, au delà de l'effet de ces molécules proprement dites, l'existence d'un "effet charge". On peut de ce fait envisager que des molécules amphipathiques capables de s'insérer à la surface des lipoprotéines et présentant un groupement carboxylique ionisable puissent favoriser l'interaction électrostatique entre les lipoprotéines et la CETP et par là même de moduler l'activité de cette dernière au niveau plasmatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBEY, M. & CALVERT, G.D. (1989) Effects of blocking plasma lipid transfer protein activity in the rabbit., *Biochim. Biophys. Acta* **1003**, 20-29.

ABBEY, M. & NESTEL, P. (1994) Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is increased when *trans*-elaidic acid is substituted for *cis*-oleic acid in the diet., *Atherosclerosis* **106**, 99-107.

ABRAMSON, H.A., MOYER, L.,S. & GORIN, M.,H. (1942) Electrophoresis of proteins. *Reinhold Publishing Corp., New York*. 105-172.

AGELLON, L.B., QUINET, E.M. GILLETTE, T.G., DRAYNA, D.T., BROWN, M. L. & TALL, A.R. (1990) Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene., *Biochemistry* **29**, 1372-1376.

AGELLON, L.B., WALSH, A.M., HAYEK, T., MOULIN, P., CHENG-JIANG, X., SHELANSKI, S.A., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1991). Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice., *J. Biol. Chem*. **266**, 10796-10801.

AGELLON, L.B., ZHANG, P., JIANG, X.C., MENDELSOHN, L. & TALL, A.R. (1992) The CCAAT/enhancer-binding protein trans-activates the human cholesteryl ester transfer protein gene promoter., *J. Biol. Chem*. **267**, 22336-22339.

AHNADI, C.-E., BERETHEZENE, F., & PONSIN, G. (1993a) Simvastatin-induced decrease in the transfer of cholesterol ester from high density lipoprotein to very low and low density lipoproteins in normolipidemic subjects., *Atherosclerosis* **99**, 219-228.

AHNADI, C.-E., MASMOUDI, T., BERETHEZENE, F. & PONSIN, G. (1993b) Decreased ability of high density lipoproteins to transfer cholesteryl esters in non-insulin dependent diabetes mellitus., *Eur. J. Clin. Invest*. **23**, 459-465.

ALBERS, J.J., TOLLEFSON, J.H., CHEN, C.H. & STEINMETZ, A. (1984) Isolation and characterization of human plasma lipid transfer proteins., *Arteriosclerosis* **4**, 49-58.

ALBERS, J.J., TOLLEFSON, J.H., WOLFBAUER, G. & ALBRIGHT JR, R.E. (1992) Cholesteryl ester transfer protein in human brain., *Int. J. Lab. Res.* **21**, 264-266.

ALBERS, J.J., WOLFBAUER, G., CHEUNG, M.C., DAY, J.R., CHING, A.F.T., LOK, S. & TU, A.Y. (1995) Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: Effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies., *Biochim. Biophys. Acta* **1258**, 27-34.

ANDERSON, D.W., NICHOLS, A.V., PAN, S.S. & LINDGREN F.T. (1978) High density lipoprotein distribution., *Atheroslcerosis* **29**, 161-179.

APPEL, G.B., BLUM, C.B., CHIEN, S.C., KUNIS, C.L., & APPEL, A.,S. (1985) The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome. Relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure, and viscosity., *N Engl J Med*. **312**, 1544-1548.

ARAI, T., YAMASHITA, S., SAKAI, N., HIRANO, K.-I., OKADA, S., ISHIGAMI, M., MARUYAMA, T., YAMANE, M., KOBAYASHI, H., NOZAKI, S., FUNAHASHI, T., KAMEDA-TAKEMURA, K., NAKAJIMA, N. & MATSUZAWA, Y. (1996) A novel mutation (G181X) in the human cholesteryl ester transfer protein gene in japanese hyperalphalipoproteinemic subjects., *J. Lipid. Res.* **37**, 2145-2154.

AU-YOUNG, J. & FIELDING (1992) Synthesis and secretion of wild-type and mutant human plasma cholesteryl ester transfer protein in baculovirus-transfected insect cells : The carboxyl-terminal region is required for both lipoprotein binding and catalysis of transfer., *Proc. Natl. Acad. USA* **89**, 4094-4098.

AZOULAY, M. , HENRI, I., TATA, F., WEIL, D., GRZESCHIK, K.H., CHAVEZ, E., MCINTYRE, N., WILLIAMSON, R., HUMPRIES, S.E. & JUNIEN, C. (1986) The structural gene for human lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) maps to 16q22., *Cytogenet. Cell. Genet.* **40**: 573.

BAGDADE, J.D., LANE, J.T., STONE, N., RITTER, M.C. & SUBBAIAH, P.V. (1990) Persistent abnormalities in lipoprotein composition and cholesteryl ester transfer following iovastatin treatment., *J. Lipid. Res*. **31**, 1263-1269.

BAGDADE, J.D., RITTER, M.C. & SUBBAIAH, P.V. (1991a) Accelerated cholesteryl ester transfer in plasma of patients with hypercholesterolemia., *J. Clin. Invest*. **87**, 1259-1265.

BAGDADE, J.D., RITTER, M.C. & SUBBAIAH, P.V. (1991b) Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus., *Eur. J. Clin. Invest*. **21**, 161-167.

BAGDADE, J.D., RITTER, M.C., DAVIDSON, M. & SUBBAIAH, P.V. (1992) Effect of marine lipids on cholesteryl ester transfer and lipoprotein composition in patients with hypercholesterolemia., *Arterioscler. Thromb.* **12**, 1146-1152.

BALDO, G., FELLIN, R., MANZATO, E., BAIOCCHI, M.R., ONGARO, G., BAGGIO, G., FABIANI, F., PAULUZZI, S. & CREPALDI, G. (1983) Characterization of hyperlipidemia in two patients with analbuminemia., *Clin. Chim. Acta* **128**, 307-319.

BARRANS, A., COLLET, X., BARBARAS, R., JASPARD, B., MANENT, J., VIEU, C., CHAP, H. & PERRET, B. (1994) Hepatic lipase induces the formation of pre-β_1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL_2., *J. Biol. Chem.* **269**, 11572-11577.

BARRETT, A.G.M., HAMPRECHT, D., WHITE, A.J.P. & WILLIAMS, D.J. (1996) Total synthesis and stereochemical assignement of the quinquecyclopropane-containing cholesteryl ester transfer protein inhibitor U-106305., *J. Am. Chem. Soc*. **118**, 7863-7864.

BARTER, P.J. & LALLY, J.I. (1979a) *In vitro* exchange of esterified cholesterol between serum lipoprotein fractions: Studies of human and rabbits., *Metabolism* **28**, 230-236.

BARTER, P.J., LALLY, J.I. & WATTCHOW, D. (1979b) Metabolism of triglyceride in rabbit plasma low and high density lipoproteins: Studies *in vivo* and *in vitro*., *Metabolism* **28**, 614-618.

BARTER, P.J. & JONES, M.E. (1980a) Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins., *J. Lipid. Res.* **21**, 238-249.

BARTER, P.J., GORJATSCHKO, L. & CALVERT, G.D. (1980b) Net mass transfer of esterified cholesterol from human low density lipoproteins to very low density lipoproteins incubated *in vitro*., *Biochim. Biophys. Acta* **619**, 436-439.

BARTER, P.J., HA, Y.C. & CALVERT, G.D. (1981) Studies of esterified cholesterol in sub-fractions of plasma high density lipoproteins., *Atherosclerosis* **38**, 165-175.

BARTER, P.J., HOPKINS, G.J. & CALVERT, G.D. (1982a) Transfers and exchange of esterified cholesterol between plasma lipoproteins., *Biochem. J.* **208**, 1-7.

BARTER, P.J., HOPKINS, G.J., GORJATSCHKO, L. & JONES, M.E. (1982b) A unified model of esterified cholesterol exchange between human plasma lipoproteins., *Atherosclerosis* **44**, 27-40.

BARTER, P.J., CHANG, L.B.F. & RAJARAM, O.V (1990a) Sodium oleate dissociates the heteroexchange of cholesteryl esters and triacylglycerol between HDL and triacylglycerol-rich lipoproteins., *Biochim. Biophys. Acta* **1047**, 294-297.

BARTER, P.J., CHANG, L.B.F. & RAJARAM, O.V. (1990b) Sodium oleate promotes a redistribution of cholesteryl ester from high to low density lipoproteins., *Atherosclerosis* **84**, 13-24.

BARTER, P.J., CHANG, L.B.F., NEWNHAM, H.H., RYE, K.-A. & RAJARAM, O.V. (1990c) The interaction of cholesteryl ester transfer protein and unesterified fatty acids promotes a reduction in the particle size of high-density lipoprotein., *Biochim. Biophys. Acta* **1045**, 81-89.

BARTTER, F.C. (1961) Metabolism of infused serum albumin in the hypoprotidemia of gastrointestinal protein loss and in albuminemia., *Trans. Assoc. Am. Physicians* **74**, 180-194.

BERSHAD, S., RUBINSTEIN, A., PATERNITI, J.R.JR, NGOC-ANH, L., POLIAK, S.C., HELLER, B., GINSBERG, H.N., FLEISCHMAJER, R., & BROWN, W.V. (1985) Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne., *New Engl. J. Med.* **313**, 981-985.

BHATNAGAR, D., DURRINGTON, P.N., MACKNESS, M.I., ARROL, S., WINOCOUR, P.H. & PRAIS, H. (1992) Effects of treatment of hypertriglyceridaemia with gemfibrozil on serum lipoproteins and the transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins to low density lipoproteins., *Atherosclerosis* **92**, 49-57.

BIHAIN, B.E., DECKELBAUM, R.J., YEN, F.T., GLEESON, A.M., CARPENTIER, Y.A. & WITTE, L.D. (1989) Unesterified fatty acids inhibit the binding of low density lipoproteins to the human fibroblast low density lipoprotein receptor., *J. Biol. Chem.* **264**, 17316-17321.

BISGAIER, C.L., ESSENBURG, A.D., MINTON, L.L., HOMAN, R., BLANKLEY, C.J. & WHITE, A. (1994) Cholesteryl ester transfer protein inhibition by PD 140195., *Lipids* **29**, 811-818.

BLANCHE, P.J., GONG, E.L., FORTE, T.M. & NICHOLS, A.V. (1981) Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis., *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 408-419.

BOMAN, H., HERMODSON, M., HAMMOND, C.A. & MOTULSKY, A.G. (1976) Analbuminemia in an american girl., *Clin. Genet.* **9**, 513-516.

BORENSZTAJN, J., REDDY, M.N. & GLADSTONE, A.R. (1988) A simple method for the separation of triacylglycerols from fatty acids released in lipase assays., *J. Lipid. Res.* **29**, 1549-1552.

BRASCHI, S., LAGROST, L., FLORENTIN, E., MARTIN, C., ATHIAS, A., GAMBERT, P., KREMPF, M., LALLEMANT, C. & JACOTOT, B. (1996) Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from analbuminemic patients., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 441-449.

BROWN, M.L., INAZU, A., HESLER, C.B., AGELLON, L.B., MANN, C., WHITLOCK, M.E., MARCEL, Y.L., MILNE, R.W., KOIZUMI, J., MABUCHI, H., TAKEDA, R. & TALL, A.R. (1989) Molecular basis of deficiency in family with increased high-density lipoproteins., *Nature* **342**, 448-451.

BRUCE, C., DAVIDSON, W.S., LUND-KATZ, S., KUSSIE, P., PHILIPPS, M., GHOSH, R. & TALL, A.R. (1995a) Molecular determinants of plasma cholesteryl ester transfer protein binding to high density lipoproteins., *J. Biol. Chem*. **270**, 11532-11542.

BRUCE, C. & TALL, A.R. (1995b) Cholesteryl ester transfer proteins, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis., *Curr. Opin. Lipidol*. **6**, 306-311.

CASTRO, G., R. & FIELDING, C.J. (1988) Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-β-migrating high-density lipoprotein., *Biochemistry* **27**, 25-29.

CHAJEK, J. & FIELDING, C.J. (1978) Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer proteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3445-3449.

CHAKALAMANNIL, S., XIA, Y., WANG, Y., TSAI, H., CZARNIECKI, M., WANG, S., CLEMMONS, A., AHN, H.-S. & BOYKOW, G. (1995) Novel inhibitor of cholesteryl ester transfer protein., *Bioog. Med. Chem.* **5**, 2005-2010.

CHEUNG, M.C. & ALBERS, J.J. (1984) Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography., *J. Biol. Chem.* **259**, 12201-12209.

CHEUNG, M.C., BROWN, B.G., WOLF, A.C. & ALBERS, J.J. (1991) Altered particle size distribution of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in subjects with coronary artery disease., *J. Lipid. Res.* **32**, 383-394.

CHEUNG, M.C., AUSTIN, M.A., MOULIN, P., WOLF, A.C., CRYER, D. & KNOPP, R.H. (1993) Effects of pravastatin on apolipoprotein-specific high density lipoprotein subpopulation and low density lipoprotein subclass phenotypes in patients with primary hypercholesterolemia., *Atherosclerosis* **102**, 107-119.

CISTOLA, D.P., ATKINSON, D., HAMILTON, J.A. & SMALL, D.M. (1986) Phase behavior and bilayer properties of fatty acids: hydrated 1:1 acids-soaps., *Biochemistry* **25**, 2804-2812.

CISTOLA, D.P., SMALL, D.M. & HAMILTON, J.A. (1987a) Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acid binding sites., *J. Biol. Chem.* **262**, 10971-10979.

CISTOLA, D.P., SMALL, D.M. & HAMILTON, J.A. (1987b) Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. II Electrostatic interactions in individual fatty acid binding sites., *J. Biol. Chem.* **262**, 10980-10985.

CISTOLA, D.P. & SMALL, D.M (1991) Fatty acids distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ^{13}C nuclear magnetic resonnance study., *J. Clin. Invest.* **87**, 1431-1441.

CLAY, M.A., NEWNHAM, H.H. & BARTER, P.J. (1990) Hepatic lipase promotes a loss of apoAI from triglycerides enriched human high density lipoproteins during incubation *in vitro*., *Arterioscler. Thromb.* **11**, 415-422.

CONNOLLY, D.T., MCINTYRE, J., HEUVELMAN, D., REMSEN, E.E., MCKINNIE, R.E., VU, L., MELTON, M., MONSELL, R., KRUL, E.S. & GLENN, K. (1996a) Physical and kinetics characterization of recombinant human cholesteryl ester transfer protein., *Biochem. J.* **320**, 39-47.

CONNOLLY, D.T., KRUL, E.S., HEUVELMAN, D. & GLENN, K.C. (1996b) Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by apolipoproteins, lipopolysaccharides, and cholesteryl sulfate., *Biochim. Biophys. Acta* **1304**, 145-160.

CONNOLLY, D.T., HEUVELMAN, D. & GLENN, K.C. (1996c) Inactivation of cholesteryl ester transfer protein by cystein modification., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 42-47.

CORMODE, E.J., LYSTER, D.M. & ISRAEL, S. (1975) Analbuminemia in a neonate., *J. Pediatr.* **86**, 862-867.

COVAL, S.J., CONOVER, M.A., MIERZWA, R., KING, A., PUAR, M.S., PHIFE, D.W., PAI, J.-K., BURRIER, R.E., AHN, H.-S., BOYKOW, G.C., PATEL, M. & POMPENI, S.A. (1995) Wiedendiol-A and -B, cholesteryl ester transfer protein inhibitors from the marine sponge *Xestospongia wiedenmayeri*., *Bioog. Med. Chem.* **5**, 605-610.

DAERR, W.H. & GRETEN, H. (1982) *In vitro* modulation of the distribution of normal human plasma high density lipoprotein subfractions through the lecithin:cholesterol acyltransferase reaction., *Biochim. Biophys. Acta* **710**, 128-133.

DAMMACO, F., MIGLIETTA, A., D'ADDABBO, A., FRATELLO, A., MOSCHETTA, R. & BONOMO, L. (1980) Analbuminemia: report of a case and review of the litterature., *Vox. Sang.* **39**, 153-161.

DAY, J.R., ALBERS, J.J., LOFTON-DAY, C.E., GILBERG, T.L., CHING, A.F.T., GRANT, F.J., O'HARA, P.J., MARCOVINA, S.M. & ADOLPHSON, J.L. (1994) Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells., *J. Biol. Chem.* **269**, 9388-9391.

DECKELBAUM, R.J., EISENBERG, S., OSCHRY, Y., BUTBUL, E., SHARON, I. & OLIVECRONA, T. (1982) Reversible modification of human plasma low density lipoproteins toward triglyceride-rich precursors: A mechanism for losing excess cholesterol ester., *J. Biol. Chem.* **257**, 6509-6517.

DECKELBAUM, R.J., GRANOT, E., OSCHRY, Y., ROSE, L. & EISENBERG, S. (1984) Plasma triglycerides determines structure-composition in low density lipoproteins., *Arteriosclerosis* **4**, 225-231.

DICKEN, C.H. & CONNALLY, S.M. (1980) Eruptive xanthomas associated with isotretinoin (13-*cis* retinoic acid)., *Arch. Dermatol.* **116**, 951-952.

DINCHUK, J., HART, J., GONZALEZ, G., KARMANN, G., SCHMIDT, D. & WIRAK, D.O. (1995) Remodelling of lipoproteins in transgenic mice expressing human cholesteryl ester transfer protein., *Biochim. Biophys. Acta* **1255**, 301-310.

DOUSSET, N., JULIA, A.M., CHAP, H. & DOUSTE-BLAZY, L. (1989) Enhanced cholesteryl ester transfer activity in cyclophosphamide-treated rabbits: relationship with lipolytic enzymes., *Adv. Exp. Med. Biol.* **243**, 255-161.

DRAYNA, D., JARNAGIN, A.S., MCLEAN, J., HENZEL, W., KOHR, W., FIELDING, C., & LAWN, R. (1987) Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA., *Nature* **327**, 632-634.

DULLAART, R.P.F., GROENER, J.E.M. & ERKELENS, D.W. (1987) Effect of the composition of very low and low density lipoproteins on the rate of cholesteryl ester transfer from high density lipoproteins in man, studied *in vitro*., *Eur. J. Clin. Invest.* **17**, 241-248.

DULLAART, R.P.F., GROENER, J.E.M., DIKKESCHEI, L.D., ERKELENS, D.W. & DOORENBOS, H. (1989) Increased cholesteryl ester transfer activity in complicated Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus-its relationship with serum lipids., *Diabetologia* **32**, 14-19.

EISENBERG, S., GAVISH, D., OSCHRY, Y., FAINARU, M. & DECKELBAUM, R.J. (1984) Abnormalities in very low, and high density lipoproteins in hypertriglyceridemia. Reversal toward normal with bezafibrate treatment., *J. Clin. Invest.* **74**, 470-482.

EISENBERG, S. (1985) Preferential enrichment of large-sized very low density lipoprotein populations with transferred cholesteryl esters., *J. Lipid. Res.* **26**, 487-494.

ELLSWORTH, J.L., KASHYAP, M.L., JACKSON, R.L. & HARMONY, A.K. (1987) Human plasma lipid transfer protein catalyzes the speciation of high density lipoproteins., *Biochim. Biophys. Acta* **918**, 260-266.

EPPS, D.E., GREENLEE, K.A., HARRIS, J.S., THOMAS, E.W., CASTLE, C.K., FISHER, J.F., HOZAK, R.R., MARSCHKE, C.K., MELCHIOR, G.W. & KÉZDY, F.J. (1995) Kinetics and inhibition of lipid exchange catalyzed by plasma cholesteryl ester transfer protein (Lipid Transfer Protein)., *Biochemistry* **34**, 12560-12569.

FAUST, R.A. & ALBERS, J.J. (1988) Regulated vectorial secretion of cholesteryl ester transfer protein (LTP-I) by $CaCo_2$ model of human enterocytes epithelium., *J. Biol. Chem.* **263**, 8786-8789.

FAUST, R.A., CHEUNG, M.C. & ALBERS, J.J. (1989) Secretion of cholesteryl ester transfer protein-lipoprotein complexes by human $HepG_2$ hepatocytes., *Atherosclerosis* **77**, 77-82.

FAUST, R.A., TOLLEFSON, J.H., CHAIT, A. & ALBERS, J.J. (1990) Regulation of LTP-I secretion from human monocytes-derived macrophages by differenciation and cholesterol accumulation., *Biochim. Biophys. Acta* **1042**, 404-409.

FEX, G.A., ARONSSON, A., ANDERSSON, A., LARSSON, K. & NILSSON-EHLE, P. (1996) *In vivo* effects of 13-*cis* retinoic acid treatment on the concentration of proteins and lipids in serum., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **34**, 3-7.

FIELDING, P.E., FIELDING, C.J., HAVEL, R.J., KANE, J.P. & TUN, P. (1983) Cholesterol net transport, esterification, and transfer in human hyperlipidemic plasma., *J. Clin. Invest.* **71**, 449-460.

FIELDING, C.J., REAVEN, G.M., LIU, G. & FIELDING, P.E. (1984) Increased free cholesterol in plasma low and very low density lipoproteins in non-insulin-dependant diabetes mellitus: Its role in the inhibition of cholesteryl ester transfer., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2512-2516.

FIELDING, C.J. & HAVEL, R.J. (1996) Cholesteryl ester transfer protein: Friend or foe?, *J. Clin. Invest.* **97**, 2687-2688.

FÖGER, B., LUEF, G. RITSCH, A., SCHMIDAUER, C., DOBLINGER, A., LECHLEITNER, M., AICHNER, F. & PATSCH, J.R. (1995) Relationship of high-density lipoprotein subfractions and cholesteryl ester transfer protein in plasma to carotid artery wall thickness., *J. Molecular Med*. **73**, 369-372.

FOUCHER, C., LAGROST, L., MAUPOIL, V., LE MESTE, M., ROCHETTE, L. & GAMBERT, P. (1996) Alterations of lipoprotein fluidity by non-esterified fatty acids known to affect cholesteryl ester transfer protein activity., *Eur. J. Biochem.* **236**, 436-442.

FRANCESCHINI, G., CHIESA, G. & SIRTORI, E. (1991) Probucol increases cholesteryl ester transfer protein activity in hypercholesterolaemic patients., *Eur. J. Clin. Invest.* **21**, 384-388.

FRANCIS, G.A., KO, K.W.S., HARA, H. & YOKOHAMA, S. (1991) Regulation of the uptake of high-density lipoproteins-originated cholesteryl ester by $HepG_2$ cells: role of low density lipoprotein and plasma lipid transfer protein., *Biochim. Biophys. Acta* **1084**, 159-166.

FREEMAN, D.J., PACKARD, C.J., SHEPHERD, J. & GAFFNEY, D. (1990) Polymorphism in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein are related to plasma high-density lipoprotein cholesterol and transfer protein activity., *Clin. Sci.* **79**, 575-581.

FUKASAWA, M., ARAI, H. & INOUE, K. (1992) Establishment of anti-human cholesteryl ester transfer protein monoclonal antibodies and radioimmuno-assaying of the level of cholesteryl ester transfer protein in human plasma., *J. Biochem.* **111**, 696-698.

FUMERON, F., BETOULLE, D., LUC, G., BEHAGUE, I., RICARD, I., POIRIER, O., JEMAA, R., EVANS, A., ARVEILER, D., MARQUES-VIDAL, P., BARD, J.-M., FRUCHART, J.-C., DUCIMETIERE, P., APFELBAUM, M. & CAMBIEN, F. (1996) Alcohol intake modulates the effects of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction., *J. Clin. Invest*. **96**, 1664-1671.

FUNKE, H., WIEBUSCH, H., FUER, L., MUNTONI, S., SCHULTE, H. & ASSMANN, G. (1994) Identification of mutations in the cholesteryl ester transfer protein in europeans with elevated high density lipoprotein cholesterol., *Circulation* **90**, I-241.

GAMBERT, P., LALLEMANT, C., ATHIAS, A. & PADIEU, P. (1982) Alterations of HDL cholesterol distribution induced by incubation of human serum., *Biochim. Biophys. Acta* **713**, 1-9.

GAMBERT, P., BOUZERAND-GAMBERT, C., ATHIAS, A., FARNIER, M. & LALLEMANT, C. (1990) Human low density lipoprotein subfraction separated by gradient gel electrophoresis: composition, distribution, and alterations induced by cholesteryl ester transfer protein., *J. Lipid. Res.* **31**, 1199-1210.

GAVISH, D., OSCHRY, Y. & EISENBERG, S. (1987) *In vivo* conversion of human HDL_3 to HDL_2 and apoE-rich HDL_1 in the rat: effects of lipid transfer protein., *J. Lipid. Res.* **28**, 257-267.

GHERARDI, E., ROTA, E., CALANDRA, S., GENOVA, R. & TAMBORINO, A. (1977) Relationship among the concentrations of serum lipoproteins and changes in their chemical composition in patients with untreated nephrotic syndrome., *Eur J Clin Invest.* **7**, 563-570.

GOLLNICK, H., TSAMBAOS, D. & ORFANOS, C.E. (1981) Risk factors promote elevations of serum lipids in acne patients under oral 13-*cis* retinoic acid (isotretinoin)., *Arch. Dermatol. Res.* **271**, 189-196.

GOTODA, T., KINOSHITA, M., SHIMANO, H., HARADA, K, SHIMADA, M., OHSUGA, J.I., TERAMOTO, T., YAZAKI, Y. & YAMADA, N. (1993) Cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by a nonsens mutation detected in the patient's macrophage mRNA., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 519-524.

GRANOT, E., TABAS, I. & TALL, A.R. (1987) Human plasma cholesteryl ester transfer protein enhances the transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins into cultured $HepG_2$ cells., *J. Biol. Chem.* **262**, 3482-3487.

GRASS, D.S., SAINI, U., FELKNER, R., WALLACE, R.E., LAGO, W.J.P., YOUNG, S.G. & SWANSON, M.E. (1995) Transgenic mice expressing both human apolipoprotein B and human CETP have a lipoprotein cholesterol distribution similar to that of normolipidemic humans., *J. Lipid. Res.* **36**, 1082-1091.

GRAY, P.W., FLAGGS, G., LEONG, S.R. & GUMINA, R.J. (1989) Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein., *J. Biol. Chem.* **264**, 9505-9509.

GROENER, J.E.M., VAN ROZEN, A.J. & ERKELENS, D.W. (1984) Cholesteryl ester transfer activity. Localization and role in distribution of cholesteryl ester among lipoproteins in man., *Atherosclerosis* **50**, 261-271.

GROENER, J.E.M., VAN GENT, T. & VAN TOL, A. (1989) Effect of lipid transfer protein on plasma lipids, apolipoproteins and metabolism of high-density lipoprotein cholesteryl ester in the rat., *Biochim. Biophys. Acta* **1002**, 93-100.

GROOT, P.H.E., SCHEEK, L.M. & JANSEN, H. (1983) Liver lipase and high-density lipoprotein. Lipoprotein changes after incubation of human serum with rat liver lipase., *Biochim. Biophys. Acta* **751**, 393-400.

GRUNDY, S.M. (1990) Cholesterol and coronary heart disease., *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. **50**, suppl. 99, 63-72

GUÉRIN, M., DOLPHIN, P. & CHAPMAN, M.J. (1994a) A new *in vitro* method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB acontaining lipoprotein subspecies. Identifiation of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma., *Arteriosler. Thromb.* **14**, 199-206.

GUERIN, M., DOLPHIN, P. & CHAPMAN, M.J. (1994b) Preferential cholesteryl ester acceptors among the LDL subspecies of subjects with familial hyper-cholesterolemia., *Arteriosler. Thromb.* **14**, 679-685.

GUERIN, M., DOLPHIN, P., TALUSSOT, C., GARDETTE, J., BERTHÉZÈNE, F. G. & CHAPMAN, M.J. (1995) Pravastatin modulates cholesteryl ester transfer from HDL to apoB-containing lipoproteins and lipoprotein subspecies profile in familial hypercholesterolemia., *Arteriosler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1359-1368.

GUERIN, M., BRUCKERT, E., DOLPHIN, P., TURPIN, G. & CHAPMAN, M.J. (1996a) Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combine hyperlipidemia., *Arteriosler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 763-772.

GUERIN, M., BRUCKERT, E., DOLPHIN, P. & CHAPMAN, M.J. (1996b) Absence of cholesteryl ester transfer protein mediated cholesteryl ester mass transfer from high-density lipoprotein to low-density lipoprotein particles is a major feature of combined hyperlipidaemia., *Eur. J. Clin. Invest*. **26**, 485-494.

GUYARD-DANGREMONT, V., LAGROST, L., GAMBERT, P. & LALLEMANT, C. (1994a) Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP)., *Clin. Chim. Acta* **231**, 147-160.

GUYARD-DANGREMONT, V., LAGROST, L. & GAMBERT, P. (1994b) Comparative effects of purified apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV on cholesteryl ester transfer protein activity., *J. Lipid. Res*. **35**, 982-992.

HA, Y.C. & BARTER, P.J. (1982) Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrates species., *Comp. Biochem. Physiol. [B]* **71**, 265-269.

HA, Y.C., GORJATSCHKO, L. & CHANG, L.B.F. & BARTER, P.J. (1983) Changes in the density distribution of pig high density lipoproteins during incubation *in vitro*: influence of esterified cholesterol transfer activity., *Atherosclerosis* **48**, 253-263.

HA, Y.C., CHANG, L.B.F. & BARTER, P.J. (1985) Effects of injecting exogenous lipid transfer protein into rats., *Biochim. Biophys. Acta* **833**, 203-210.

HA, Y.-C. & BARTER, P.J. (1986) Effects of sucrose feeding and injection of lipid transfer protein on rat plasma lipoproteins., *Comp. Biochem. Physiol. [B]* **83**, 463-466.

HANNUKSELA, M., MARCEL, Y.L., KESÄNIEMI, Y.A. & SAVOLAINEN, M.J. (1992a) Reduction in the concentration and activity of plasma cholesteryl ester transfer protein by alcohol., *J. Lipid. Res.* **33**, 737-744.

HANNUKSELA, M., KESÄNIEMI, Y.A. & SAVOLAINEN, M.J. (1992b) Evaluation of plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity as a marker of alcoholism., *Alcohol Alcoholism* **27**, 557-562.

HANNUKSELA, M.L., LIINAMAA, M.J., KESÄNIEMI, Y.A. & SAVOLAINEN, M.J. (1994) Relation of polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene to transfer protein activity and plasma lipoprotein levels in alcohol drinkers., *Atherosclerosis* **110**, 35-44.

HARDARSON, I., MOSER, A.H., FULLER, J., FIELDING, C., FEINGOLD, K. & GRÜNFELD, C. (1996) Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA level of cholesteryl ester transfer protein in syrian hamster., *J. Clin. Invest.* **97**, 2585-2592.

HAVEL, R.J., EDER, H.A. & BRAGDON, J.H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum., *J. Clin. Invest.* **34**, 1345-1353.

HAYEK, T., CHAJEK-SHAUL, T., WALSH, A., AGELLON, L.B., MOULIN, P., TALL, A.R. & BRESLOW, J.L. (1992) An interaction between the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and apolipoprotein A-I genes in transgenic mice results in a profound CETP-mediated depression of high density lipoprotein cholesterol levels., *J. Clin. Invest.* **90**, 505-510.

HAYEK, T., AZROLAN, N., VERDERY, R.B., WALSH, A., CHAJEK-SHAUL, T., AGELLON, L.B., TALL, A.R. & BRESLOW, J.L. (1993) Hyperlipidemia and cholesteryl ester transfer protein interact to dramatically alter high density lipoprotein levels, particles size, and metabolism. Studies in transgenic mice., *J. Clin. Invest.* **92**, 1143-1152.

HAYEK, T., MASUCCI-MAGOULAS, L., JIANG, X., WALSH, A., RUBIN, E., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1995) Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene., *J. Clin. Invest.* **96**, 2071-2074.

HESLER, C.B., SWENSON, T. & TALL, A.R. (1987) Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein., *J. Biol. Chem.* **262**, 2275-2282.

HESLER, C.B., TALL, A.R., SWENSON, T.L., WEECH, P.K., MARCEL, Y.L. & MILNE, R.W. (1988) Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma., *J. Biol. Chem.* **263**, 5020-5023.

HESLER, C.B., BROWN, M.L., FEUER, D.S., MARCEL, Y.L., MILNE, R.W. & TALL, A.R. (1989) Structure-function analysis of plasma cholesteryl ester transfer protein by protease digestion and expression of cDNA fragments in *Escherichia coli*., *J. Biol. Chem.* **264**, 11317-11325.

HIRANO, K.-I., MATSUAWA, Y., SAKAI, N., HIRAOKA, H., NOZAAKI, S., FUNAHASHI, T., YAMASHITA, S., KUBO, M. & TARUI, S. (1992) Polydisperse low density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic chronic alcohol drinkers in association with marked reduction of cholesteryl ester transfer protein activity., *Metabolism* **41**, 1313-1318.

HIRANO, K.S., YAMASHITA, Y., KUGA, N., SAKAI, S., NOZAHI, S., KIHARA, T., ARAI, K., YANAGI, S., TAKAMI, M., MENJU, M., ISHIGAMI, Y., YOSHIDA, K., KAMEDA-TAKEMURA, K., HAYASHI, K. & MATSUZAWA, Y. (1995) Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia: Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1849-1856.

HOAK, J.C., SPECTOR, A.A., FRY, G.L. & WARNER E.D. (1970) Effect of free fatty acids on ADP-induced platelet aggregation., *Nature* **228**, 1330-1332.

HOMMA, Y. (1989) Comparison in inhibitory effects of lipolysis products on cholesterol esterification., *Artery* **16**, 233-247.

HOPKINS, G.J. & BARTER, P.J. (1980) Transfers of esterified cholesterol and triglycerides between high density and very low density lipoproteins: *in vitro* studies of rabbits and humans., *Metabolism* **29**, 546-550.

HOPKINS, G.J., CHANG, L.B.F. & BARTER, P.J. (1985) Role of lipid transfer in the formation of a subpopulation of small high density lipoproteins., *J. Lipid. Res*. **26**, 218-229.

IHM, J., HARMONY, J.A., ELLSWORTH, J. & JACKSON, R.L. (1980) Simultaneous transfer of cholesteryl ester and phospholipid by protein(s) isolated from human lipoprotein-free plasma., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **93**, 1114-1120.

IHM, J., ELLSWORTH, J.L., CHATAING, B. & HARMONY, J.A.K. (1982a) Plasma protein-facilitated coupled exchange of phosphatidylcholine and cholesteryl ester in the absence of cholesterol esterification., *J. Biol. Chem*. **257**, 4818-4827.

IHM, J., QUINN, D.M., BUSH, S.J., CHATAING, B. & HARMONY, J.A.K. (1982b) Kinetics of plasma protein-catalyzed exchange of phosphatidylcholine and cholesteryl ester between plasma lipoproteins., *J. Lipid. Res.* **23**, 1328-1341.

INAZU, A., BROWN, M.L., HESLER, C.B., AGELLON, L.B., KOIZUMI, J., TAKATA, K., MARUHAMA, Y., MABUCHI, H. & TALL, A.R. (1990) Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation., *N. Engl. J. Med.* **323**, 1234-1238.

INAZU, A., QUINET, E.M., WANG, S., BROWN, M.L., STEVENSON, S., BARR, M.L., MOULIN, P. & TALL, A.R. (1992a) Alternative splicing of the mRNA encoding the human cholesteryl ester transfer protein., *Biochemistry* **31**, 2352-2358.

INAZU, A., KOIZUMI, J., MABUCHI, H., KAJINAMI, K. & TAKEDA, R. (1992b) Enhanced cholesteryl ester transfer protein activities and abnormalities of high density lipoproteins in familial hypercholesterolemia., *Horm. Metab. Res*. **24**, 284-288.

ITO, T., NISHIWAKI, M., ISHIKAWA, T. & NAKAMURA, H. (1995) CETP and LCAT activities are unrelated to smoking and moderate alcohol consumption in healthy normolipidemic men., *Jpn. Circ. J.* **59**, 541-546.

JARNAGIN, A.S., KOHR, W. & FIELDING, C. (1987) Isolation and specificity of a Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein from human plasma., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1854-1857.

JAUHIAINEN, M., METSO, J., PAHLMAN, R., BLOMQVIST, S., VAN TOL, A. & EHNHOLM, C. (1993) Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion., *J. Biol. Chem*. **268**, 4032-4036.

JIANG, X.C., MOULIN, P., QUINET, E., GOLDBERG, I.J., YACOUB, L.K., AGELLON, L.B., COMPTON, D., SCHNITZER-POLOKOFF, R. & TALL, A.R. (1991) Mammalian adipose tissue and muscle are major source of lipid transfer protein mRNA., *J. Biol. Chem.* **266**, 4631-4639.

JIANG, C.X., AGELLON, L.B., WALSH, A., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1992) Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice dependence on natural flanking sequence., *J. Clin. Invest*. **90**, 1290-1295.

JIANG, X.-C., MASUCCI-MAGOULAS, L., MAR, J., LIN, M., WALSH, A., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1993) Down-regulation of mRNA for the low density lipoprotein receptor in transgenic mice containing the gene for human cholesteryl ester transfer protein. Mechanism to explain accumulation of lipoprotein B particles., *J. Biol. Chem.* **268**, 27406-27412.

JIANG, X.-J., BRUCE, C., COCKE, T., WANG, S., BOGUSHI, M. & TALL, A.R. (1995) Point mutagenesis of positively charged amino acids of cholesteryl ester transfer protein: Conserved residues within the lipid transfer/lipopolysaccharide binding protein gene family essential for function., *Biochemistry* **34**, 7258-7263.

JOHANSSON, J., CARLSON, L.A., LANDOU, C. & HAMSTEN, A. (1991) High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confirmed to normotriglyceridemic patients., *Arterioscler. Thromb.* **11**, 174-182.

JONES, H., BLANC, D.J. & CUNLIFFE, W.J (1980) 13-*cis* retinoic acid and acne, *The Lancet* **II**, 1048-1049.

JOVEN, J., VILLABONA, C.V., VILELLA, E., MASAA, L., ALBERTI, R. & VALLES, M. (1990) Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephrotic syndrome., *N. Engl. J. Med*. **323**, 579-584.

KAHRI, J., VUORINEN-MARKKOLA, H., TILLY-KIESI, M., LAHDENPERÄ, S. & TASKINEN, M.-R. (1993) Effect of gemfibrozil on high density lipoprotein subspecies in non-insulin dependent diabetes mellitus. Relations to lipolytic enzymes and to the cholesteryl ester transfer protein activity., *Atherosclerosis* **102**, 79-89.

KATO, H., NAKANISHI, T., ARAI, H., NISHIDA, H.I. & NISHIDA, T. (1989) Purification, microheterogeneity, and stability of human lipid transfer protein., *J. Biol. Chem.* **264**, 4082-4087.

KATZ, R.A., JORGENSEN, H. & NIGRA, T.P. (1980) Elevation of serum triglyceride levels from oral isotretinoin in disorders of keratinization., *Arch. Derm.* **116**, 1369-1372.

KIM, H.-S., OH, S.H., KIM, D.-I., KIM, I.-C., CHO, K.-H. & PARK, Y.B. (1995) Chemical synthesis of 15-ketocholesterols and their inhibitions of cholesteryl ester transfer protein., *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 367-374.

KIM, Y.-K., SON, K.-H., NAM, J.-Y., KIM, S.-U., JEONG, T;-S., LEE, W.-S., BOK, S.-H., KWON, B.-M., PARK, Y.J.. & SHIN, J.M. (1996) Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by rosenonolactone derivatives., *J. Antibiot.* **49**, 815-816.

KINOSHITA, M. ARAI, H., FUKASAWA, M., WATANABE, T., TSUKAMOTO, K., HASHIMOTO, Y., INOUE, K., KUROSAWA, K., TERAMANO, T. (1993) Apolipoproteins E enhances lipid exchange between lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein., *J. Lipid. Res.* **34**, 261-268.

KIRK, R.E. (1982) Experimental design: Procedures for the behavioral sciences, 2nd ed, Brooks / Cole Publishing company, Wadsworth Inc., Belmont, CA.

KO, K.W.S., OIKAWA, K., OHNISHI, T., KAY, C.M. & YOKOYAMA, S. (1993) Purification, characterization, and conformational analysis of rabbit plasma lipid transfer protein., *Biochemistry* **32**, 6729-6736.

KOTHARI, H.V., POIRIER, K.J., LEE, W.H. & SATOH, Y. (1997) Inhibition of cholesterol ester transfer protein by CGS 25159 and changes in lipoproteins in hamster., *Atherosclerosis* **128**, 59-66.

KRAGH-HANSEN, U. (1981) Molecular aspect of ligand binding to serum albumin., *Pharmacological Review* **33**, 17-53.

KUIVENHOVEN, J.A., DE KNIJFF, P., BOER, J.M.A., SMALHEER, H.A., BOTMA, G.-J., SEIDELL, J.C., KASTELEIN, J.J.P. & PRITCHARD, P.H. (1997) Heterogeneity at the CETP gene locus. Influence on plasma CETP concentrations and HDL cholesterol levels., *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol*. **17**, 560-568.

KUNITAKE, S.T., MENDEL, C.M. & HENNESSY, L.K. (1992) Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities., *J. Lipid. Res*. **33**, 1807-1816.

KURASAWA, T., YOKOYAMA, S., MIYAKE, Y., YAMAMURA, T. & YAMAMOTO, A. (1985) Rate of cholesteryl ester transfer between high and low density lipoproteins in human serum and a case with decreased transfer rate in association with hyperalphalipoproteinemia., *J. Biochem.* **98**, 1499-1508.

KUSHWAHA, R.S., RAINWAETR, D.L., WILLIAMS, M.C., GETZ, G.S. & MCGILL, H.G. (1990) Impaired plasma cholesteryl ester transfer with accumulation of larger high density lipoproteins in some families of baboons (*Papio sp.*)., *J. Lipid. Res.* **31**, 965-973.

KUSHWAHA, R.S., ASAN, S.Q., MCGILL, H.G., GETZ, G.S., DUNHAM, R.G. & KANDA, P. (1993) Characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitor from plasma of baboon (*Papio sp.*)., *J. Lipid. Res*. **34**, 1285-1297.

KWON, B.-M., NAM, J.-.H., LEE, S.-H., JEONG, T.-S., KIM, S.-U., SON, K.-H., KIM, Y.-K., HAN, K.-H., KIM, S.-K. & BOK, S;-H. (1995) KRIBB-BP005m: A new inhibitor of cholesteryl ester transfer protein (CETP) produced from *Trichothecium roseum* F1064., *Tetrahedron Lett.* **36**, 6487-6490.

KWON, B.-M., NAM, J.-.H., LEE, S.-H., JEONG, T.-S., KIM, S.-U. & BOK, S;-H. (1996) Isolation of cholesteryl ester transfer protein inhibitors from *Panax ginseng* roots., *Tetrahedron Lett.* **36**, 6487-6490.

LAGROST, L., GAMBERT, P., DANGREMONT, V., ATHIAS, A. & LALLEMANT, C. (1990) Role of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in the HDL conversion process as evidenced by using anti-CETP monoclonal antibodies., *J. Lipid. Res.* **31**, 1569-1575.

LAGROST, L. & BARTER, P.J. (1991a) Effects of various non esterified fatty acids on the particle size redistribution of high density lipoproteins induced by the cholesteryl ester transfer protein., *Biochim. Biophys. Acta* **1082**, 204-210.

LAGROST, L. & BARTER, P.J. (1991b) Effects of various non esterified fatty acids on the transfer of cholesteryl esters from HDL to LDL induced by the cholesteryl ester transfer protein., *Biochim. Biophys. Acta* **1085**, 209-216.

LAGROST, L. (1992a) Differential effects of *cis* and *trans* fatty acid isomers, oleic and elaidic acids, on the cholesteryl ester transfer protein activity., *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 159-162.

LAGROST, L. (1992b) Effect of the human cholesteryl ester transfer protein on the particles size redistribution of specific subpopulation of high density lipoprotein$_3$., *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 143-150.

LAGROST, L. & BARTER, P.J. (1992c) Cholesteryl ester transfer protein promotes the association of HDL apolipoproteins A-I and A-II with LDL: potentiation by oleic acid., *Biochim. Biophys. Acta* **1127**, 255-262.

LAGROST, L., GANDJINI, H., ATHIAS, A., GUYARD-DANGREMONT, V., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P. (1993) Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects., *Arterioscler. Thromb.* **13**, 815-825.

LAGROST, L. (1994a) Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: Review of *in vitro* and *in vivo* studies., *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 209-236.

LAGROST, L., ATHIAS, A., GAMBERT, P. & LALLEMANT, C. (1994b) Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein., *J. Lipid. Res.* **35**, 825-835.

LAGROST, L., PERSÉGOL, L., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P. (1994c) Influence of apolipoprotein composition of high density lipoprotein particles on cholesteryl ester transfer protein activity. Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and A-II., *J. Biol. Chem.* **269**, 3189-3197.

LAGROST, L., FLORENTIN, E., GUYARD-DANGREMONT, V., ATHIAS, A., GANDJINI, H., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P. (1995) Evidence for non esterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1388-1396.

LAGROST, L., ATHIAS, A., HERBETH, B., GUYARD-DANGREMONT, V., ARTUR, Y., PAILLE, F., GAMBERT, P. & LALLEMANT, C. (1996) Opposite effects of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein on the size distribution of plasma high density lipoproteins. Physiological relevance in alcoholic patients., *J. Biol. Chem.* **271**, 19058-19065.

LAGROST, L. (1997) The role of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein in the remodeling of plasma high density lipoproteins., *Trend. Cardiovascular Med.*, sous presse

LASUNCION, M.A., IGLESIAS, A., SKOTTOVA, N., OROZCO, E. & HERRERA, E. (1990) High density lipoprotein subpopulations as substrates for the transfer of cholesteryl esters to very-low-density lipoproteins., *Biochem. J.* **270**, 441-449.

LUSIS, A.J., ZOLLMAN, S., SPARKES, R.S., KLISAK, I., MOHANDAS, T., DRAYNA, D. & LAWN, R.M. (1987) Assignment of the human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21., *Genomics* **1**, 232-235.

LYONS, F., LAKER, M.F., MARSDEN, J.R., MANUEL, R. & SHUSTER, S. (1982a) Effect of oral 13-*cis* retinoic acid on serum lipids., *Br. J. Derm.* **107**, 591-595.

LYONS, F., MARSDEN, J.R. & SHUSTER, S. (1982b) Comparison of 13-*cis* retinoic acid and cyproterone acetate on the clinical response, sebum secretion, dermal and epidermal lipogenesis in acne., *J. Invest. Dermatol*. **78**, 327.

MAIN, L.A., OHNISHI, T. & YOKOHAMA, S. (1996) Activation of human plasma cholesteryl ester transfer protein by human apolipoprotein A-IV., *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 17-24.

MANN, C.J., YEN, F.T., GRANT, A.M. & BIHAIN, B.E. (1991) Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia., *J. Clin. Invest.* **88**, 2059-2066.

MARCEL, Y.L., VEZINA, C., TENG, B. & SNIDERMAN, A. (1980) Transfer of cholesterol esters between human high density lipoproteins and triglyceride-rich lipoproteins controlled by a plasma protein factor., *Atherosclerosis* **35**, 127-133.

MARCEL, Y.L., MCPHERSON, R., HOGUE, M., CZARNECKA, H., ZAWADZKI, Z., WEECH, P.K., WHITLOCK, M.E., TALL, A.R. & MILNE, R.W. (1990) Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma from normolipidemic subjects., *J. Clin. Invest.* **85**, 10-17.

MAROTTI, K.R., CASTLE, C.K., MURRAY, R.W., REHBERG, E.F., POLITES, H.G. & MELCHIOR, G.W. (1992) The role of cholesteryl ester transfer protein in primate apolipoprotein A-I métabolism. Insights from studies with transgenic mice., *Arterioscler. Thromb.* **12**, 736-744.

MAROTTI, K.R., CASTLE, C.K., BOYLE, T.P., LIN, A.H., MURRAY, R.W. & MELCHIOR, G.W. (1993) Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein., *Nature* **364**, 73-75.

MARSDEN, J.R., TRINNICK, T.R., LAKER, M.F. & SHUSTER, S. (1984) Effects of isotretinoin on serum lipids and lipoproteins, liver and thyroid function., *Clin. Chim. Acta* **143**, 243-251.

MARTIN, L.J., CONNELLY, P.W., NANCOO, D., WOOD, N., ZHANG, Z.J., MAGUIRE, G., QUINET, E., TALL, A.R., MARCEL, Y.L. & MCPHERSON, R. (1993) Cholesteryl ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: relationship to apolipoprotein E genotype., *J. Lipid. Res.* **34**, 437-446.

MARZETTA, C.A., MEYERS, T.J. & ALBERS, J.J. (1993) Lipid transfer protein-mediated distribution of HDL-derived cholesteryl esters among plasma apo B-containing lipoprotein subpopulations., *Arterioscler. Thromb.* **13**, 834-841.

MASSON, D., ATHIAS, A. & LAGROST, L. (1996) Evidence for electronegativity of plasma high density lipoprotein-$_3$ as one major determinant of human cholesteryl ester transfer protein activity., *J. Lipid Res.* **37**, 1579-1590.

MASUCCI-MAGOULAS, L., MOULIN, P., JIANG, X.-C., RICHARDSON, H., WALSCH, A., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1995) Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice., *J. Clin. Invest.* **95**, 1587-1594.

MASUCCI-MAGOULAS, L., PUMP, A., JIANG, X.-C., WALSH, A., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1996) Profound induction of hepatic cholesteryl ester transfer protein transgene expression in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene knockout mice. A novel mechanism signals changes in plasma cholesterol levels., *J. Clin. Invest.* **97**, 154-161.

MCCLEAN, S.W., RUDDELL, M.E., GROSS, E.G. DEGIOVANNA, J.J. & PECK, G.L. (1982) Liquid-chromatographic assay for retinol (vitamin A) and retinol analogs in therapeutic trials., *Clin. Chim. Acta* **28**, 693-696.

MCPHERSON, R., HOGUE, M., MILNE, R.W, TALL, A.R. & MARCEL, Y.L. (1991a) Increase in plasma cholesteryl ester transfer protein during probucol treatment: Relation to changes in high density lipoprotein composition., *Arterioscler. Thromb.* **11**, 476-481.

MCPHERSON, R., MANN, C.J., TALL, A.R., HOGUE, M., MARTIN, L., MILNE, R.W. & MARCEL, Y.L. (1991b) Plasma concentrations of cholesteryl ester transfer protein in hypoalbuminemia. Relation to cholesteryl ester transfer protein activity and other lipoprotein variables., *Arterioscler. Thromb.* **11**, 797-804

MCPHERSON, R., GRUNDY, S.M., GUERRA, R. & COHEN, J.C. (1996) Allelic variation in the gene encoding the cholesteryl ester transfer protein is associated with variation in the plasma concentrations of cholesteryl ester transfer protein., *J. Lipid. Res.* **37**, 1743-1748.

MCPHERSON, R., LAU, P., KUSSIE, P., BARRETT, P. & TALL, A.R. (1997) Plasma kinetics of cholesteryl ester transfer protein in rabbit. Effects of dietary cholesterol., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **17**, 203-210.

MELCHIOR, G.W., GREENLEE, K.A., CASTLE, C.K., PROUGH, M.J., MILNE, R.W., MAROTTI, K.R. & KEZDY, F.J. (1995) Evidence that cynomolgus monkey cholesteryl ester transfer protein has two neutral lipid binding sites., *J. Biol. Chem.* **270**, 21068-21074.

MILNER, T.G., KO, K.W.S, OHNISHI, T. & YOKOHAMA, S. (1991) Enhancement of the human plasma lipid transfer protein reaction by apolipoproteins., *Biochim. Biophys. Acta* **1082**, 71-78.

MIYASHITA, Y., MORIMOTO, S., FUKUO, K., IMANAKA, S., KOH, E., TAMATANI, M. & OGIHARA, T. (1992) Participation of decreased serum cholesteryl ester transfer activity, independent of increased serum lipoprotein(a), in angina pectoris in normolipidemic elderly subjects., *Gerontology* **38**, 258-267.

MONTGOMERY, D.A.D., NEILL, D.W. & DOWDLE, E.D.B. (1962) Idiopathic hypoalbuminemia., *Clin. Sci.* **22**, 141-154.

MOORE , P.A. (1980) Liquid scintillation counting of polyacrylamide gels crosslinked with N, N'-methylene-bis-acrylamide and N, N'-diallyltartardiamide., *Anal. Biochem.* **108**, 151-155.

MORTON, R.E (1981) A plasma inhibitor of triglyceride and cholesteryl ester transfer activities., *J. Biol. Chem.* **256**, 11992-11995.

MORTON, R.E. & ZILVERSMIT, D.B. (1982) Purification and characterization of lipid transfer protein(s) from human lipoprotein-deficient plasma., *J. Lipid. Res.* **23**, 1058-1067.

MORTON, R.E. & ZILVERSMIT, D.B. (1983) Inter-relationship of lipids transferred by the lipid-transfer protein isolated from human lipoprotein-deficient plasma., *J. Biol. Chem.* **258**, 11751-11757.

MORTON, R.E. (1985) Binding of plasma-derived lipid transfer protein to lipoprotein substrates., *J. Biol. Chem.* **260**, 12593-12599.

MORTON, R.E. (1988a) Free cholesterol is a potent regulator of lipid transfer protein function., *J. Biol. Chem.* **263**, 12235-12241.

MORTON, R.E. (1988b) Interaction of plasma-derived lipid transfer protein with macrophages in culture., *J. Lipid. Res.* **29**, 1367-1377.

MORTON, R.E. & STEINBRUNNER, J.V. (1990) Concentration of neutral lipids in the phospholipid surface of substrate particles determines lipid transfer protein activity., *J. Lipid. Res.* **31**, 1559-1567.

MORTON, R.E. & STEINBRUNNER, J.V. (1993) Determination of lipid transfer inhibitor protein activity in human lipoprotein-deficient plasma., *Arterioscler. Thromb*. **13**, 1843-1851.

MORTON, R.E. & GREENE, D.J. (1994) Regulation of lipid transfer btween lipoproteins by an endogenous plasma protein: Selective inhibition among lipoprotein classes., *J. Lipid. Res.* **35**, 836-847.

MOULIN, P., APPEL, G.B., GINSBERG, H.N. & TALL, A.R. (1992) Increased concentration of plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome: role in dyslipidemia., *J. Lipid. Res*. **33**, 1817-1822.

MOULIN, P., CHEUNG, M.C., BRUCE, C., ZHONG, S., COCKE, T., RICHARDSON, H. & TALL, A.R. (1994) Gender effects on the distribution of the cholesteryl ester transfer protein in apolipoprotein AI defined lipoprotein subpopulations., *J. Lipid. Res.* **35**, 793-802.

NAGASHIMA, M., MCLEAN, J.W. & LAWN, R.M. (1988) Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein., *J. Lipid. Res.* **29**, 1643-1649.

NICHOLS, A.V. & SMITH, L. (1965) Effect of very low-density lipoproteins on lipid transfer in incubated serum., *J. Lipid. Res.* **6**, 206-210.

NICHOLS, A.V., GONG, E.L. & BLANCHE, P.J. (1981) Interconversion of high density lipoproteins during incubation of human plasma., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 391-399.

NISHIDA, H.I., KATO, H. & NISHIDA, T. (1990) Affinity of lipid transfer protein for lipid and lipoprotein particles as influenced by lecithin:cholesterol acyltransferase., *J. Biol. Chem.* **265**, 4876-4883.

NISHIDA, H.I., ARAI, H. & NISHIDA, T. (1993) Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins., *J. Biol. Chem.* **268**, 16352-16360.

NISHIDE, T., TOLLEFSON, J.H. & ALBERS, J.J. (1989) Inhibition of lipid transfer by a unique high density lipoprotein subclass containing an inhibitor protein., *J. Lipid. Res.* **30**, 149-158.

NISHIKAWA, O., YOKOHAMA, S., OKABE, H. & YAMAMOTO, A. (1988) Enhancement of non polar lipid transfert reaction through stabilization of substrate lipid particles with apolipoproteins., *J. Biochem.* **103**, 188-194.

NISHIWAKI, M. ISHIKAWA, T., HOMMA, Y., TADA, N., KAGAMI, A., OHSHIMA., K., IYTO, T., TOMIYASU, K., SHIGE, H., MIYAJIMA., E. & NAKAMURA., H. (1994a) Effects of pravastatin on plasma lipids, apolipoproteins, Lp(a), remnant-like particle, cholesteryl ester transfer protein, and lecithin:cholesterol acyltransferase; a 12-month study., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **4**, 10-15.

NISHIWAKI, M., ISHIKAWA, T., ITO, T., SHIGE, H., TOMIYASU, K., NAKAJIMA, K., KONDO, K., HASHIMOTO, H., SAITOH, K., MANABE, M., MIYAJIMA, E. & NAKAMURA, H. (1994b) Effects of alcohol on lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein, lecithin:cholestrol acyltransferase in high density lipoprotein cholesterol elevation., *Atherosclerosis* **111**, 99-109.

NOËL, S.P., DUPRAS, R., VENIZA, C. & MARCEL, Y.L. (1984) Comparison of very-low density lipoproteins isolated from rat liver perfusate, rat serum and human plasma as acceptors for cholesteryl ester transfer., *Biochim. Biophys. Acta* **796**, 277-284.

NOTARIO, A., ROLANDI, M.L. & MAZZUCCHELLI, I. (1996) Peripheral blood and bone marrow changes after treatment with ATRA and G-CSF in AML, APL and blast crisis following Vaquez's disease., *Haematologica* **81**, 261-264.

OHNISHI, T., YOKOHAMA, S. & YAMAMOTO, A. (1990) Rapid purification of human plasma lipid transfer proteins., *J. Lipid. Res*. **31**, 397-406.

OHNISHI, T. & YOKOHAMA, S. (1993) Activation of human lipid transfer protein by apolipoproteins., *Biochemistry* **32**, 5029-5035.

OLIVEIRA, H.C.F., CHOUINARD, R.A., AGELLON, L.B., BRUCE, C., MA, L., WALSH, A., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1996) Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences., *J. Biol. Chem.* **271**, 31831-31838.

PANJESHAHIN, M.R., YATES, M.S. & BOWMER, C.J. (1992) A comparison of drug binding sites on mammalian albumins., *Biochem. Pharma*. **44**, 873-879.

PAPE, M.E., REHBERG, E.F., MAROTTI, K.R. & MELCHIOR, G. (1991a) Molecular cloning, sequence, and expression of cynomolgus monkey cholesteryl ester transfer protein: Inverse correlation between hepatic cholesteryl ester transfer protein mRNA levels and plasma high density lipoprotein levels., *Arterioscler. Thromb.* **11**, 1759-1771.

PAPE, M.E., ULRICH, R.G., REA, T.J., MAROTTI, K.R. & MELCHIOR, G. (1991b) Evidence that nonparenchymal cells of the liver are the principal source of cholesteryl ester transfer protein in primates., *J. Biol. Chem.* **266**, 12829-12831.

PATSCH, J.., GOTTO, A.M., JR., OLIVECRONA, T. & EISENBERG S. (1978) Formation of high density lipoprotein$_2$-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins *in vitro*., *Proc. Natl. Acad. USA*. **75**, 4519-4523.

PATTNAIK, N.M., MONTES, A., HUGUES, L.B. & ZILVERSMIT D.B. (1978) Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization., *Biochim. Biophys. Acta* **530**, 428-438.

PATTNAIK, N.M. & ZILVERSMIT, D.B. (1979) Interaction of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles., *J. Biol. Chem.* **254**, 2782-2786.

PAUS, P.N. (1971) Solubilization of polyacrylamide gels for liquid scintillation counting., *Anal. Biochem*. **42**, 372-376.

PECK, G.L., OLSEN, T.G., YODEN, F.W., STRAUS, J.S, DOWNING, D.T., PANDYA, M., BUTKUS, D. & ARNAUD-BATTARDIER, J. (1979) Prolonged remissions of cystic and conglobate acne with 13-*cis* retinoic acid., *New Engl. J. Med.* **300**, 329-333.

PIETZONKA, T., DAMON, R., RUSSEL, M. & WATTANASIN, S. (1996) Phosphonate-containing analogs of cholesteryl ester as novel inhibitors of cholesteryl ester transfer protein., *Bioog. Med. Chem.* **6**, 1951-1954.

POLETTE, A., DURAND, P., FLOCCARD, B & BLACHE, D. (1992) A method for specific analysis of free fatty acids in biological samples by capillary gas chromatography., *Anal. Biochem*. **206**, 241-245.

PULCINI, T., TERRU, P., SPARROW, J.T., POWNALL, H.J. & PONSIN, G. (1995) Plasma factors affecting the in vitro conversion of high-density lipoproteins labeled with a non-transferable marker., *Biochim. Biophys. Acta* **1254**, 13-21.

PUSSINEN, P., JAUHIAINEN, M., METSO, J., TYYNELA, J. & EHNHOLM, C. (1995) Pig plasma phospholipid transfer protein facilitated HDL conversion., *J. Lipid. Res*. **36**, 975-985.

QUIG, D.W. & ZILVERSMIT, D.B. (1986) Disappearance and effects of exogenous lipid transfer activity in rats., *Biochim. Biophys. Acta* **879**, 171-178.

QUIG, D.W. & ZILVERSMIT, D.B. (1988) Plasma lipid transfer activity in rabbits: Effects of dietary hyperlipidaemia., *Atherosclerosis* **70**, 263-271.

QUIG, D.W. & ZILVERSMIT, D.B. (1990) Plasma lipid transfer activities., *Annu. Rev. Nutr.* **10**, 169-193.

QUIG, D.W., ARBEENY, C.M. & ZILVERSMIT, D.B. (1991) Effects of hyperlipidaemia in hamster on lipid transfer protein activity and unidirectional cholesteryl ester transfer in plasma., *Biochim. Biophys. Acta* **1083**, 257-264.

QUINET, E., AGELLON, L.B., KROON, P.A., MARCEL, Y.L., LEE, Y.C., WHITLOCK, M.E. & TALL, A. (1990) Atherogenic diet increase cholesteryl ester transfer protein messenger RNA levels in rabbit liver., *J. Clin. Invest.* **85**, 357-363.

QUINET, E., TALL, A., RAMAKRISHNAN, R. & RUDEL, L. (1991) Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins., *J. Clin. Invest.* **87**, 1559-1566.

QUINET, E., YANG, T.P., MARINOS, C. & TALL, A. (1993) Inhibition of the cellular secretion of cholesteryl ester transfer protein by a variant protein formed by alternative splicing of mRNA., *J. Biol. Chem.* **268**, 16891-16894.

RADEAU, T., LAU, P., ROBB, M., MCDONNELL, M., AILHAUD, G. & MCPHERSON, R. (1995) Cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA abundance in human adipose tissue: relationship to cell size and membrane cholesterol content., *J. Lipid. Res.* **36**, 2552-2561.

RAJARAM, O.V. & BARTER, P.J. (1986) Increases in the particle size of high-density lipoproteins induced by purified lecithin:cholesterol acyltransferase: effect of low-density lipoproteins., *Biochim. Biophys. Acta* **877**, 406-414.

RAJARAM, O.V. & SAWYER, W.H. (1997) Effects of charged lipids on the interaction of cholesteryl ester transfer protein with lipid emulsions., *Biochem. J.* **322**, 159-165.

RAVNIK, S.E., ZARUTSKIE, P.W. & MULLER, C.H. (1992) Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation., *Biol. Reprod*. **47**, 1126-1133.

REA, T.J., DEMATTOS, R.B. & PAPE, M.E. (1993) Hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in rabbits., *J. Lipid. Res.* **34**, 1901-1910.

RICHARDSON, M.A., BERG, D.T., JOHNSTON, P.A., MCCLURE, D. & GRINNELL, B.W. (1996) Human liposarcoma celle line, SW872, secretes cholesteryl ester transfer protein in response to cholesterol., *J. Lipid. Res.* **37,** 1162-1166.

RIEMENS, S.C., VAN TOL, A., HOOGENBERG, K., VAN GENT, T., SCHEEK, L.M., SLUITER, W.J. & DULLAART, R.P.F. (1997) Higher high density lipoprotein cholesterol associated with moderate alcohol consumption is not related to altered plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activity levels., *Clin. Chim. Acta* **258**, 105-115.

RIFAI, N. & KING, M.E. (1986) Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum., *Clin. Chem.* **32**, 957-961.

RINNINGER, F. & PITTMAN, R.C. (1989) Mechanism of the cholesteryl ester transfer protein-mediated uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester by $HepG_2$ cells., *J. Biol. Chem.* **264**, 6111-6118.

RITSCH,A., AUBER, B., FOGER, B., SCHWARZ, S. & PATSCH, J.R. (1993) Polyclonal antibody-based immunoradiometric assay for quantification of cholesteryl ester transfer protein., *J. Lipid. Res*. **34**, 673-679.

ROLLMAN, O. & VAHLQUIST, A. (1986) Oral isotretinoin (13-*cis* retinoic acid) therapy in severe acne: Drug and vitamin A concentrations in serum and skin., *J. Invest. Dermatol.* **86**, 384-389.

RUEHLING, K., ZABEL-LANGHENNING, R., TILL, U. & THIELMANN, K. (1989) Enhanced net mass transfer of HDL cholesteryl esters to apoB-containing lipoproteins in patients with peripheral vascular disease., *Clin. Chim. Acta* **184**, 289-296.

RYE, K.-A., GARETTY, K.H. & BARTER, P.J. (1992a) Changes in the size of reconstituted high density lipoproteins during incubation with cholesteryl ester transfer protein: The role of apolipoproteins., *J. Lipid. Res.* **33**, 215-224.

RYE, K-A. & BARTER, P.J. (1992b) Structure and function of apolipoproteins., M.Rosseneu, *Editor CRC Press, Inc., Boca Ration, FL*, 401-426.

RYE, K-A., HIME, N.J. & BARTER, P.J. (1997) Evidence that the cholesteryl ester transfer protein-mediated reductions in reconstituted high density lipoprotein size involve particule fusion., *J. Biol. Chem*. **272**, 3953-3960.

SAKAI, N., MATSUZAWA, Y., HIRANO, K.-I., YAMASHITA, S., NOZAKI, S., UEYAMA, Y., KUBO, M. & TARUI, S. (1991) Detection of two species of low density particles in cholesteryl ester transfer protein deficiency., *Arterioscler. Thromb.* **11**, 71-79.

SAKAI, N., SANTAMARINA-FOJO, S., YAMASHITA, S., MATSUZAWA, Y. & BREWER JR, H.B. (1996) Exon 10 skipping caused by intron 10 splice donor site mutation in cholesteryl ester transfer protein gene results in abnormal downstream splice site selection., *J. Lipid. Res.* **37**, 2065-2073.

SAKASHITA, A., KIZAKI, M., PAKKALA, S., SCHILLER, G., TSURUOKA, N., TOMOSAKI, R., CAMERON, J.F., DAWSON, M.I. & KOEFFLER, H.P. (1993) 9-*cis* retinoic acid: effects on normal and leukemic hematopoiesis *in vitro*., *Blood* **81**, 1009-1016.

SAMMET, D. & TALL, A.R. (1985) Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis., *J. Biol. Chem.* **260**, 6687-6697.

SAVOLAINEN, M.J., HANNUKSELA, M., SEPPANEN, S., KERVINEN, K. & KESAINEMI, Y.A. (1990) Increased high-density lipoprotein cholesterol in alcoholics is related to low cholesteryl ester transfer protein activity., *Eur. J. Clin. Invest.* **20**, 593-598.

SAXENA, U., WITTE, L.D. & GOLDBERG, I.J. (1989) Release of endothelial cell lipoproteins lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids., *J. Biol. Chem.* **264**, 4349-4355.

SCHMITZ, G., ASSMANN, G. & MELNIK, B. (1981) The role of lecithin:cholesterol transferase in high density lipoprotein$_3$ / high density lipoprotein$_2$ inter-conversion., *Clin. Chim. Acta* **119**, 225-236.

SCHUMANN, R.R., LEONG, S.R., FLAGGS, G.W., GRAY, P.W., WRIGHT, S.D., MATHISON, J.C., TOBIAS, P.S. & ULEVITCH, R.J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein., *Science* **249**, 1429-1431.

SCHWAB, U.S., MALIRANTA, H.M., SARKKINEN, E.S., SAVOLAINEN, M.J., KESÄNIEMI, Y.A. & UUSITUPA, M.I.J. (1996) Different effects of palmitic and stearic acid-enriched diets on serum lipids and lipoproteins and plasma cholesteryl ester transfer activity in healthy young women., *Metabolism* **45**, 143-149.

SEIP, R.L., MOULIN, P., COCKE, T., TALL, A.R., KOHRT, W.M., MANKOWITZ, K., SEMENKOVICH, C.H., OSTLUND, R; & SCHONFELD, G. (1993) Exercise training decreases plasma cholesteryl ester transfer protein., *Arterioscler. Thromb.* **13**, 1359-1367.

SERRAT-SERRAT, J., ORDONEZ-LLANOS, J. SERRA-GRIMA, R., GOMEZ-GERIQUE, J.A., PELLICER-THOMA, E., PAYES-ROMERO, A. & GONZALES-SASTRE, F. (1993) Marathon runners presented lower serum cholesteryl ester transfer activity than sedentary subjects., *Atherosclerosis* **101**, 43-49.

SHAFRIR, E. (1958) Partition of unesterified fatty acids in normal and nephrotic syndrome serum and its effect on serum electrophoretic pattern., *J. Clin. Invest.* **37**, 1775-1782.

SHEN, W., SCANU, A.M. & KEZDY, F. (1977) Structure of serum lipoproteins inferred from compositional analysis., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 837-841.

SHEPHERD, J., PACKARD, C.J., STEWARDT, J..M., VALLANCE, B.D., VEITCH LAWRIE, T.D. & GEMMEL-MORGAN, H. (1980) The relationship between the cholesterol content and subfraction distribution of plasma high-density lipoproteins., *Clin. Chim. Acta* **101**, 57-62.

SHETLAR, M.R., PAYNE, R.W., STIDWORTHYN G. & MOCK, D. (1959) Absence of serum albumin associated with rheumatoid arthritis., *Ann. Intern. Med.* **51**, 1379-1384.

SHIN, J., SEO, Y., RHO, J.-R. & BAEK, E. (1995) Suberitenones A and B: Sesterpenoids of an unprecedented skeletal class from the antartic sponge *suberites sp.*, *J. Org. Chem.* **60**, 7582-7588.

SHIRAI, BARNHARD, R.L. & JACKSON, R.L. (1981) Hydrolysis of human plasma high density lipoprotein$_2$, phospholipids and triglycerides by hepatic lipase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 591-599.

SMALL, D.M. (1992) Physical properties of fatty acids and their extracellular and intracellular distribution. Polyunsaturated fatty acids in human nutrition. Bracco U.K. and Deckelbaum R.J. Eds, Nestle Nutrition Workshop series, Vol. 28 Nestec Ltd., Vevey/Raven Press Ltd. New-York, 25-39.

SNIDERMAN, A., TENG, B., VEZINA, C. & MARCEL, Y.L. (1978) Cholesterol ester exchange between human plasma high and low density lipoproteins mediated by a plasma protein factor., *Atherosclerosis* **31**, 327-333.

SON, Y.S.C. & ZILVERSMIT, D.B. (1984) Purification and characterization of human plasma proteins that inhibit lipid transfer activities., *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 473-480.

SPARKS, D.L., FROHLICH, J. CULLIS, P. & PRITCHARD, P.H. (1987) Cholesteryl ester transfer activity in plasma measured by solid-phase-bound high density lipoproteins., *Clin. Chem.* **33**, 390-393.

SPARKS, D.L. & PRITCHARD, P.H. (1989a) Transfer of cholesteryl ester into high density lipoprotein by cholesteryl ester transfer protein: Effect of HDL lipid and apoprotein content., *J. Lipid. Res.* **30**, 1491-1498.

SPARKS, D.L., FROHLICH, J., LACKO, A.G. & PRITCHARD, P.H. (1989b) Relationship between cholesteryl ester transfer activity and high density lipoprotein composition in hyperlipidemic patients., *Atherosclerosis* **77**, 183-191.

SPARKS, D., FROHLICH, J.J & PRITCHARD, P.H. (1991) Lipid transfer proteins, hypertriglyceridemia, and reduced high-density lipoprotein cholesterol., *Am. Heart J.* **122**, 601-607.

SPARKS, D.L. & PHILIPS, M.C. (1992) Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis., *J. Lipid. Res.* **33**, 123-130.

SPÄTH, P.J. & KOBLET, H. (1979) Properties of SDS-polyacrylamide gels highly cross-linked with N, N' diallyltartardiamide on the rapid isolation of macromolecule from the gel matrix., *Anal. Biochem.* **93**, 273-285.

SPECTOR, A.A. (1975) Fatty acid binding to plasma albumin., *J. Lipid. Res.* **16**, 165-179.

SPERKER, B., MARK, M. & BUDZINSKI, R.M. (1993) The expression of the human plasma cholesteryl ester transfer protein in $HepG_2$ is induced by sodium butyrate. Quantification of low mRNA levels by polymerase chain reaction., *Eur. J. Biochem.* **218**, 945-950.

STEIN, Y., STEIN, O., OLIVECRONA, T. & HALPERIN, G. (1985) Putative role of cholesteryl ester transfer protein in removal of cholesteryl ester from vascular interstitium, studied in a model system in cell culture., *Biochim. Biophys. Acta* **834**, 336-345.

STEIN, O., HALPERIN, G. & STEIN, Y. (1986) Cholesteryl ester efflux from extracellular and cellular elements of the arterial wall. Model systems in culture with cholesteryl linoleyl ether., *Arteriosclerosis* **6**, 70-78.

STEVENSON, S.C., WANG, S., DENG, L. & TALL, A.R. (1993) Human plasma cholesteryl ester transfer protein consists of a mixture of two forms reflecting variable glycosylation at $asparagine_{341}$., *Biochemistry* **32**, 5121-5126.

SUGANO, M. & MAKINO, N. (1996) Changes in plasma lipoprotein cholesterol levels by antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl ester transfer protein in cholesterol-fed rabbits., *J. Biol. Chem.* **271**, 19080-19083.

SWENSON, T.L., SIMMONS, J.S., HESLER, C.B., BISGAIER, C. & TALL, A.R. (1987) Cholesteryl ester transfer protein is secreted by HepG2 cells and contains asparagine-linked carbohydrate and sialic acid., *J. Biol. Chem.* **262**, 16271-16274.

SWENSON, T.L., BROCIA, R.W. & TALL, A.R. (1988) Plasma cholesteryl ester transfer protein has binding sites for neutral lipids and phospholipids., *J. Biol. Chem.* **263**, 5150-5157.

SWENSON, T.L., HESLER, C.B., BROWN, M.L., QUINET, E., TRITTA, P.P., HASLANGER, M.F., GAETA, F.C.A., MARCEL, Y.L., MILNE, R.W. & TALL, A.R. (1989) Mechanism of cholesteryl ester transfer protein inhibition by a neutralizing monoclonal antibody and mapping of the monoclonal antobody epitope., *J. Biol. Chem.* **264**, 14318-14326.

TAKAHASHI, K., JIANG, X.C, SAKAI, N., YAMASHITA, S., HIRANO, K., BUJO, H., YAMAZAKI, H., KUSUNOKI, J., MIURA, T., KUSSIE, P., MATSUZAWA, Y., SAITA, Y. & TALL, A. (1993) A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins., *J. Clin. Invest.* **92**, 2060-2064.

TALL, A.R., BLUM, C.B., FORESTER,, G.P. & NELSON, C.A. (1982) Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat., *J. Biol. Chem.* **257**, 198-207.

TALL, A.R., SAMMET, D., VITA, G.M., DECKELBAUM, R. & OLIVECRONA, T. (1984) Lipoprotein lipase enhances the cholesteryl ester transfer protein-mediated transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to very low density lipoproteins., *J. Biol. Chem*. **259**, 9587-9594.

TALL, A., SAMMETT, D. & GRANOT, E. (1986a) Mechanisms of enhanced cholesteryl ester transfer from high density lipoproteins to apolipoprotein B-containing lipoproteins during alimentary lipemia., *J. Clin. Invest.* **77**, 1163-1172.

TALL, A.R. (1986b) Plasma lipid transfer proteins., *J. Lipid. Res*. **27**, 361-367.

TALL, A., GRANOT, E., BROCIA, R., TABAS, I;, HESLER, C., WILLIAMS, K. & DENKE, M; (1987) Accelerated transfer of cholesteryl esters in dyslipidemic plasma. Role of cholesteryl ester transfer protein., *J. Clin. Invest*. **79**, 1217-1225.

TALL, A.R. (1993) Plasma cholesteryl ester transfer proteins., *J. Lipid. Res.* **34**, 1255-1274.

TALL, A. (1995) Plasma lipid transfer proteins., *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 235-257.

TALLMAN, M.S. (1996) Differentiating therapy with all-*trans* retinoic acid in acute myeloid leukemia., *Leukemia* **10**, S12-S15.

TAMMINEN, M., KAKKO, S., ANTERO KESNIEMI, Y. & SAVOLAINEN, M.J. (1996) A polymorphic site in the 3' untranslated region of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene is associated with low CETP activity., *Atherosclerosis* **124**, 237-247.

TOHDA, S., CURTIS, J.E., MCCULLOCH, E.A. & MINDEN, M.D. (1992) Comparison of the effects of all-*trans* and *cis*-retinoic acid on the blast stem cells of acute myeloblastic leukemia in culture., *Leukemia* **6**, 656-661.

TOLLEFSON, J.H., FAUST, R., ALBERS, J.J. & CHAIT, A. (1985) Secretion of a lipid transfer protein by human monocyte-derived macrophages., *J. Biol. Chem.* **260**, 5887-5890.

TOLLEFSON, J.H., LIU, A. & ALBERS, J.J. (1988) Regulation of plasma lipid transfer by the high-density lipoproteins., *Am. J. Physiol.* **255**, E894-E902.

TU, A.-Y., NISHIDA, H.I. & NISHIDA, T. (1993) High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein., *J. Biol. Chem*. **268**, 23098-23105.

URIEN, S., CLAUDEPIERRE, P., NGUYEN, P., CHASSANY, O., MEYER, J., BRANDT, R. & TILLEMENT, J.-P. (1994) Binding of retinoid analogues to albumin and lipoproteins of human plasma., *Int. J. Clin. Pharm. Res.* **14**, 115-118.

VAHLQUIST, C., MICHÄELSSON, G., VAHLQUIST, A. & VESSBY, B. (1985) A sequential comparison of etretinate (tigason) and isotretinoin (roaccutane) with special regard to their effects on serum lipoproteins., *Brit. J. Derm.* **112**, 69-76.

VÄLIMÄKI, M., KAHRI, J., LAITINEN, K., LAHDENPERÄ, S., KUUSI, T., EHNHOLM, C., JAUHIAINEN, M., BARD, J.M., FRUCHART, J.C. & TASKINEN, M.-R. (1993) High density lipoprotein subfractions, apolipoprotein A-I containing lipoproteins, lipoprotein(a), and cholesteryl ester transfer protein activity in alcoholic women before and after ethanol withdrawal., *Eur. J. Clin. Invest.* **23**, 406-417.

WALDMANN, T.A, GORDON, R.S. & ROSS, W. (1964) Studies on the metabolism of the serum proteins and lipids in a patient with analbuminemia., *Am. J. Med.* **37**, 960-968.

WALLIS, E.S. & LANE, J.F. (1948) The Hoffman reaction (chapter 7) in Organic reactions, (Adams, R. Ed) *John Wiley & Sons, New York, vol*. **III**, 267-306.

WANG, S., DENG, L., BROWN, M.L., AGELLON, L.B. & TALL, A.R. (1991) Structure-function studies of human cholesteryl ester transfer protein by linker insertion scanning mutagenesis., *Biochemistry* **30**, 3484-3490.

WANG, S., WANG, X., DENG, L., RASSART, E., MILNE, R.W. & TALL, A.R. (1993) Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody., *J. Biol. Chem.* **268**, 1955-1959.

WANG, S., KUSSIE, P., DENG, L. & TALL, A. (1995) Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid., *J. Biol. Chem.* **270**, 612-618.

WARREN, R.J., EBERT, D.L., BARTER, P.J. & MITCHELL, A. (1991) The regulation of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein in the cholesterol fed rabbit., *Biochim. Biophys. Acta* **1086**, 354-358.

WEINSTEIN, D.B. (1979) A single-step adsorption method for removal of lipoproteins and preparation of cholesterol-free serum., *Circulation* **59**, II-54.

WEINSTOCK, J.V., KAWANISHI, H. & SISSON, J. (1979) Morphologic, biochemical and physiologic alterations in a case of idiopathic hypoalbuminemia (analbuminemia)., *Am. J. Med.* **67**, 132-139.

WHITLOCK, M.E., SWENSON, T.L., RAMAKRISHNAN, R., LEONARD, M.T., MARCEL, Y.L., MILNE, R.W. & TALL, A.R. (1989) Monoclonal antibody inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity in the rabbit. Effects on lipoprotein composition and high denisty lipoprotein cholesteryl ester metabolism., *J. Clin. Invest.* **84**, 129-137.

XIA, Y., MIRZAI, B., CHAKAMANNIL, S., CZARNIECKI, M., WANG, S., CLEMMONS, A., AHN, H.-S. & BOYKOW, C. (1996) Substituted 1, 3, 5-triazines as cholesteryl ester transfer protein inhibitor., *Bioog. Med. Chem.* **6**, 919-922.

YAMADA, T., KAWATA, M., ARAI, H., FUKASAWA, M., INOUE, K. & SATO, T. (1995) Astroglial localization of cholesteryl ester transfer protein in normal and Alzheimer's disease brain tissue., *Acta Neuropathol.* **90**, 633-636.

YAMASHITA, S., MATSUZAWA, Y., OKAZAKI, M., KAKO, H., YASUGI, T., AKIOKA, H., HIRANO, K. & TARUI, S. (1988) Small polydisperse low density lipoproteins in familial hyperalphalipoproteinemia with complete deficiency of cholesteryl ester transfer activity., *Atherosclerosis* **70**, 7-12.

YANG, T.-Y., AGELLON, L.B., WALSH, A., BRESLOW, J.L. & TALL, A.R. (1996) Alternative splicing of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice., *J. Biol. Chem*. **271**, 12603-12609.

YEN, F.T., DECKELBAUM, R.J., MANN, C.J., MARCEL, Y.L., MILNE, R.W. & TALL, A.R. (1989) Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody: Effect on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma., *J. Clin. Invest*. **83**, 2018-2024.

YEN, F.T., MANN, C.J., GUERMANI, L.M., HANNOUCHE, N.F., HUBERT, N., HORNICK, C.A., BORDEAU, V.N., AGNANI, G. & BIHAIN, B.E. (1994) Identification of a lipolysis stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein., *Biochemistry* **33**, 1172-1180.

ZECH, L.A., GROSS, E.G., MCCLEAN, S.W., PECK, G.L. & BREWER, H.B. (1981) Lipoprotein metabolism in patients receiving synthetic retinoids, isotretinoin and etretinate., *Arteriosclerosis* **1/5**, 390a.

ZECH, L.A., GROSS, E.G., PECK, G.L. & BREWER, H.B. (1983) Changes in plasma cholesterol and triglyceride levels after treatment with oral isotretinoin. A prospective study., *Arch. Derm.* **119**, 987-993.

ZHONG, S., SHARP, D.S., GROVE, J.S., BRUCE, C., YANO, K., CURB, J.D. & TALL, A.R. (1996) Increased coronary heart disease in japanese-american men with mutations in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels., *J. Clin. Invest*. **97**, 2917-2923.

ANNEXES

ANNEXE 1

Evidence for nonesterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma.

LAGROST, L., FLORENTIN, E., GUYARD-DANGREMONT, V., ATHIAS, A., GANDJINI, H., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **15**, 1388-1396 (1995)

Evidence for Nonesterified Fatty Acids as Modulators of Neutral Lipid Transfers in Normolipidemic Human Plasma

Laurent Lagrost, Emmanuel Florentin, Valérie Guyard-Dangremont, Anne Athias, Hassan Gandjini, Christian Lallemant, Philippe Gambert

Abstract The relations between the level of plasma nonesterified fatty acid (NEFA) and both the mass concentration and activity of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) were studied in fasted normolipidemic subjects. Plasma NEFA correlated positively with both CETP mass concentration ($r=.50$; $P<.01$) and the transfer of cholesteryl ester from HDL toward plasma VLDL+LDL ($CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity) ($r=.46$; $P<.05$) but not with the transfer of cholesteryl ester from LDL toward plasma HDL ($CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity) ($r=-.05$; NS). The high binding capacity of albumin for NEFA was used to investigate whether lipoprotein-bound NEFAs were implicated in the modulation of the cholesteryl ester transfer reaction. As compared with nonsupplemented controls, the addition of an excess of fatty acid–free albumin (8 g/L) to total normolipidemic plasmas reduced $CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity (18.3±5.5% versus 9.8±3.1%; $P<.0001$) but not $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity (22.3±4.5% versus 23.3±5.1%; NS). Moreover, $CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ and $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activities correlated negatively when measured in native plasma ($r=-.45$; $P<.05$) but positively when measured in albumin-supplemented plasma ($r=.40$; $P<.05$). In long-term incubation experiments, lipoprotein-bound NEFA increased the net mass transfer of cholesteryl esters from HDL toward VLDL+LDL but reduced the net mass transfer of triglycerides in the opposite direction, from VLDL+LDL toward HDL. Taken together, data of the present study brought strong and concordant arguments in favor of a dual effect of plasma NEFA in modulating both the mass and the activity of CETP in vivo. (***Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15: 1388-1396.)**

Key Words • plasma • lipoprotein • cholesteryl ester • triglyceride • cholesteryl ester transfer protein

In human plasma, the exchange of neutral lipids, ie, cholesteryl esters and triglycerides, between plasma lipoproteins is mediated by a specific factor, the CETP.[1,2] The activity of CETP results in the redistribution of cholesteryl esters, synthesized within HDL by the LCAT,[3] toward VLDL and LDL.[4,5] Numerous clinical investigations have clearly evidenced that, in humans, increased concentrations of LDL and reduced concentrations of HDL are associated with the development of atherosclerosis.[6,7] Thus, by catalyzing the transfer of cholesteryl esters from HDL toward VLDL and LDL, CETP could be regarded as a potentially atherogenic factor.[8,9] That latter concept is in good agreement with the positive correlation between plasma CETP concentrations and the extent of coronary artery atherosclerosis in monkeys,[10] with the increase in both the severity and progression of atherosclerotic lesions in CETP-transgenic mice as compared with control animals,[11] as well as with the inverse relation between CETP activity and HDL cholesterol concentrations in normal[12,13] and CETP-deficient subjects.[14,15] Recent in vivo studies brought circumstantial evidence for the regulation of the CETP gene expression by environmental factors, among them the fat content of the diet.[9] Complementary in vitro studies demonstrated that NEFAs with various chain length can upregulate both the expression of the CETP gene and the secretion of the protein in cultured cell models.[16,17] In addition to plasma CETP concentration,[18,19] a number of factors are susceptible to influence the plasma CET activity, among them the concentration and composition of donor and acceptor lipoprotein substrates.[9,20] Lipoprotein lipase has been shown to enhance the CETP-mediated transfer of cholesteryl esters from HDL toward VLDL as the result of the accumulation of lipolytic products, such as NEFAs, in the lipoprotein surfaces.[21,22] In vitro, oleic acid can mimic the effect of VLDL lipolysis by enhancing the binding of CETP to lipoprotein substrates and increasing the rate at which cholesteryl esters are transferred from HDL toward VLDL[22] or from HDL toward LDL.[23] The effect of NEFA on the CETP-mediated transfer of cholesteryl esters is dependent on the ionization of the carboxylic group[22] and on the structure of the acyl chain.[24,25] Therefore, results from these latter studies indicate that NEFA might increase not only the synthesis but also the activity of CETP. Earlier studies[26,27] have suggested that reciprocal transfers of neutral lipids between plasma lipoprotein fractions are closely linked. However, complementary investigations have challenged this concept by indicating that the transfer of esterified cholesterol and triglycerides between lipoproteins does not involve a simple molecular exchange of one moiety for the other but is achieved by processes that are at least partially independent.[28-30] In particular, oleic acid has been shown recently to reduce the net mass of triglycerides transferred from triglyceride-rich lipoproteins to HDL while increasing the net transfer of cholesteryl esters in the

Received March 7, 1995; revision accepted June 26, 1995.

From the Laboratoire de Biochimie des Lipoprotéines, INSERM CJF 93-10, Faculté de Médecine, Dijon, France.

Presented in part at the 65th Scientific Sessions of the American Heart Association, New Orleans, La, and published in abstract form (*Circulation*. 1992;86[suppl I]:I-71.)

Correspondence to Laurent Lagrost, Laboratoire de Biochimie Médicale, Hôpital du Bocage, 21034 Dijon, France.

© 1995 American Heart Association, Inc.

Selected Abbreviations and Acronyms

apo = apolipoprotein
$CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ = cholesteryl ester transfer from HDL toward VLDL+LDL
$CET_{LDL \rightarrow HDL}$ = cholesteryl ester transfer from LDL toward HDL
CETP = cholesteryl ester transfer protein
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
FSD = fumed silicon dioxide
LCAT = lecithin:cholesterol acyltransferase
NEFA = nonesterified fatty acid
LTIP = lipid transfer inhibitor protein
PLTP = phospholipid transfer protein

reverse direction, from HDL toward triglyceride-rich lipoproteins.[30] These results suggest that NEFAs could dissociate the heteroexchange of neutral lipids between HDL and lipoproteins of lower density. However, the significance of the modulation by NEFA of lipid transfers in vivo is still uncertain and, in particular, the ability of physiological concentrations of NEFA to influence CETP activity in total plasma remains to be established.

The goals of the present study were to determine whether NEFAs in fasting human plasma can modulate CETP-mediated cholesteryl ester transfers and to investigate their effects on the reciprocal exchange of cholesteryl esters and triglycerides between HDL and apo B–containing lipoproteins.

Methods

Subjects

The study subjects were normolipidemic, nonsmoking healthy volunteers recruited among the biomedical laboratory personnel. Informed consent was obtained. Subjects did not take drugs other than oral contraceptives. Venous blood samples were collected in Na EDTA–containing tubes after an overnight fast and a 15-minute complete rest. Plasmas were promptly separated by low-speed centrifugation at 4°C and kept at the same temperature. All samples were analyzed within a few hours after collection.

Lipoprotein Preparation

Lipoprotein fractions were isolated from total normolipidemic plasmas by sequential ultracentrifugation at 100 000 rpm (350 000*g*) in a TLA-100.2 rotor in a Beckman TL-100 ultracentrifuge. LDL was isolated as the plasma fraction $1.019<d<1.055$ g/mL with one 4-hour spin at the lowest density and two 5-hour spins at the highest density. HDL_3 was isolated as the plasma fraction $1.13<d<1.21$ g/mL with one 5-hour spin at the lowest density and two 7-hour spins at the highest density. Lipoproteins were recovered by tube slicing and were then dialyzed overnight against a buffer of 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl (pH 7.4) containing 5 mmol/L EDTA-Na_2 and 3 mmol/L NaN_3 (TBS buffer).

Purification of CETP

CETP was partially purified from citrated human plasma according to the sequential procedure previously described.[31] Briefly, the ultracentrifugally isolated $d>1.21$ g/mL plasma proteins were fractionated successively by hydrophobic interaction chromatography on a phenyl-Sepharose CL-4B column, affinity chromatographies on Heparin-Ultrogel A4R and Blue-Trisacryl columns, and anion-exchange chromatography on a Mono-Q HR 5/5 column. Chromatographic separations were performed by using a fast protein liquid chromatography system (Pharmacia). The preparation of CETP was deficient in LCAT activity and PLTP activity.[31]

Radiolabeling of LDL and HDL_3

HDL_3 was biosynthetically labeled according to the general procedure previously described.[32] A $d>1.13$ g/mL plasma fraction was obtained after ultracentrifugation of 20 mL total normolipidemic plasma, dialyzed against TBS, and incubated with 10 nmol [1α, 2α(n)-^{3}H]cholesterol (specific activity, 46 Ci/mmol; Amersham) for 24 hours at 37°C in a shaking water bath. Subsequently, the $1.019<d<1.055$ g/mL fraction obtained from 10 mL total normolipidemic plasma (about 15 mg LDL cholesterol) was added to the incubated mixtures. The incubation was then prolonged for a 6-hour period to allow the exchange of radiolabeled esterified cholesterol between lipoprotein substrates. That procedure presents two main advantages: (1) radiolabeled HDL_3 and LDL are prepared in the same batch and (2) HDL_3 is replete with unlabeled nonesterified cholesterol during the 6-hour prolongation of the incubation in the presence of isolated LDL. At the end of the incubation, the LDL and HDL_3 fractions were recovered by sequential ultracentrifugation as described above. Typical labeled preparations of LDL and HDL_3 obtained with this procedure had specific activities of approximately 7000 and 28 000 cpm/nmol of cholesterol, respectively. As judged by thin-layer chromatography, more than 95% of total radioactivity of both lipoprotein substrates resided in the cholesteryl ester moiety.

Isotopic Assays of Plasma CET Activity

The CET activity of a sample was measured as its capacity to promote the transfer of radiolabeled cholesteryl esters from donor to acceptor lipoprotein substrates. In native plasma, total CET activity was evaluated by measuring the rate of radiolabeled cholesteryl esters transferred either from HDL_3 to endogenous apo B–containing plasma lipoproteins ($CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity) or from LDL to endogenous plasma HDL ($CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity). For that purpose, a tracer dose (2.5 nmol of cholesterol) of either radiolabeled HDL_3 or radiolabeled LDL was added to 25 μL of plasma in a final volume of 50 μL. Plasma LCAT activity was blocked by adding iodoacetate (final concentration, 1.5 mmol/L). In some experiments, fatty acid–free albumin (Sigma) was added (final concentration, 8 g/L). Duplicate mixtures were incubated for 3 hours at 37°C in an incubator. At the end of the incubation, the tubes were immediately placed on ice. A volume of 45 μL of the incubated mixtures was adjusted to density 1.07 g/mL Kbr in a final volume of 2 mL in Quickseal centrifugation tubes (Beckman). The tubes were then sealed and subjected to ultracentrifugation for 7 hours at 50 000 rpm (269 000*g*) in a 50.4 Ti rotor in an L7 ultracentrifuge (Beckman). The plasma fractions of $d<1.068$ g/mL (plasma apo B–containing lipoproteins) and of $d>1.068$ g/mL (HDL-containing plasma fraction) were recovered in a volume of about 1 mL and transferred into counting vials. A volume of 2 mL scintillation fluid (Opti-Scint Hisafe 3, Pharmacia) was added to each vial, and the radioactivity was assayed for 5 minutes in a Wallac 1410 liquid scintillation counter (Pharmacia). The recovery of total radioactivity in the $d<1.068$ and $d>1.068$ g/mL fractions was constantly greater than 95%. In nonincubated controls containing radiolabeled HDL_3, the radioactivity recovered in the $d<1.068$ g/mL fraction did not exceed 4% of the total. In nonincubated controls containing radiolabeled LDL, less than 10% of the radioactivity was recovered in the $d>1.068$ g/mL fraction. CET activity was measured as the rate of total radiolabeled cholesteryl esters transferred from the lipoprotein tracer to the $d<1.068$ g/mL or the $d>1.068$ g/mL acceptor fraction during a 3-hour incubation at 37°C after deduction of blank values of control mixtures kept at 4°C.[33] Results were expressed in percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred.

Cholesteryl Ester and Triglyceride Mass Transfer Assay

The mass transfer of cholesteryl esters and triglycerides between HDL and apo B–containing lipoproteins was measured during the long-term incubation of total plasma at 37°C in the presence of an LCAT inhibitor.[34] For that purpose, 100 μL aliquots of total plasma were supplemented with iodoacetate (final concentration, 1.5 mmol/L) and incubated at 37°C for 24 hours. At the end of incubation, apo B–containing lipoproteins were selectively precipitated with a phosphotungstic acid/$MgCl_2$ reagent (Boehringer Mannheim) as recommended by the manufacturer. Unesterified cholesterol, total cholesterol, and triglyceride concentrations present in the supernatant were measured, and the mass of esterified cholesterol and triglycerides transferred were calculated as compared with control samples maintained at 4°C.

CETP ELISA

CETP concentration in total human plasma was measured by using a competitive ELISA on a Biomek 1000 Biorobotic System (Beckman Instruments).[35] Calibration was carried out by comparison with a standard curve obtained with a frozen plasma standard.[35] Calculation of CETP concentrations was realized by using a data analysis software (Immunofit EIA/RIA Data Analysis Software, Beckman). The CETP concentration value for each plasma sample was calculated by averaging quadruplicate determinations. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 4% and 6%, respectively.

Specific CET Activity

$CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ and $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ specific activities were calculated as the ratio of plasma CET activity to plasma CETP mass concentration and expressed in percentage of total radiolabeled cholesteryl esters transferred per microgram of CETP.

Precipitation of the Total Plasma Lipoprotein Fraction

Lipoproteins were removed from total human plasma by using a single-step adsorption method based on the ability of FSD (SERVA Feinbiochemica) to remove large particles, such as lipid emulsions and lipoprotein particles, from aqueous media.[36-38] Briefly, total plasmas were treated for 10 minutes at room temperature with various concentrations of FSD according to the general procedure previously described.[38] At the end of the incubation, precipitates were removed by low-speed centrifugation, and remaining amounts of NEFA, cholesterol, apo B, apo A-I, and albumin were assayed in the supernatants.

Other Analytical Methods

All chemical assays were performed on a Cobas-Fara Centrifugal Analyzer (Roche). Total cholesterol, unesterified cholesterol, and triglyceride concentrations were measured by enzymatic methods using Boehringer reagents. HDL cholesterol was determined after precipitation of apo B–containing lipoproteins with phosphotungstic acid/$MgCl_2$ as described above. Concentrations of plasma apo B, apo AI, and apo AII were determined by immunoturbidimetry[39] with anti-apo B, anti-apo AI, and anti-apo AII antibodies purchased from Behring. Apo B and apo AI standards were purchased from Behringwerke AG. Apo AII standard was purchased from Immuno AG. NEFA concentrations were determined by using both a commercially available enzymatic kit (Wako Pure Chemical Industries) and a capillary gas chromatography procedure.[40] By use of the statistical method of Bland and Altman,[41] a good agreement was observed between enzymatic and gas chromatography plasma NEFA determinations. Albumin concentrations were measured by using the A-Gent Albumin Test from Abbott.

Statistical Analysis

Student's t test was used to determine the significance of the difference between data means. Coefficients of correlation were calculated by using linear regression analysis. Multiple regression analysis was used to determine significant contributions of triglycerides, HDL cholesterol, VLDL+LDL cholesterol, and NEFA to the prediction of CET activity in human plasma.

Results

Relations Between CETP Mass Concentrations and Lipoprotein Parameters in Normolipidemic Human Plasma

Plasma CETP concentrations were determined among a population of 27 normolipidemic subjects (plasma cholesterol range, 121 to 234 mg/dL; plasma triglyceride range, 27 to 84 mg/dL; plasma NEFA range, 0.07 to 0.73 mmol/L) by using a competitive ELISA as described under "Methods." Plasma CETP levels (0.28±0.06 mg/dL; range, 0.19 to 0.42 mg/dL) were significantly and positively correlated only with the level of NEFA (r=.50; P=.008) and the VLDL+LDL:HDL cholesterol ratio (r=.39; P=.043). In contrast, no significant relations were observed between CETP and other lipid or apolipoprotein components.

Correlation of Plasma NEFA Concentration With CET Activity

CETP activity was evaluated by measuring the transfer of tritiated cholesteryl esters from a tracer dose of exogenous radiolabeled lipoproteins toward endogenous plasma lipoprotein fractions (see "Methods"). As shown in Fig 1, the addition of increasing concentrations of purified CETP to total normolipidemic plasmas resulted in CET assays that gave linear response and permitted the measurement of plasma CETP activity over a wide range of values.

Among a population of 37 normolipidemic subjects (plasma total cholesterol range, 121 to 240 mg/dL; plasma triglyceride range, 27 to 142 mg/dL; plasma NEFA range, 0.07 to 1.02 mmol/L), the rate of transfer of cholesteryl esters from radiolabeled HDL_3 to the d<1.068 g/mL fraction correlated positively with total NEFA concentrations (r=.46, P<.005) (Fig 2), while no significant relation was observed with plasma albumin levels (results not shown).

To investigate further the effect of NEFA on the bidirectional transfer of cholesteryl esters between HDL and VLDL+LDL plasma fractions, CET activity was measured in 27 normolipidemic plasmas (total cholesterol range, 121 to 234 mg/dL; plasma triglyceride range, 27 to 84 mg/dL) in two ways, either from a tracer dose of radiolabeled HDL_3 toward plasma apo B–containing lipoproteins ($CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity) or from a tracer dose of LDL toward plasma HDL ($CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity). As shown in Table 1, $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity correlated negatively with HDL cholesterol and esterified cholesterol:triglyceride ratio in HDL and correlated positively with VLDL+LDL cholesterol, VLDL+LDL:HDL cholesterol ratio, plasma triglyceride, and NEFA concentrations. Conversely, $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity correlated negatively with VLDL+LDL cholesterol, VLDL+LDL:HDL cholesterol ratio, and triglyceride levels and positively with HDL cholesterol levels. In contrast to $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity, $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity did not correlate significantly with

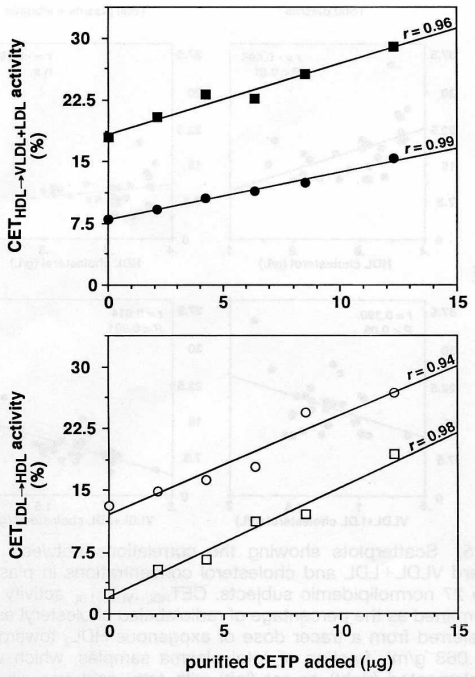


FIG 1. Line graphs showing the relations between purified CETP amounts added to total normolipidemic plasmas and CET activity values. $CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity (top) was determined as the percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous HDL_3 toward the plasma $d<1.068$ g/mL fraction. $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity (bottom) was determined as the percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous LDL toward the plasma $d>1.068$ g/mL fraction (see "Methods").

NEFA concentrations (Table 1). Multiple regression analysis revealed that plasma triglyceride, HDL cholesterol, VLDL+LDL cholesterol, and NEFA concentrations, when combined in a four-variable model, accounted for 75% of the variability in $CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity, with only NEFA reaching a significant level ($P=.025$), and for 68% of the variability in $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity, with both HDL cholesterol and VLDL+LDL cholesterol levels reaching significant levels ($P=.033$ and $P=.010$, respectively). Correlations between plasma NEFA concentration and

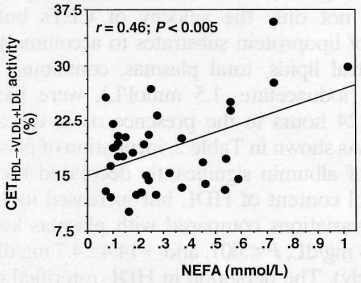


FIG 2. Scatterplot showing the correlation of CET toward VLDL+LDL with NEFA concentrations in plasmas from 37 normolipidemic subjects. $CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity was determined as the percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous HDL_3 toward the plasma $d<1.068$ g/mL fraction (see "Methods").

TABLE 1. Correlation Between Plasma CETP Activities and Plasma Lipid Parameters in 27 Normolipidemic Subjects

	$CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ Activity*	$CET_{LDL\rightarrow HDL}$ Activity†
Plasma cholesterol	.14	−.23
Plasma triglycerides	.53‡	−.46§
VLDL+LDL cholesterol	.40§	−.48§
HDL cholesterol	−.50‡	.45§
VLDL+LDL cholesterol / HDL cholesterol	.70‖	−.69‖
HDL cholesteryl esters / HDL triglycerides	−.60‡	.21
Apo B	.47§	−.48§
Apo AI	−.12	.05
NEFA	.46§	−.05

Values are linear regression coefficients (r).

*$CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity was determined as the percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous HDL_3 toward the plasma $d<1.068$ g/mL fraction.

†$CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity was determined as the percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous LDL toward the plasma $d>1.068$ g/mL fraction (see "Methods").

§$P<.05$; ‡$P<.01$; ‖$P<.001$.

specific CET activities calculated as the ratio of plasma CET activity to plasma CETP mass concentration did not reach the significance level.

Distribution of NEFA in Normolipidemic Human Plasma

To evaluate the relative proportions of lipoprotein-bound and albumin-bound NEFA, lipoproteins were removed from total human plasma by using FSD, as described under "Methods." As shown in Fig 3, precipitated amounts of total plasma cholesterol, apo B, and apo AI increased gradually while raising the final concentration of FSD. When present at a concentration of 2.5 mg/mL, FSD removed the totality of plasma lipoprotein components, whereas only 5% of plasma albumin was coprecipitated (Fig 3). Interestingly, specific removal of plasma lipoproteins was accompanied by an approximately 20% reduction in plasma NEFA concentration (Fig 3). NEFA content of the plasma lipoprotein fraction was determined in 14

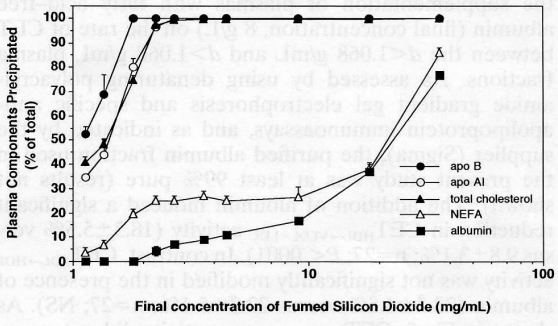


FIG 3. Line graph showing the concentration-dependent precipitation of plasma components by FSD. One pool of normolipidemic plasmas was treated with increasing concentrations of FSD as described under "Methods." Remaining amounts of apo B, apo AI, total cholesterol, NEFA, and albumin were measured in the supernatants, and differences between concentrations in native and FSD-treated plasma samples were calculated. Values are expressed as percentage of the total plasma content and are mean±SD of triplicate determinations.

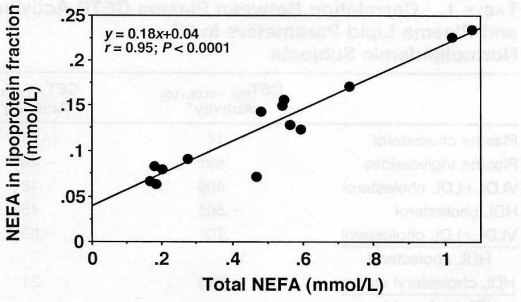


FIG 4. Scatterplot showing the correlation between NEFA concentrations in total plasma and in the plasma lipoprotein fraction. NEFA levels were measured in 14 normolipidemic plasmas before and after precipitation of total plasma lipoproteins in the presence of FSD (2.5 mg/mL) (see "Methods"). The concentration of NEFA in the plasma lipoprotein fraction was calculated as the difference between NEFA levels in native and FSD-treated plasma samples.

fasting plasmas with NEFA levels ranging from 0.16 to 1.07 mmol/L. A significant, positive correlation was observed between total plasma NEFA concentrations and NEFA amounts in the plasma lipoprotein fraction (Fig 4). In good agreement with previous data of Shafrir,[42] parameters of linear regression analysis indicated that approximately 20% of plasma NEFA localized in the lipoprotein fraction, independent of NEFA levels in total plasma (Fig 4).

Among a subset of 10 plasmas (cholesterol range, 145 to 240 mg/dL; triglyceride range, 49 to 142 mg/dL; NEFA range, 0.16 to 1.02 mmol/L; albumin range, 4.4 to 5.7 mg/dL), a positive correlation between the amount of NEFA bound to the plasma lipoprotein fraction and $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity was observed ($r=.65$; $P<.05$).

Effect of Albumin on Plasma CET Activity

Albumin, the major carrier of NEFA in human plasma, is able to remove NEFA from plasma lipoprotein substrates when added in excess.[42] In the present study, we made use of the high binding capacity of albumin for NEFA to confirm further that plasma NEFAs were implicated in the modulation of the CET reaction. For that purpose, we investigated the effect of the supplementation of plasmas with fatty acid–free albumin (final concentration, 8 g/L) on the rate of CET between the $d<1.068$ g/mL and $d>1.068$ g/mL plasma fractions. As assessed by using denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis and specific anti-apolipoprotein immunoassays, and as indicated by the supplier (Sigma), the purified albumin fraction used in the present study was at least 99% pure (results not shown). The addition of albumin induced a significant reduction in $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity (18.3±5.5% versus 9.8±3.1%; n=27; $P<.0001$). In contrast, $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity was not significantly modified in the presence of albumin (22.3±4.5% versus 23.3±5.1%; n=27; NS). As shown in Fig 5, $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity did not correlate anymore with HDL cholesterol levels in the presence of albumin. In contrast, a significant positive correlation of $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity with VLDL+LDL cholesterol levels subsisted and was even more pronounced after albumin supplementation (Fig 5). Whereas $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity correlated positively with HDL cholesterol levels ($r=.447$; $P<.05$) and negatively

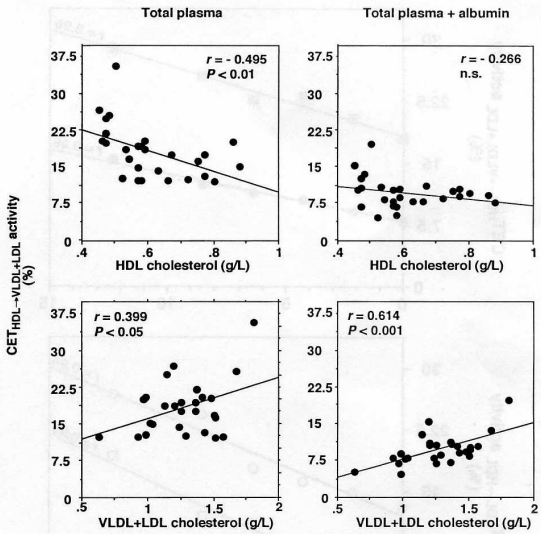


FIG 5. Scatterplots showing the correlations between CET toward VLDL+LDL and cholesterol concentrations in plasmas from 27 normolipidemic subjects. $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity was determined as the percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous HDL_3 toward the $d<1.068$ g/mL fraction of total plasma samples, which were supplemented (right) or not (left) with fatty acid–free albumin (final concentration, 8 g/L).

with VLDL+LDL cholesterol levels ($r=-.483$; $P<.05$), the addition of albumin to the incubation mixture abolished the significant correlations ($r=.176$, NS, and $r=.239$, NS, respectively).

In native plasmas, regression analysis revealed the existence of a significant negative correlation between $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity and $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity ($r=-.45$, $P<.05$). By contrast, when CETs were measured in plasma supplemented with albumin, we observed no more a negative but a significant positive correlation between the transfers in both directions ($r=.40$, $P<.05$).

Net Mass Transfers of Cholesteryl Esters and Triglycerides Between HDL and VLDL+LDL Plasma Fractions

To investigate whether nonesterified fatty acids could influence not only the velocity of CETs but also the capacity of lipoprotein substrates to accommodate or donate neutral lipids, total plasmas, containing an LCAT inhibitor (iodoacetate, 1.5 mmol/L), were incubated at 37°C for 24 hours in the presence or in the absence of albumin. As shown in Table 2, incubation of plasmas in the absence of albumin significantly decreased the esterified cholesterol content of HDL but increased its triglyceride content (variations compared with plasmas kept at 4°C: −4.5±1.4 mg/dL, $P<.001$, and +14.4±4.7 mg/dL, $P<.001$, respectively). The depletion in HDL esterified cholesterol induced by the incubation of total plasma was significantly lower in the presence of albumin than in nonsupplemented samples (Table 2). Conversely, the increase in HDL triglycerides was significantly higher in the presence of albumin than in nonsupplemented samples (Table 2).

TABLE 2. Effect of Albumin on the HDL Esterified Cholesterol and Triglyceride Contents After Incubation of Total Normolipidemic Plasmas (n=27)

	Δ HDL Esterified Cholesterol, mg/dL*	Δ HDL Triglycerides, mg/dL*
Incubation 37°C	−4.5±1.4	+14.4±4.7
Incubation 37°C+albumin	−3.8±1.6†	+17.7±4.7†

Aliquots of total plasma were incubated for 24 hours at 37°C in the presence of an LCAT inhibitor. At the end of the incubation, apo B–containing lipoproteins were selectively precipitated, and the concentration of cholesteryl esters and triglycerides remaining in HDL was measured.

*Variations (mean±SD) from values of control plasmas maintained at 4°C (HDL esterified cholesterol, 4°C, 36.0±6.8 mg/dL; HDL triglycerides, 4°C, 28.7±8.3 mg/dL).

†Significance compared with mixtures incubated in the absence of albumin (final concentration, 8 g/L) $P<.001$, *t* test.

Discussion

During the past few years, NEFAs have been implicated at different stages of the metabolism of plasma lipoproteins, including the clearance of triglyceride-rich lipoproteins,[43] the esterification of plasma cholesterol by LCAT,[44] and the triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase.[45] In addition, several in vitro studies revealed that NEFA can regulate both the secretion of CETP by the CaCo2[16] and HepG2[17] cell lines and its interaction with lipoprotein substrates.[22-24,46] However, the physiological significance of such a modulation by NEFA of CETP-mediated neutral lipid transfers in total human plasma remains uncertain. In particular, since most of plasma NEFAs are normally bound to albumin,[42] their putative role in facilitating in vivo the interaction of CETP with plasma lipoprotein substrates has been placed in doubt. However, it is noteworthy that a small but significant fraction of NEFA is normally transported in vivo as a component of plasma lipoproteins.[42] It is tempting therefore to speculate that small amounts of lipoprotein-bound NEFA may play a significant role in regulating cholesteryl ester transfers in vivo. That important issue was addressed in the present study, and we conclude that both exchange and net mass transfer of neutral lipids in normolipidemic human plasma are significantly influenced by NEFA.

In the normolipidemic population studied, we searched first for relations between plasma CETP mass concentration, as determined by using a specific ELISA,[35] and plasma lipid parameters. Plasma CETP levels were positively and significantly correlated only with NEFA levels and the VLDL+LDL:HDL cholesterol ratio, whereas no significant relations were observed with other plasma lipoprotein components. The observation of a positive correlation between plasma NEFA and CETP mass concentrations, together with the previously described ability of fatty acids to enhance in vitro the secretion of CETP by cultured cells,[16,17] suggest that NEFA might upregulate the synthesis and/or secretion of CETP in vivo. Furthermore, the positive relations between NEFA and CETP levels might account, at least in part, for recent observations of Moulin and coworkers,[47] who reported increased plasma CETP concentrations in dyslipidemic patients with nephrotic syndrome, a pathology shown to be associated with abnormally elevated NEFA content of plasma lipoproteins.[42]

To determine further whether NEFA can affect not only the mass but also the activity of CETP, we chose to assay CET activity in total, native plasma. In previous studies, combinations of radiolabeled (donor particles) and unlabeled (acceptor particles) lipoprotein substrates have been used widely to evaluate the lipid transfer rates in plasma.[9,20] As they have been performed either with total plasma, delipidated plasma, or with isolated plasma fractions, plasma lipid transfer assays are somewhat different, and all of them have their limitations.[9,20] In vitro studies have demonstrated that CET activity is dependent on many factors including, in addition to CETP mass,[18,19] the amount,[48,49] the apoprotein composition,[32,50-52] and the lipid composition[50,53,54] of lipoprotein substrates (see Reference 9 for a review). Since in the present study CETP activity was measured in freshly collected native plasmas without prior treatment, values reflect the activity of the CETP as modulated by the endogenous plasma factors. That latter procedure led to results that are in good agreement with previously reported data. Indeed, the negative correlation we observed between the rate of CET toward VLDL+LDL and both HDL cholesterol levels and esterified cholesterol:triglyceride ratio in HDL confirmed the results from previous studies,[55-58] which have shown that high levels of plasma CETP activity in vivo cause lower HDL cholesterol levels. Positive correlations with VLDL+LDL cholesterol concentrations, VLDL+LDL:HDL cholesterol ratio, and triglyceride concentrations observed in the present study confirmed the direct relationship that has recently been described in normolipidemic subjects between plasma VLDL concentrations and net CET from HDL to apo B–containing lipoproteins.[58] While plasma CET activity has been measured usually in only one direction, it is noteworthy that CETP is actually an exchange protein that promotes the transfer of cholesteryl esters in several directions.[9,20] The diversity in CETs is important to consider since a recent study in dyslipoproteinemic patients has shown that increased transfer of cholesteryl esters toward plasma VLDL+LDL can be associated with decreased transfer toward HDL.[59] Thus, in the present study, plasma CET activity was evaluated not only by measuring the transfer of radiolabeled cholesteryl esters from HDL toward VLDL+LDL ($CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity) but also from LDL toward HDL ($CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity). Globally, the relations between plasma lipid parameters and $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity were in contrast with those observed with $CET_{HDL\rightarrow VLDL+LDL}$ activity. Indeed, $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity correlated positively with HDL cholesterol but negatively with plasma triglycerides, VLDL+LDL cholesterol, and VLDL+LDL:HDL cholesterol ratio. It must be noted that the fraction of radioactivity transferred may be underestimated in the $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ assay due to undetected transfers from LDL toward VLDL. In particular, because of the negative correlation between VLDL and HDL concentrations in plasma, a reduced transfer from LDL toward HDL might be associated with an increased transfer from LDL toward VLDL. That latter point might account in part for the significant correlations of $CET_{LDL\rightarrow HDL}$ activity with HDL cholesterol, plasma triglycerides, VLDL+LDL cholesterol, and VLDL+LDL:HDL cholesterol ratio.

One of the novel findings from the present study is the significant positive correlation of plasma NEFA concentration with $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity. In contrast, no significant correlation with $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity was observed, indicating again that the choice of both donor and acceptor lipoprotein substrates constitutes one source of variation in CETP activity measurement. Plasma NEFA concentration did not correlate significantly with transfer activities expressed relative to CETP mass, ie, specific CET activities, indicating that (1) as expected, CETP mass constitutes one major determinant of plasma neutral lipid transfers and (2) when CETP mass is taken into account, NEFAs do not constitute the single, most important modulators of the transfer reaction. In fact, it is well known that CETP activity can be regulated by many other plasma factors,[9] and the lack of significance of the correlation of NEFA levels with specific transfer activities does not rule out the potential role of NEFA in modulating CETP activity. Depletion of NEFA content of lipoproteins in the presence of fatty acid–free albumin sustains that latter view. Indeed, since in vivo albumin binds the major part of plasma NEFA,[42,60] it is likely to play a determinant role in modulating the interactions between NEFA and CETP in plasma. In agreement with observations of Shafrir,[42] we demonstrated that, despite the fact that plasma NEFAs are mainly bound to albumin, a small fraction is normally carried by lipoprotein particles. To confirm that this latter fraction is available for interaction with CETP, we studied the effect of the supplementation of plasma with fatty acid–free albumin, an experimental protocol that has been shown previously to remove NEFA from plasma lipoprotein particles.[42] When total plasmas were supplemented with albumin (20% increase in plasma albumin content), a significant reduction in $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity was observed. Under identical experimental conditions, we reported that the positive relation between plasma CETP mass and CETP activity was improved in the presence of albumin, indicating further that plasma NEFA can modulate the activity of CETP.[35] Taken together, these observations brought strong functional arguments in favor of the role of lipoprotein-bound NEFA in the modulation of CET activity in normolipidemic plasma. The effect of albumin supplementation is more likely to relate to its ability to bind NEFA rather than to a putative, direct effect on the transfer reaction. Indeed, as demonstrated in previous studies,[22-24] albumin supplementation abolished the ability of NEFA to modulate the CETP-mediated exchange of cholesteryl esters between isolated lipoprotein substrates. On the contrary, in the absence of addition of NEFA, albumin alone did not affect the CETP-mediated CET reaction.[24] Since the inhibition of CET by LTIP would concern mainly VLDL-LDL exchange,[61] resulting in a concomitantly greater exchange between VLDL and HDL, one can speculate that NEFAs might also affect LTIP activity in addition to their ability to modulate directly the interaction of CETP with lipoprotein substrates. Whether that mechanism might account in part for differences in the relations between plasma NEFA concentrations and either $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ or $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activities remains to be established.

In support of a role of lipoprotein-bound NEFA in modulating CETs in total native plasma, correlations observed between CETP activity and lipoprotein concentrations were mostly suppressed in the presence of an excess of albumin. Indeed, after albumin supplementation, $CET_{LDL \rightarrow HDL}$ activity no longer correlated with plasma HDL and VLDL+LDL cholesterol levels. Similarly, the correlation of $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity with plasma HDL cholesterol levels was suppressed. Only a significant positive correlation of $CET_{HDL \rightarrow VLDL+LDL}$ activity with plasma VLDL+LDL cholesterol levels was still apparent in the presence of albumin. These results indicate that lipoprotein-bound NEFA may account in part for the significant correlations between plasma CETP activity and the concentration of various lipoprotein fractions. However, in accordance with previous studies,[2,48,49,58] the VLDL+LDL concentration remains a strong, independent determinant of plasma neutral lipid transfers, even when the modulating effect of lipoprotein-bound NEFA is cancelled.

Since under certain circumstances CETP can catalyze the rapid exchange of cholesteryl esters between lipoprotein particles without promoting any net mass transfer,[62] we sought after the ability of plasma NEFA to alter the CETP-mediated mass redistribution of cholesteryl esters and triglycerides between plasma lipoproteins. To this end, HDL cholesteryl ester and triglyceride masses were measured in incubated plasmas, supplemented or not with albumin. Long-term incubation of native, nonsupplemented plasmas induced the transfer of cholesteryl esters to VLDL+LDL with a reciprocal transfer of triglycerides to HDL. This observation is consistent with the existence of an interdependence between cholesteryl ester and triglyceride transfer in plasma. However, results obtained after incubation of plasmas in the presence of albumin compared with plasmas without supplementation indicated that NEFA increased the mass of cholesteryl esters transferred from HDL to apo B–containing lipoproteins but, simultaneously, decreased the mass of triglycerides transferred from apo B–containing lipoproteins to HDL. These observations are consistent with a recent study[30] that demonstrated that NEFA can dissociate the CETP-mediated heteroexchange of cholesteryl esters and triacylglycerol between HDL and triacylglycerol-rich lipoproteins. Our data indicated further that such an effect of NEFA may occur in native plasma.

Taken all together, the results of the present study suggest that plasma NEFA can modulate neutral lipid transfers through a dual effect on both the level and the activity of CETP. By increasing CETP mass concentrations and dissociating both the homoexchange of cholesteryl esters and the heteroexchange of cholesteryl esters and triglycerides between HDL and VLDL+LDL fractions, NEFAs globally favor the redistribution of neutral lipids toward plasma apo B–containing lipoproteins. The control of neutral lipid transfers by plasma NEFA could have some important implications, in particular under physiopathological conditions associated with abnormally low plasma albumin concentrations and high NEFA content of plasma lipoproteins, ie, analbuminemia[63] and nephrotic syndrome.[42] In support of that latter view, increased ratios of plasma NEFA to albumin have also been observed in patients with coronary heart disease.[64] Whether these observations relate at least in part to the ability of NEFA to enhance the CETP-mediated transfer of cholesteryl esters from the "anti-

atherogenic" HDL to the "atherogenic" VLDL and LDL fractions remains to be clarified.

Acknowledgments

This investigation was supported by the Université de Bourgogne, the Conseil Régional de Bourgogne, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Fondation pour la Recherche Médicale. The technical assistance of Liliane Princep is greatly acknowledged.

References

1. Hesler CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW. Monoclonal antibodies to the M_r 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem*. 1988;263: 5020-5023.
2. Yen FT, Deckelbaum RJ, Mann CJ, Marcel YL, Milne RW, Tall AR. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody: effects on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma. *J Clin Invest*. 1989;83: 2018-2024.
3. Glomset JA. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9:155-167.
4. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1993;34:1255-1274.
5. Tall AR. Plasma high density lipoproteins: metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest*. 1990;36:379-384.
6. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. Predicting coronary heart disease in middle-aged and older persons. *JAMA*. 1977;238:497-499.
7. Miller GJ, Miller NE. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet*. 1975; 1:16-19.
8. Cholesteryl ester transfer protein. *Lancet*. 1991;338:666-667.
9. Lagrost L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1215:209-236.
10. Quinet E, Tall A, Ramakrishnan R, Rudel L. Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. *J Clin Invest*. 1991;87:1559-1566.
11. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature*. 1993;364:73-75.
12. Groener JEM, Van Rozen AJ, Erkelens DW. Cholesteryl ester transfer activity: localization and role in distribution of cholesteryl ester among lipoproteins in man. *Atherosclerosis*. 1984;50:261-271.
13. Tollefson JH, Liu A, Albers JJ. Regulation of plasma lipid transfer by the high-density lipoproteins. *Am J Physiol*. 1988;255:E894-E902.
14. Yamashita S, Sprecher DL, Sakai N, Matsuzawa Y, Tarui S, Hui DY. Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest*. 1990;86:688-695.
15. Yamashita S, Hui DY, Wetterau JR, Sprecher DL, Harmony JAK, Sakai N, Matsuzawa Y, Tarui S. Characterization of plasma lipoproteins in patients heterozygous for human plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency: plasma CETP regulates high-density lipoprotein concentration and composition. *Metabolism*. 1991;40:756-763.
16. Faust RA, Albers JJ. Regulated vectorial secretion of cholesteryl ester transfer protein (LTP-I) by the CaCo-2 model of human enterocyte epithelium. *J Biol Chem*. 1988;263:8786-8789.
17. Sperker B, Mark M, Budzinski RM. The expression of human plasma cholesteryl-ester-transfer protein in HepG2 cells is induced by sodium butyrate: quantification of low mRNA levels by polymerase chain reaction. *Eur J Biochem*. 1993;218:945-950.
18. Koizumi J, Mabuchi H, Yoshimura A, Michishita I, Takeda M, Itoh H, Sakai Y, Sakai T, Ueda K, Takeda R. Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 1985;58:175-186.
19. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R, Tall AR. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature*. 1989;342:448-451.
20. Quig DW, Zilversmit DB. Plasma lipid transfer activities. *Annu Rev Nutr*. 1990;10:169-193.
21. Tall AR, Sammett D, Vita G, Deckelbaum RJ, Olivecrona T. Lipoprotein lipase enhances the cholesteryl ester transfer protein-mediated transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1984;259: 9587-9594.
22. Sammett D, Tall AR. Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. *J Biol Chem*. 1985;260: 6687-6697.
23. Barter PJ, Chang LBF, Rajaram OV. Sodium oleate promotes a redistribution of cholesteryl esters from high to low density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 1990;84:13-24.
24. Lagrost L, Barter PJ. Effects of various non-esterified fatty acids on the transfer of cholesteryl esters from HDL to LDL induced by the cholesteryl ester transfer protein. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1085: 209-216.
25. Lagrost L. Differential effects of *cis* and *trans* fatty acid isomers, oleic and elaidic acids, on the cholesteryl ester transfer protein activity. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1124:159-162.
26. Morton RE, Zilversmit DB. Inter-relationship of lipids transferred by the lipid-transfer protein isolated from human lipoprotein-deficient plasma. *J Biol Chem*. 1983;258:11751-11757.
27. Chajek T, Fielding CJ. Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:3445-3449.
28. Hopkins GJ, Barter PJ. Dissociation of the in vitro transfers of esterified cholesterol and triglycerides between human lipoproteins. *Metabolism*. 1982;31:78-81.
29. Busch SJ, Harmony JAK. Cholesteryl ester analogs inhibit cholesteryl ester but not triglyceride transfer catalyzed by the plasma cholesteryl ester-triglyceride transfer protein. *Lipids*. 1990;25: 216-220.
30. Barter PJ, Chang LBF, Rajaram OV. Sodium oleate dissociates the heteroexchange of cholesteryl esters and triacylglycerol between HDL and triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1047:294-297.
31. Lagrost L, Athias A, Gambert P, Lallemant C. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein. *J Lipid Res*. 1994;35:825-835.
32. Lagrost L, Perségol L, Lallemant C, Gambert P. Influence of apolipoprotein composition of high density lipoprotein particles on cholesteryl ester transfer protein activity: particles containing various proportions of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem*. 1994;269:3189-3197.
33. Lagrost L, Gandjini H, Athias A, Guyard-Dangremont V, Lallemant C, Gambert P. Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:815-825.
34. Bagdade JD, Ritter MC, Subbaiah PV. Accelerated cholesteryl ester transfer in plasma of patients with hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1991;87:1259-1265.
35. Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P, Lallemant C. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin Chim Acta*. 1994;231: 147-160.
36. Weinstein DB. A single-step adsorption method for removal of lipoproteins and preparation of cholesterol-free serum. *Circulation*. 1979;59(supp II):II-54. Abstract.
37. Borensztajn J, Reddy MN, Gladstone AR. A simple method for the separation of triacylglycerols from fatty acids released in lipase assays. *J Lipid Res*. 1988;29:1549-1552.
38. Polette A, Durand P, Floccard B, Blache D. A method for specific analysis of free fatty acids in biological samples by capillary gas chromatography. *Anal Biochem*. 1992;206:241-245.
39. Rifai N, King ME. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. *Clin Chem*. 1986;32:957-961.
40. Lohninger A, Preis P, Linhart L, Sommoggy SV, Landau M, Kaiser E. Determination of plasma free fatty acids, free cholesterol, cholesteryl esters, and triacylglycerols directly from total lipid extract by capillary gas chromatography. *Anal Biochem*. 1990;186:243-250.
41. Bland JM, Altman DG. Statistical methods assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1: 307-310.
42. Shafrir E. Partition of unesterified fatty acids in normal and nephrotic syndrome serum and its effect on serum electrophoretic pattern. *J Clin Invest*. 1958;37:1775-1782.
43. Yen FT, Mann CJ, Guermani LM, Hannouche NF, Hubert N, Hornick CA, Bordeau VN, Agnani G, Bihain BE. Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry*. 1994; 33:1172-1180.
44. Homma Y. Comparison in inhibitory effects of lipolysis products on cholesterol esterification. *Artery*. 1989;16:233-247.

45. Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J Biol Chem*. 1989;264:4349-4355.
46. Nishida HI, Arai H, Nishida T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *J Biol Chem*. 1993;268: 16352-16360.
47. Moulin P, Appel GB, Ginsberg HN, Tall AR. Increased concentration of plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome: role in dyslipidemia. *J Lipid Res*. 1992;33:1817-1822.
48. Barter PJ, Jones ME. Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1980;21:238-249.
49. Ihm J, Quinn DM, Busch SJ, Chataing B, Harmony JAK. Kinetics of plasma protein-catalyzed exchange of phosphatidylcholine and cholesteryl ester between plasma lipoproteins. *J Lipid Res*. 1982;23: 1328-1341.
50. Sparks DL, Pritchard PH. Transfer of cholesteryl ester into high density lipoprotein by cholesteryl ester transfer protein: effect of HDL lipid and apoprotein content. *J Lipid Res*. 1989;30:1491-1498.
51. Lasuncion MA, Iglesias A, Skottova N, Orozco E, Herrera E. High-density lipoprotein subpopulations as substrates for the transfer of cholesteryl esters to very-low-density lipoproteins. *Biochem J*. 1990; 270:441-449.
52. Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P. Comparative effects of purified apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV on cholesteryl ester transfer protein activity. *J Lipid Res*. 1994;35:982-992.
53. Morton RE. Free cholesterol is a potent regulator of lipid transfer protein function. *J Biol Chem*. 1988;263:12235-12241.
54. Morton RE, Steinbrunner JV. Concentration of neutral lipids in the phospholipid surface of substrate particles determines lipid transfer protein activity. *J Lipid Res*. 1990;31:1559-1567.
55. Ha YC, Chang LBF, Barter PJ. Effects of injecting exogenous lipid transfer protein into rats. *Biochim Biophys Acta*. 1985;833:203-210.
56. Quig DW, Zilversmit DB. Disappearance and effects of exogenous lipid transfer activity in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1986;879: 171-178.
57. Agellon LB, Walsh A, Hayek T, Moulin P, Jiang XC, Shelanski SA, Breslow JL, Tall AR. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem*. 1991;266:10796-10801.
58. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest*. 1991;88:2059-2066.
59. Sparks DL, Frohlich J, Lacko AG, Pritchard PH. Relationship between cholesteryl ester transfer activity and high density lipoprotein composition in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis*. 1989;77:183-191.
60. Spector AA. Fatty acid binding to plasma albumin. *J Lipid Res*. 1975;16:165-179.
61. Morton RE, Steinbrunner JV. Determination of lipid transfer inhibitor protein activity in human lipoprotein-deficient plasma. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1843-1851.
62. Barter PJ, Lally JI. In vitro exchanges of esterified cholesterol between serum lipoprotein fractions: studies of humans and rabbits. *Metabolism*. 1979;28:230-236.
63. Baldo-Enzi G, Baiocchi MR, Vigna G, Andrian C, Mosconi C, Fellin R. Analbuminaemia: a natural model of metabolic compensatory systems. *J Inherit Metab Dis*. 1987;10:317-329.
64. Pickart L. Increased ratio of plasma free fatty acids to albumin during normal aging and in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1983;46:21-28.

ANNEXE 2

Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from analbuminemic patients.

BRASCHI, S., LAGROST, L., FLORENTIN, E., MARTIN, C., ATHIAS, A., GAMBERT, P., KREMPF, M., LALLEMANT, C. & JACOTOT, B.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **16**, 441-449 (1996)

Increased Cholesteryl Ester Transfer Activity in Plasma From Analbuminemic Patients

Sylvie Braschi, Laurent Lagrost, Emmanuel Florentin, Claude Martin, Anne Athias, Philippe Gambert, Michel Krempf, Christian Lallemant, Bernard Jacotot

Abstract Hypercholesterolemia associated with analbuminemia, an inherited disease manifesting low plasma albumin concentration, is characterized by enhanced LDL cholesterol levels and reduced HDL cholesterol levels. In addition, compared with normal counterparts, the esterified cholesterol:triglyceride ratio tends to be higher in analbuminemic apoB-containing lipoproteins and lower in analbuminemic HDL. The aim of the present study was to investigate the mechanism that may account for the association of a hypoalbuminemic state with alterations in the concentration and composition of plasma lipoprotein fractions. To this end, endogenous cholesterol esterification activity, phospholipid transfer activity, and cholesteryl ester transfer activity were measured in total plasma from three analbuminemic patients and five control subjects. Whereas endogenous cholesterol esterification and phospholipid transfer rates were not significantly affected in analbuminemia, the transfer of radiolabeled cholesteryl esters from HDL toward apoB-containing lipoproteins was constantly higher in analbuminemic plasmas than in normal control plasma ($473.6\pm107.3\% \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$ versus $227.5\pm84.0\% \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$, respectively; $P=.036$). The rise in cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity in analbuminemic plasma was due to a significant increase in the transfer of radiolabeled cholesteryl esters toward LDL but not toward the triglyceride-rich lipoproteins. The CETP mass was higher in analbuminemic patients than in control subjects, but the difference did not reach the significance level (5.18 ± 0.82 mg/L versus 3.13 ± 1.19 mg/L, respectively; $P=.07$). Since abnormally elevated nonesterified fatty acid (NEFA) levels were shown to be associated with analbuminemic lipoproteins, mostly LDL, the direct role of lipoprotein-bound NEFA in enhancing CETP activity was suspected. In support of this view, supplementation of total plasmas with fatty acid–poor albumin was shown to reduce CETP activity to a significantly greater extent in analbuminemic plasmas than in normal control plasma. It is concluded that hyperlipidemia associated with the hypoalbuminemic state can relate, at least in part, to the combined effect of CETP and NEFA in promoting the transfer of cholesteryl esters from the antiatherogenic HDL toward the proatherogenic apoB-containing lipoproteins. (***Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:441-449.**)

Key Words • lipoprotein • cholesteryl ester transfer protein • hypoalbuminemia • triglyceride • cholesteryl ester

Analbuminemia, or better called congenital hypoalbuminemia, is a rare, inherited disease characterized by an abnormally low plasma albumin concentration.[1-13] In spite of the relatively small number of patients identified so far,[1-13] inherited analbuminemia has been shown to be associated with several well-defined clinical symptoms, among them mild edema, low blood pressure, increased concentration of several plasma proteins, and hypercholesterolemia.[6,7,9-11,13-15] The latter point is of particular interest and might account for the premature cardiovascular events that have been reported in several cases.[3,5,6,13] Consequently, inherited analbuminemia may constitute an interesting model to elucidate the biochemical process that may account for the reported positive relationship between hypoalbuminemia and coronary artery disease.[16-18]

Whereas NEFAs are normally mostly bound to albumin, abnormally low albumin concentrations, such as those reported in analbuminemia[15] and nephrotic syndrome,[19] have been shown to be associated with the redistribution of NEFA toward the plasma lipoprotein fraction.[19] These observations demonstrated clearly that in vivo lipoprotein particles can stand for alternative carriers of plasma NEFA.[15,19] Moulin and coworkers[20] reported increased CETP mass concentrations in dyslipidemic patients with nephrotic syndrome. In vitro studies achieved in the absence of albumin demonstrated that NEFA, when located at the surface of lipoproteins, can stimulate the ability of CETP to promote the redistribution of cholesteryl esters from HDL toward VLDL and LDL, together with the reciprocal transfer of triglycerides from VLDL+LDL toward HDL.[21,22] Considered together, previously published data suggest, therefore, that the stimulation of plasma CETP by the lipoprotein-bound NEFA might account for the rise in LDL:HDL cholesterol ratio observed under pathological conditions that is associated with abnormally low plasma albumin levels.[15,20]

The latter hypothesis was investigated in the present study by measuring the CETP mass concentration and the isotopic exchange of cholesteryl esters between HDL and apoB-containing lipoproteins in three analbuminemic patients and five normolipidemic control subjects.

Received June 2, 1995; revision accepted November 30, 1995.

From the Service de Médecine V and INSERM U391, Hôpital Henri Mondor (S.B., C.M., B.J.), Créteil; the Laboratoire de Biochimie des Lipoprotéines, INSERM CJF 93-10, Faculté de Médecine (L.L., E.F., A.A., P.G., C.L.), Dijon; and the Service d'Endocrinologie, Hôtel Dieu (M.K.), Nantes, France.

Correspondence to Laurent Lagrost, Laboratoire de Biochimie Médicale, Hôpital du Bocage, 21034 Dijon, France.

© 1996 American Heart Association, Inc.

Selected Abbreviations and Acronyms

apoB = apolipoprotein B
BMI = body mass index
CETP = cholesteryl ester transfer protein
FSD = fumed silicon dioxide
HDL-C = HDL cholesterol
LCAT = lecithin:cholesterol acyltransferase
LDL-C = LDL cholesterol
NEFA(s) = nonesterified fatty acid(s)
PAGE = polyacrylamide gradient gel electrophoresis

Case Reports

Case 1

ZA, a 32-year-old woman, was first hospitalized in 1981 for a severe myopathy revealing a vitamin-sensitive osteomalacia.[23] Laboratory examination at that time showed a combined hyperlipidemia together with a hypoalbuminemia without proteinuria. Study of the family revealed a consanguineous union of the parents.[7] Analbuminemia was detected in plasma from two of ZA's brothers, the older one suffering slight generalized edema and the other being asymptomatic (Fig 1a). To date, ZA still exhibits a strong dyslipidemia (plasma total cholesterol level >400 mg/dL; plasma triglyceride levels >200 mg/dL), with no beneficial effects derived from a low-fat diet and hypolipidemic drug treatment. At the present time, the physical examination of ZA is normal, with blood pressure of 120/70 mm Hg and normal weight (BMI, 24.5 kg/m^2). The only associated clinical abnormality is a bilateral corneal arcus, with no symptom of cardiovascular disease.

Cases 2 and 3

BR and RR, two sisters, aged 25 and 32 years, respectively, were also investigated for a severe and persistent dyslipidemia associated with inherited hypoalbuminemia. BR was first admitted in the hospital in 1987 for a transient oligoarthritis, which remained unexplained, and edema of the legs. RR was hospitalized in 1990 and 1992 for superficial thrombophlebitis. Review of family history revealed a consanguineous union of the parents and maternal grandparents (Fig 1b). One of the maternal aunts had a myocardial infarction at 54 years old.[13] Laboratory examination immediately after the infarction revealed hypercholesterolemia associated with hypoalbuminemia (plasma cholesterol, 348 mg/dL; plasma triglycerides, 78 mg/dL; plasma albumin, 2.7 g/L). The father of BR and RR was hypercholesterolemic but had normal plasma albumin concentration (plasma cholesterol, 290 mg/dL; plasma triglycerides, 180 mg/dL). He died at the age of 63 of hepatic metastasis of a colic carcinoma. The brother of BR and RR is also hypercholesterolemic without hypoalbuminemia (plasma cholesterol, 324 mg/dL; plasma triglycerides, 65 mg/dL).

At present, the physical examinations of BR and RR are normal, except that BR has edema in both legs and low blood pressure (100/70 mm Hg) and RR is overweight (BMI=30.4 kg/m^2). BMI of BR is 23.3 kg/m^2.

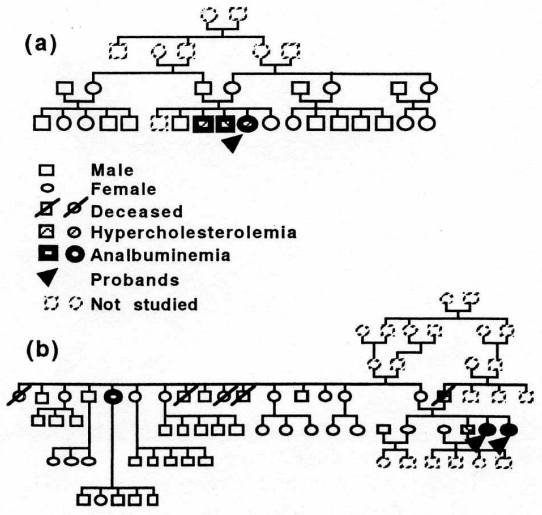


FIG 1. Pedigrees of the three analbuminemic patients. a, Pedigree of ZA; b, pedigree of BR and RR. Adapted from Irunberry et al[7] and Reynaud et al.[13]

Control Subjects

The control group consisted of five healthy, normolipidemic women recruited from among the hospital staff (38.6±6.9 years old; BMI, 20.7±1.0 kg/m^2; plasma cholesterol <230 mg/dL; plasma triglycerides <200 mg/dL). Informed consent from patients and control subjects was obtained. They took neither drugs nor oral contraceptives.

Control subjects did not differ significantly from analbuminemic patients in regard to their physical activity, smoking habits, and diet. Only one control subject was a smoker (10 cigarettes per day). Information on usual food intake was obtained through a 3-day dietary record. The average energy consumption, as well as the protein, carbohydrate, and fat contents of the diets in analbuminemic patients and control subjects did not differ significantly. Saturated fatty acids accounted for ≈50% of the total fat intake in all the subjects studied.

Methods

Blood Sampling

Venous blood was collected after an overnight fast into tubes containing 0.1 mg/mL Na_2-EDTA and placed immediately on ice. Plasma was promptly separated by a 15-minute centrifugation at 3000 rpm and maintained at 4°C before lipid and lipoprotein analysis. Plasma aliquots for cholesteryl ester transfer, phospholipid transfer, and cholesterol esterification assays were kept at −20°C.

Analysis of Lipoprotein Components

Total cholesterol, free cholesterol, triglyceride, and phospholipid concentrations were determined in total plasma and lipoprotein fractions by using an Abbott diagnostic VP analyzer with enzymatic reagents (Boehringer Mannheim). Cholesteryl ester mass content of lipoprotein fractions was calculated as the difference between total cholesterol and free cholesterol multiplied by 1.67, representing the sum of the esterified cholesterol and fatty acid moieties. Protein concentrations were measured by using the method of Lowry et al,[24] with serum albumin as the standard. HDL cholesterol levels were determined after precipitation of plasma apoB-containing lipoproteins with phosphotungstic acid and magnesium chloride (Boehringer Mannheim). LDL cholesterol levels were calculated using the formula of Friedewald et al.[25] Nonesterified fatty acid concentrations were determined by using an enzymatic kit (Wako Pure Chemicals Industries).

Preparation of Lipoprotein Fractions by Sequential Ultracentrifugation

Lipoprotein fractions were separated by flotation in an L8-65 ultracentrifuge (Beckman Instruments) according to a modification of the procedure of Havel et al.[26] Densities were adjusted by using KBr solutions. VLDL, IDL, LDL, HDL2, and HDL3 were isolated step by step as the $d<1.006$-g/mL, $1.006<d<1.019$-g/mL, $1.019<d<1.063$-g/mL, $1.063<d<1.125$-g/mL, and $1.125<d<1.250$-g/mL plasma fractions, respectively. HDL2 and HDL3 fractions were washed by a second run of ultracentrifugation in solutions of $d=1.125$ g/mL and $d=1.250$ g/mL, respectively, to avoid contamination with plasma albumin.

Density Gradient Ultracentrifugation

Plasma lipoproteins were fractionated according to a continuous KBr gradient by using the general procedure described by Chapman and coworkers.[27] Briefly, the density of the plasma samples was first adjusted to 1.210 g/mL by the addition of solid KBr. A discontinuous gradient was then constructed in cellulose nitrate tubes in a Beckman SW 41-Ti swinging-bucket rotor by using KBr solutions in the following order: 0.5 mL of a $d=1.250$-g/mL NaCl-KBr solution, 2 mL of plasma adjusted to $d=1.210$ g/mL, 3 mL of a $d=1.120$-g/mL NaCl-KBr solution, 2.5 mL of a $d=1.063$-g/mL NaCl-KBr solution, 1.5 mL of a $d=1.019$-g/mL NaCl-KBr solution, 1 mL of a $d=1.006$-g/mL NaCl solution, and 1 mL of distilled water. Tubes were immediately centrifuged at 40 000 rpm for 24 hours at 15°C in a Beckman L8-55 ultracentrifuge.

Isotopic Assay of Plasma Cholesteryl Ester Transfer Activity

Cholesteryl ester transfer activity was determined in total plasma according to the general procedure previously described.[28] Briefly, the capacity of a plasma sample to promote the transfer of tritiated cholesteryl esters from a tracer amount of biosynthetically labeled HDL3 (3H-CE-HDL3) toward plasma apoB-containing lipoproteins was evaluated during the incubation at 37°C of total plasma (25 μL), 3H-CE-HDL3 (2.5 nmol of cholesterol), and iodoacetate (75 nmol) in a final volume of 50 μL. At the end of the incubation, apoB-containing lipoproteins were separated by using either ultracentrifugation or PAGE. In the former case, incubation mixtures were adjusted to $d=1.068$ g/mL, ultracentrifuged for 7 hours at 50 000 rpm (269 000*g*) in a 50.4 Ti rotor on an L7 ultracentrifuge (Beckman), and the $d<1.068$- and $d>1.068$-g/mL fractions were recovered.[28] In the latter case, plasma lipoprotein fractions were separated by electrophoresis in 20- to 160-g/L polyacrylamide gels.[29] Subsequently, gel fragments containing the different plasma lipoprotein fractions (VLDL+IDL, LDL, and HDL) were cut off and dissolved with NaOCl according to the procedure of Florentin et al.[29] Lipoprotein fractions recovered by using either the ultracentrifugation or the PAGE method were mixed with a scintillation fluid (OptiPhase Hisafe 3, Pharmacia), and radioactivity was assayed for 5 minutes in a Wallac 1410 liquid scintillation counter (Pharmacia). Results were expressed as percentage of total radiolabeled cholesteryl esters recovered in each lipoprotein fraction.

Isotopic Assay of Plasma Phospholipid Transfer Activity

Phospholipid transfer activity was determined in total plasma by measuring the transfer of radiolabeled phosphatidylcholine from phospholipid liposomes (14C-PC-liposomes) to the plasma HDL fraction according to the method previously described[30] and derived from the general procedure of Damen et al.[31] Briefly, total plasma (30 μL), 14C-PC-liposomes (110 nmol of phosphatidylcholine), and iodoacetate (120 nmol) were incubated for 30 minutes at 37°C in a final volume of 80 μL. Phospholipid liposomes and apoB-containing lipoproteins were subsequently precipitated by addition of 60 μL of a 500-mmol/L NaCl, 215-mmol/L $MnCl_2$, 445-U/mL heparin solution.[30] Radioactivity in resulting supernatants was assayed as described above and phospholipid transfer activity was calculated as the rate of total radiolabeled phospholipids transferred from liposomes to plasma HDL after deduction of nonincubated control values.

LCAT Activity

LCAT activity in total plasma was evaluated by using two independent methods, which measured either the cholesterol esterification rate with an exogenous, radiolabeled substrate ("isotopic cholesterol esterification rate") or the decrease in plasma free cholesterol mass ("endogenous cholesterol esterification rate").

Isotopic Cholesterol Esterification Rate

LCAT activity in total plasma was evaluated by using the general procedure previously described.[28] Briefly, 5 μL of a 3H-cholesterol–albumin emulsion (3H-cholesterol, 6.7 mCi/L; albumin, 50 g/L) and 50 μL of total plasma were mixed and preincubated for 1 hour at 4°C. Subsequently, mixtures were incubated for 3 hours at 37°C and nonesterified cholesterol remaining was precipitated by digitonin.[32] The isotopic cholesterol esterification rate was calculated as the percentage of total radiolabeled cholesterol esterified during the 3-hour period compared with control in which plasma was replaced by Tris-buffered saline. Isotopic LCAT activity was expressed in percentage of radiolabeled cholesterol esterified per hour per milliliter of plasma ($\% \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$).

Endogenous Cholesterol Esterification Rate

Endogenous cholesterol esterification was determined by the previously described nonradioactive method,[33] which measures the decrease in plasma free cholesterol during incubation for 40 minutes at 37°C. Endogenous cholesterol esterification rate was expressed in percentage of decrease in unesterified cholesterol per hour (%/h).

CETP Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

CETP mass concentrations were measured by using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay on a Biomek 1000 Biorobotic System (Beckman Instruments).[34] CETP mass concentration values were determined in quadruplicate from a calibration curve obtained with a frozen plasma standard.

Native Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis

The size of isolated LDL was determined by electrophoresis on nondenaturing 15- to 250-g/L polyacrylamide gradient gels according to the general procedure previously described.[28] Gels were fixed and stained with Coomassie brilliant blue G before analysis on a GS-670 Gel Densitometer (Bio-Rad). The mean apparent diameter of LDL was determined by comparison with protein standards (Pharmacia High Molecular Weight Protein Calibration kit) and carboxylated latex beads (Duke Scientific).[28]

Agarose Gel Electrophoresis

The electrophoretic mobility of isolated LDL particles was determined by electrophoresis on 0.5% agarose gels (Paragon Lipo kit, Beckman), according to the method described by Sparks and Phillips.[35] Mean migration distances were obtained by analysis of the gel on a Bio-Rad GS-670 imaging densitometer.

Precipitation of the Total Plasma Lipoprotein Fraction

Lipoproteins were removed from total human plasma by using a single-step adsorption method based on the ability of FSD to remove large particles, such as lipid emulsions and lipoprotein particles, from aqueous media.[36] Briefly, total

TABLE 1. Plasma Parameters in Analbuminemic Patients and Normal Subjects

Subjects	Albumin, g/L	Total Cholesterol, mg/dL	HDL-C, mg/dL	LDL-C, mg/dL	LDL-C/HDL-C	TG, mg/dL	NEFA, mmol/L
Analbuminemic patients	20.67±2.52*	422±47*	38±5	284±74*	7.63±2.45*	156±25*	0.22±0.26
Control subjects	44.80±1.09	186±34	47±7	84±20	1.99±0.84	72±16	0.22±0.15

TG indicates triglycerides.
Data of three analbuminemic patients and five normal control subjects are mean±SD.
*P=.036 vs control.

plasmas were treated for 10 minutes at room temperature with FSD (final concentration, 2.5 mg/mL) according to the general procedure previously reported.[37] Under those experimental conditions, FSD allowed the removal of all plasma lipoprotein components, whereas no more than 5% of plasma albumin was coprecipitated.

Statistical Analysis

Data means were compared by using the Mann-Whitney U statistic. Correlations between various parameters were analyzed by using Spearman's rank correlation analysis.

Results

Plasma Parameters

Table 1 presents the albumin and lipid levels in total plasma from three analbuminemic patients and five control subjects. Study patients presented markedly and significantly lower albumin levels than control subjects. Hypoalbuminemia was associated with significantly higher total cholesterol, LDL-C, and triglyceride concentrations compared with normolipidemic control subjects. Conversely, HDL-C tended to be reduced in hypoalbuminemic plasmas. Total NEFA levels in analbuminemic patients were within the normal range (Table 1). Plasma LDL:HDL cholesterol ratio was significantly higher in analbuminemic patients than in control subjects (Table 1).

Plasma Lipoprotein Composition

Distinct lipoprotein fractions (VLDL, IDL, LDL, HDL2, and HDL3) were isolated from total plasma by sequential ultracentrifugation and were assayed for protein, unesterified cholesterol, total cholesterol, phospholipid, and triglyceride as described in "Methods." As shown in Table 2, lipid:protein ratios were significantly increased only in LDL fractions of analbuminemic patients (3.23±0.20 versus 1.87±0.95, P=.036). Whereas the mass percentage of surface lipid components (phospholipid, unesterified cholesterol) in individual lipoprotein fractions was quite similar in the two groups, some differences appeared when comparing the neutral lipid (cholesteryl ester and triglyceride) contents. Indeed, cholesteryl ester content tended to be higher in lipoproteins from analbuminemic patients compared with normal control subjects, and the difference was statistically significant in the VLDL and LDL fractions. Triglycerides tended to be lower in analbuminemic VLDL and IDL but higher in analbuminemic HDL. However, differences did not reach the significance level. Overall, the esterified cholesterol:triglyceride ratio tended to be higher in analbuminemic apoB-containing lipoproteins, ie, VLDL, IDL, and LDL, but lower in analbuminemic HDL (Table 2). Again, because of the small number of subjects studied, the difference in the esterified cholesterol:triglyceride ratio between analbuminemic patients and normal subjects reached statistical significance only for the VLDL fraction (Table 2).

Size and Density of LDL

To determine whether the significant increase in the lipid:protein ratio of analbuminemic LDL was associated with alterations in particle size and density, LDLs were separated on native polyacrylamide gradient gel and isolated from total plasma by density gradient ultracentrifugation (see "Methods"). Compared with LDL from control individuals, LDL particles from analbuminemic patients tended to be of larger size (26.6±0.2 versus 27.0±0.5 nm, respectively; NS). In addition, the mean density of LDL from analbuminemic patients was significantly lower than the mean density of LDL from control subjects (1.041±0.041 versus 1.045±0.001 g/mL, respectively; P=.036).

TABLE 2. Plasma Lipoprotein Composition in Analbuminemic Patients and Control Subjects

Lipoproteins	Patients	PL	FC	TG	EC	Protein	Lipid/Protein Ratio	EC/TG Ratio
		(% of Lipoprotein Mass)						
VLDL	Analbuminemic	18.15±0.48	7.41±1.40	48.37±2.77	13.58±0.28*	12.49±3.81	6.35±3.15	0.21±0.01*
	Control	17.10±1.28	6.92±2.87	51.51±2.94	7.74±2.79	16.73±3.38	6.11±1.35	0.15±0.06
IDL	Analbuminemic	20.84±0.78	9.40±0.93	23.04±5.91	30.18±4.45	16.54±1.24	5.21±0.23	1.40±0.51
	Control	20.34±1.69	9.98±2.85	29.94±6.80	20.92±8.73	18.82±7.85	5.24±1.00	0.75±0.40
LDL	Analbuminemic	21.64±0.54	9.20±0.16	6.77±1.74	40.53±2.82*	21.86±1.88*	3.23±0.20*	6.31±1.94
	Control	21.72±0.52	9.82±0.72	6.46±1.29	34.69±2.12	27.31±1.75	1.87±0.95	5.57±1.24
HDL2	Analbuminemic	26.43±1.77	3.92±0.51	6.51±1.26	21.22±1.01	41.91±1.43	1.39±0.08	3.39±0.54
	Control	30.09±0.92	4.26±0.52	4.39±1.59	20.68±0.47	40.58±0.85	1.46±0.05	5.28±2.08
HDL3	Analbuminemic	22.12±1.49	3.07±0.95	4.76±0.61	15.00±1.37	55.03±0.93	0.81±0.03	3.26±0.61
	Control	28.41±13.93	3.47±0.88	3.84±1.56	14.47±1.20	55.40±1.35	0.81±0.05	4.15±1.41

PL indicates phospholipids; FC, free cholesterol; TG, triglycerides; EC, esterified cholesterol. Plasma lipoprotein fractions were ultracentrifugally isolated and lipoprotein components assayed as described under "Methods." Results are expressed in percentage of total lipoprotein mass. Data of three analbuminemic patients and five normal control subjects are mean±SD.
*P=.036 vs control.

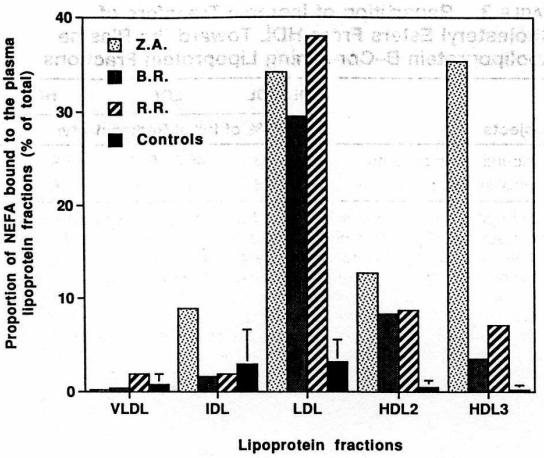


FIG 2. Distribution of NEFAs among plasma lipoprotein fractions. Plasma lipoprotein fractions (VLDL, IDL, LDL, and HDL) were isolated by sequential ultracentrifugation and NEFAs were assayed as described under "Methods." The results are expressed as percentage of total plasma NEFA bound to each lipoprotein fraction in the three analbuminemic patients (ZA, BR, RR) and the five control subjects. Values for each analbuminemic patient are mean of triplicate determinations. Values for the control population are mean±SD of five normolipidemic subjects.

Distribution of NEFA Among Plasma Lipoprotein Fractions

To investigate whether hypoalbuminemia was associated with alterations in the plasma distribution of NEFA, plasma lipoproteins were precipitated by using FSD, and NEFA contents of lipoprotein and nonlipoprotein plasma fractions were determined as described under "Methods." Interestingly, in spite of similar total NEFA levels in plasmas of both analbuminemic patients and control subjects, strong differences appeared when comparing the plasma NEFA distribution in the two groups. Indeed, the bulk of plasma NEFA, representing 59±3% (mean±SD of three determinations), 68±3%, and 88±20% of the total, was located in the lipoprotein fraction of BR, RR, and ZA, respectively. In contrast, only a minor proportion of total NEFA, not exceeding 10% of the total, was located in lipoproteins from control subjects.

The precise distribution of plasma NEFA was further studied after separation of lipoprotein fractions by sequential ultracentrifugation (see "Methods"). In agreement with data obtained after precipitation of plasma lipoproteins with FSD, most of the NEFA in analbuminemic plasmas was bound to the ultracentrifugally isolated LDL, HDL2, and HDL3 fractions. In contrast, only a small percentage of total NEFA was recovered in the triglyceride-rich lipoprotein fractions, VLDL and IDL, from both analbuminemic and control plasmas (Fig 2). In accordance with a higher NEFA content of analbuminemic LDL compared with normolipidemic counterparts (33.9±4.3 versus 3.2±2.3% of total plasma NEFA, respectively; $P=.025$), the mean distance of migration of LDL particles toward the anodic end of agarose gel was significantly higher when isolated from anabuminemic than normolipidemic plasma (7.1±0.3 versus 5.4±0.4 mm, respectively; $P=.036$) (Fig 3). The

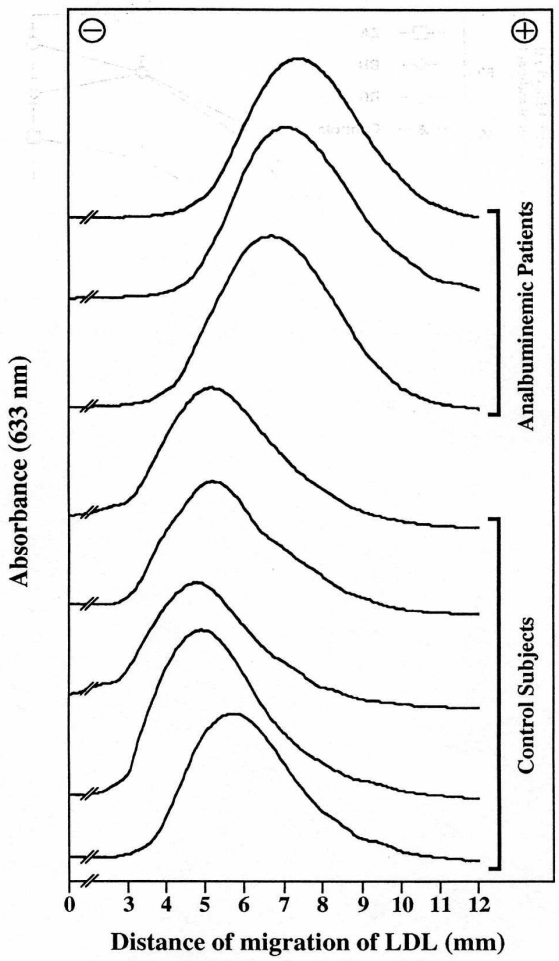


FIG 3. Agarose gel electrophoretic profiles of LDL isolated from analbuminemic and control plasmas. Plasma LDL was isolated by sequential ultracentrifugation, and its electrophoretic mobility was determined as described under "Methods." Electrophoretic profiles of LDL from analbuminemic and control plasmas were obtained by image analysis of the agarose gel.

distance of migration of plasma LDL in agarose gel correlated positively with its NEFA content ($P=.78$; $P=.04$).

LCAT Activity in Analbuminemic and Control Plasmas

LCAT activity was determined by two independent methods, which measured either the esterification of exogenous radiolabeled unesterified cholesterol (isotopic cholesterol esterification rate) or the esterification of endogenous unesterified cholesterol (endogenous cholesterol esterification rate; see "Methods"). Whereas the isotopic cholesterol esterification rate was markedly decreased in the three analbuminemic patients (38.1±12.8% · h^{-1} · mL^{-1} versus 117.2±19.9% · h^{-1} · mL^{-1} in control subjects, $P=.036$), the endogenous cholesterol esterification rate was normal (8.75±1.96%/h versus 7.27±2.62%/h in control subjects, NS).

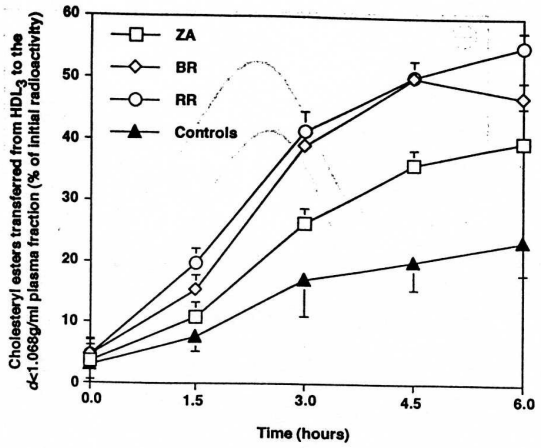


FIG 4. Isotopic transfer of cholesteryl esters from HDL3 to the $d<1.068$-g/mL plasma fraction. Cholesteryl ester transfer activity was determined as the percentage of total radiolabeled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous HDL3 toward the $d<1.068$-g/mL plasma fraction in three analbuminemic patients (ZA, BR, RR) and five control subjects. Values for each analbuminemic patient are mean±SD of triplicate determinations. Values for the control population are mean±SD of five normolipidemic subjects.

Phospholipid Transfer Activity in Analbuminemic and Control Plasmas

The phospholipid transfer activity was determined by measuring the transfer of radiolabeled phosphatidylcholine from phospholipid liposomes to the plasma HDL fraction (see "Methods"). The difference in plasma phospholipid transfer activity between analbuminemic patients and control subjects was not statistically significant (358±55% · h^{-1} · mL^{-1} versus 464±35% · h^{-1} · mL^{-1}, NS).

Isotopic Transfer of Cholesteryl Esters in Analbuminemic and Control Plasmas

Fig 4 shows the time-dependent transfer of radiolabeled cholesteryl esters from HDL3 to apoB-containing lipoproteins measured in analbuminemic patients and control subjects. The rate of cholesteryl esters transferred toward the $d<1.068$-g/mL plasma fraction increased progressively during the first 3 hours of incubation and tended to reach a plateau for incubation times exceeding 4.5 hours (Fig 4). During the period studied, cholesteryl ester transfer activity in analbuminemic patients was constantly and significantly higher than in normolipidemic control subjects ($P=.036$). As measured after 3 hours of incubation, mean cholesteryl ester transfer activity, expressed in percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from HDL3 to apoB-containing lipoproteins per hour per milliliter of plasma, was significantly higher in analbuminemic plasmas than in normal control plasma (473.6±107.3 versus 227.5±84.0% · h^{-1} · mL^{-1}, respectively; $P=.036$).

As observed by using PAGE, significant increase in the transfer of radiolabeled cholesteryl esters toward LDL but not toward the VLDL+IDL plasma fraction accounted for the rise in cholesteryl ester transfer activity in analbuminemic plasmas (Table 3).

TABLE 3. Repartition of Isotopic Transfers of Cholesteryl Esters From HDL Toward the Plasma Apolipoprotein B–Containing Lipoprotein Fractions

Subjects	VLDL+IDL	LDL	HDL
	(% of Initial Radioactivity)		
Analbuminemic patients	15.6±4.3	40.5±8.1*	43.9±12.1*
Control subjects	9.8±1.8	14.6±4.3	75.6±4.9

Total plasmas were incubated for 3 hours at 37°C in the presence of a tracer dose of HDL3 containing radiolabeled cholesteryl esters. At the end of the incubation, mixtures were fractionated on the polyacrylamide gradient gels, gel fragments containing individual plasma lipoprotein fractions were cut off, and radioactivity contents were assayed as described under "Methods." Results are expressed as percentage of initial radioactivity recovered in individual lipoprotein fractions. Data on the three analbuminemic patients and five normal control subjects are mean±SD.

*$P=.036$ vs control.

CETP Mass

To determine whether increased CETP mass might also account for the increased transfer of neutral lipids between lipoproteins, plasma CETP concentrations were measured by using a specific enzyme-linked immunosorbent assay. CETP mass was higher in analbuminemic patients than in control subjects, but the difference did not reach the significance level (5.18±0.82 mg/L versus 3.13±1.19 mg/L, $P=.07$).

Effect of Albumin Supplementation on the Isotopic Transfer of Cholesteryl Esters From HDL3 Toward the $d<1.068$ g/mL Plasma Fraction

In vitro albumin is able to remove NEFA from lipoprotein substrates when added to normal or hypoalbuminemic plasmas.[19] In the present study, we made use of the high binding capacity of albumin for NEFA to confirm that increased cholesteryl ester transfer activity was, at least in part, due to high levels of lipoprotein-bound NEFA. To this end, analbuminemic and control plasmas were supplemented with increasing amounts of fatty acid–poor albumin. Compared with nonsupplemented plasma counterparts, changes in cholesteryl ester transfer activity after supplementation of total plasma with 5, 10, 15, and 20 g/L of fatty acid–poor albumin were −28.3±16.4, −42.2±20.7, −47.1±25.6, and −50.1±23.7% · h^{-1} · mL^{-1} in control plasmas, respectively. In analbuminemic plasmas, changes in cholesteryl ester transfer activity after supplementation of total plasma with 5, 10, 15, and 20 g/L of fatty acid–poor albumin were −54.4±46.6, −92.4±46.6, −122.2±31.1, and −144.6±66.2% · h^{-1} · mL^{-1}, respectively. Differences in the reduction of cholesteryl ester transfer activity between control and analbuminemic plasmas were statistically significant for the two highest albumin concentrations studied, 15 and 20 g/L ($P=.05$ and $P=.027$, respectively).

Specific activity of CETP in albumin-supplemented plasmas was calculated as the ratio of plasma cholesteryl ester transfer activity to plasma CETP mass concentration and expressed in percentage of total radiolabeled cholesteryl esters transferred per hour per microgram of CETP (% · h^{-1} · μg^{-1}). Specific CETP activity in analbuminemic plasmas was higher than in control plasmas (93.4±10.1 versus 78.1±15.9% · h^{-1} · μg^{-1}, respectively), but the difference did not reach the significance level. When analbuminemic plasmas were supplemented

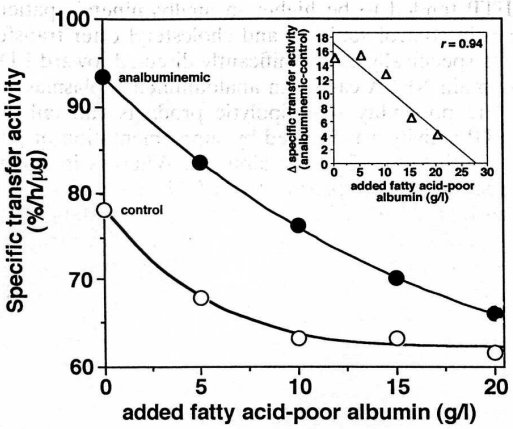


FIG 5. Effect of supplementation of total plasma with fatty acid–poor albumin on specific activity of CETP. The specific activity of plasma CETP is calculated as the ratio of plasma cholesteryl ester transfer activity to plasma CETP mass concentration and expressed in percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from exogenous HDL3 toward the apoB-containing lipoproteins per hour per microgram of CETP. Values are means of three analbuminemic plasmas (●) and five normal control plasmas (○). Differences between analbuminemic and control samples have been calculated and plotted against the added concentration of fatty acid–poor albumin (see inset graph).

with increasing concentrations of fatty acid–poor albumin, mean specific CETP activity decreased markedly, with an approximately linear progression along the albumin concentration range studied (Fig 5). In contrast, mean specific CETP activity in normal plasmas was substantially reduced with low levels of fatty acid–poor albumin (5 and 10 g/L) but subsequently did not decrease further (Fig 5). For the highest fatty acid–poor albumin concentration studied (20 g/L), specific CETP activities measured in analbuminemic and control plasmas were remarkably similar (66.1±7.7 versus 61.7±15.1% · h^{-1} · μg^{-1}, respectively). When plotted against the added fatty acid–poor albumin concentration, the difference between specific CETP activity measured in both analbuminemic and normal plasmas decreased progressively, reaching virtually the zero value when 28 g/L of fatty acid–poor albumin was added to total plasmas (see Fig 5).

Discussion

The results of the present study revealed for the first time that the hyperlipidemic state associated with analbuminemia can relate at least in part to a significant increase in plasma cholesteryl ester transfer activity. Consistent observations were made by measuring the exchange of radiolabeled cholesteryl esters between HDL and VLDL+LDL fractions and the plasma CETP mass concentration. In accordance with a previous study from our laboratory in which NEFAs were shown to modulate CETP activity in normolipidemic plasma,[38] the increased cholesteryl ester transfer activity in hypoalbuminemic plasmas was explained in part by the redistribution of NEFA from albumin toward the plasma lipoprotein particles.

Analbuminemia is a rare genetic disease that is associated with corneal arcus[9,12] and premature atherosclerosis.[3,5,6,13] It is also associated with a mild hypertriglyceridemia[6,9,14] and a strong hypercholesterolemia[6,7,9,10,14,15] that is mainly due to a rise in LDL cholesterol levels.[15] In agreement with previous reports, the three analbuminemic patients of the present study showed abnormally high plasma cholesterol levels in association with corneal arcus in one of them.[14,15] Moreover, we observed that the cholesteryl ester: triglyceride ratio in the apoB-containing lipoprotein fractions, ie, VLDL, IDL, and LDL, tended to be higher in analbuminemic patients than in normolipidemic control subjects, with only the ratio in VLDL reaching the significance level. In contrast, the cholesteryl ester:triglyceride ratio tended to be reduced in HDL from analbuminemic patients. The plasma LDL:HDL cholesterol ratio was significantly higher in analbuminemic plasmas. We demonstrated that alterations in the plasma lipoprotein profile were characterized by a marked, significant increase in the lipid:protein ratio of analbuminemic LDL, which was associated with changes in the physical properties of the particles. Indeed, we observed that analbuminemic LDL tended to be both of larger size and lower density compared with normolipidemic LDL. In addition, the electronegativity of analbuminemic LDL was significantly higher than that of normolipidemic LDL, reflecting its higher NEFA content.

It is commonly admitted that dyslipidemia associated with hypoalbuminemic states, such as congenital analbuminemia or nephrotic syndrome, is primarily induced by a hepatic oversynthesis of apoB-containing lipoproteins in response to the decreased oncotic pressure.[39,40] However, recent observations suggested that the enrichment of individual LDL particles with cholesterol also contributed to elevated LDL-C levels in nephrotic syndrome.[41] It is suggested, therefore, that not only an increased number of apoB-containing lipoprotein particles but also a net increase in their cholesterol content may be involved in the pathophysiology of hyperlipidemia associated with analbuminemia. In support of the latter view, we observed in the present study that LDL particles from analbuminemic patients compared with control subjects were enriched with cholesteryl esters.

Other studies achieved with analbuminemic patients,[14,15] nephrotic patients,[42,43] and analbuminemic rats,[44,45] suggested that alteration in LCAT activity might be involved in the lipoprotein abnormalities associated with hypoalbuminemia. However, controversial observations were reported, and the hypoalbuminemic state was associated with increased,[15,42-45] normal,[14,42,46] or decreased[42,46] plasma cholesterol esterification rate. The data presented here show that LCAT activity in analbuminemic plasmas was significantly decreased when measuring the esterification rate with an exogenous substrate but was normal when measuring the endogenous cholesterol esterification rate with the method of Albers and coworkers.[33] In fact, as suspected by others,[45] the decrease in exogenous cholesterol esterification rate might relate to variations in plasma lipoprotein levels, and then to differences in the ratio of added radiolabeled cholesterol to the plasma unesterified cholesterol pool. Therefore, on the basis of measurements of endogenous cholesterol esterification rates, it appears that the lipoprotein disorders associated with the hypoalbuminemic state in the present study are unlikely to result from alteration in plasma LCAT activity.

7. Irunberry J, Abbadi M, Khati B, Benabadji M, Rocha E. Trois cas d'analbuminémie dans une fratrie. *Rev Eur Etudes Clin Biol.* 1971; 16:372-379.
8. Cormode EJ, Lyster DM, Israels S. Analbuminemia in a neonate. *J Pediatr.* 1975;86:862-867.
9. Boman H, Hermodson M, Hammond CA, Motulsky AG. Analbuminemia in an American girl. *Clin Genet.* 1976;9:513-526.
10. Weinstock JV, Kawanishi H, Sisson J. Morphologic, biochemical and physiologic alterations in a case of idiopathic hypoalbuminemia (analbuminemia). *Am J Med.* 1979;67:132-139.
11. Dammaco F, Miglietta A, D'Addabbo A, Fratello A, Moschetta R, Bonomo L. Analbuminemia: report of a case and review of the literature. *Vox Sang.* 1980;39:153-161.
12. Baldo G, Fellin R, Manzato E, Baiocchi MR, Ongaro G, Baggio G, Fabiani F, Pauluzzi S, Crepaldi G. Characterization of hyperlipidemia in two patients with analbuminemia. *Clin Chim Acta.* 1983; 128:307-319.
13. Reynaud JP, Sagniez M, Rousseau A, Nicolas G. Etude biologique d'un cas d'analbuminémie. *Sem Hôp Paris.* 1983;59:124-128.
14. Frolich J, Pudeck MR, Cormode EJ, Sellers EM, Abel JG. Further studies on plasma proteins, lipids, and dye- and drug-binding in a child with analbuminaemia. *Clin Chem.* 1981;27:1213-1216.
15. Baldo-Enzi G, Baiocchi MR, Vigna G, Andrian C, Mosconi C, Fellin R. Analbuminaemia: a natural model of metabolic compensatory systems. *J Inherit Metab Dis.* 1987;10:317-329.
16. Pickard L. Increased ratio of plasma free fatty acids to albumin during normal aging and in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 1983;46:21-28.
17. Ordones JD, Hiatt R, Killebrew E, Fireman B. The risk of coronary artery disease among patients with the nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1990;37:243A. Abstract.
18. Radhakrishnan J, Appel AS, Valeri A, Appel GB. The nephrotic syndrome, lipids, and risk factors for cardiovascular disease. *Am J Kidney Dis.* 1993;22:135-142.
19. Shafrir E. Partition of unesterified fatty acids in normal and nephrotic syndrome serum and its effect on serum electrophoretic pattern. *J Clin Invest.* 1958;37:1775-1782.
20. Moulin P, Appel GB, Gonsberg HN, Tall AR. Increased concentration of plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome: role in dyslipidemia. *J Lipid Res.* 1992;33:1817-1822.
21. Sammett D, Tall AR. Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. *J Biol Chem.* 1985;260: 6687-6697.
22. Chajek J, Fielding CJ. Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:3445-3449.
23. Barbizet J, Degos JD, Lanoë Y, Eizenbaum JF. Myopathie, ostéomalacie et hypoalbuminémie congénitale. *Rev Neurol (Paris).* 1981; 137:195-202.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;192: 265-270.
25. Friedewald TW, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.
26. Havel RJ, Heder HA, Bragdon JM. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955;34:1345-1353.
27. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res.* 1981;22: 339-358.
28. Lagrost L, Gandjini H, Athias A, Guyard-Dangremont V, Lallemant C, Gambert P. Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:815-825.
29. Florentin E, Lagrost L, Lallemant C, Gambert P. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis as a method to measure transfers of radiolabeled cholesteryl esters between several plasma lipoprotein transfer protein and phospholipid transfer protein. *J Lipid Res.* 1994;35:825-835.
31. Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer of [14C]phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein: partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta.* 1982;712:444-452.
32. Piran U, Morin RJ. A rapid radioassay procedure for plasma lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res.* 1979;20:1040-1043.
33. Albers JJ, Chen C-H, Lacko AG. Isolation, characterization, and assay of lecithin-cholesterol acyltransferase. *Methods Enzymol.* 1986;129:763-783.
34. Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P, Lallemant C. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin Chim Acta.* 1994;231: 147-160.
35. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res.* 1991;33: 123-130.
36. Borensztajn J, Reddy MN, Gladstone AR. A simple method for the separation of triacylglycerol from fatty acids released in lipase assays. *J Lipid Res.* 1988;29:1549-1552.
37. Polette A, Durand P, Floccard B, Blache D. A method for specific analysis of free fatty acids in biological samples by capillary gas chromatography. *Anal Biochem.* 1992;206:241-245.
38. Lagrost L, Florentin E, Guyard-Dangremont V, Athias A, Gandjini H, Lallemant C, Gambert P. Evidence for nonesterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1388-1396.
39. Appel GB, Blum CB, Chien S, Kunis CL, Appel AS. The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome: relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure, and viscosity. *N Engl J Med.* 1985; 312:1544-1548.
40. Joven J, Villabona C, Vilella E, Masana L, Alberti R, Valles M. Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1990;323:579-584.
41. Vega GL, Toto RD, Grundy SM. Metabolism of low density lipoproteins in nephrotic dyslipidemia: comparison of hypercholesterolemia alone and combined hyperlipidemia. *Kidney Int.* 1995;47: 579-586.
42. Cohen SL, Cramp DG, Lewis AD, Tickner TR. The mechanism of hyperlipidemia in nephrotic syndrome: role of low albumin and the LCAT reaction. *Clin Chim Acta.* 1980;104:393-400.
43. Dullaart RPF, Gansevoort RT, Dikkeschei BD, De Zeeuw D, De Jong PE, Van Tol A. Role of elevated lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein activities in abnormal lipoproteins from proteinuric patients. *Kidney Int.* 1993;44:91-97.
44. Van Tol A, Jansen EHJM, Koomans HA, Joles JA. Hyperlipoproteinemia in Nagase analbuminemic rats: effects of pravastatin on plasma (apo)lipoproteins and lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res.* 1991;32:1719-1728.
45. Joles JA, Willekes-Koolschijn N, Scheek LM, Koomans HA, Rabelink TJ, Van Tol A. Lipoprotein phospholipid composition and LCAT activity in nephrotic and analbuminemic rats. *Kidney Int.* 1994;46:97-104.
46. Subbaiah PV, Rodby RA. Abnormal acyltransferase activities and accelerated cholesteryl ester transfer in patients with nephrotic syndrome. *Metabolism.* 1994;43:1126-1133.
47. Lagrost L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1215:209-236.
48. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest.* 1991;88:2059-2066.
49. Tall A, Sammett D, Granot E. Mechanisms of enhanced cholesteryl ester transfer from high density lipoproteins to apolipoprotein B–containing lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest.* 1986;77:1163-1172.
50. Pattnaik NM, Zilversmit DB. Interactions of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* 1979;254:2782-2786.

ANNEXE 3

Role of lipoprotein-bound nonesterified fatty acids in enhancing the specific activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome.

BRASCHI, S., MASSON, D., ROSTOKER, G., FLORENTIN, E., ATHIAS, A., MARTIN, C., JACOTOT, B., GAMBERT, P., LALLEMANT, C. & LAGROST, L.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (*soumis pour publication*)

Role of Lipoprotein-Bound Non-Esterified Fatty acids in enhancing the Specific Activity of the Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein in Nephrotic Syndrome.

By

Sylvie Braschi*, David Masson**, Guy Rostoker§, Emmanuel Florentin**, Anne Athias**, Claude Martin*, Bernard Jacotot*, Philippe Gambert**, Christian Lallemant**, and Laurent Lagrost**.

*Service de Médecine V, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; **Laboratoire de Biochimie des Lipoprotéines, INSERM CJF 93-10, Faculté de Médecine, Dijon, France; §Service de Néphrologie, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France.

Short title: Non-Esterified Fatty Acids and CETP Activity in Nephrotic Syndrome

Address for correspondence: Laurent Lagrost, Laboratoire de Biochimie Médicale, Hôpital du Bocage, BP 1542, 21034 Dijon, France.
Phone: (33) 03 80 29 38 25. Fax: (33) 03 80 29 36 61.

ABSTRACT

Plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity, evaluated as the percentage of cholesteryl esters transferred from a tracer dose of tritiated high density lipoproteins (HDL) towards the plasma apolipoprotein B-containing lipoproteins, was significantly higher in patients with untreated idiopathic nephrotic syndrome (*n*=15) than in normolipidemic control subjects (*n*=9) (46.9±4.4 *vs* 18.5±2.9 %, respectively; $P < 0.001$). The increased CETP activity in nephrotic plasmas was explained by a significant rise in both the CETP mass concentration (3.2±0.9 *vs* 1.9±0.1 mg/l; $P < 0.001$), and the specific CETP activity calculated as the ratio of CETP activity to CETP mass (0.59±0.04 *vs* 0.38±0.06 %/ng, $P < 0.05$). Elevated CETP activity in nephrotic patients was shown to be associated with a significant decrease in the mean size of low density lipoproteins (LDL) (24.4±0.5 *vs* 26.3±0.5 nm; $P < 0.0001$), as well as in the relative abundance of HDL_{2a} (29.6±1.6 *vs* 34.8±1.1 %; $P < 0.05$). Nephrotic syndrome was characterized by a significant increase in the relative proportion of lipoprotein-bound non-esterified fatty acids (NEFA) (34.4±7.7 *vs* 7.6±3.0 % of total; $P < 0.01$), leading to a significant increase in the electronegative charge of LDL (-4.3±0.1 *vs* -3.9±0.1 mV; $P < 0.05$) and HDL (-11.5±0.1 *vs* -11.1±0.2 mV; $P < 0.05$). As compared with native, non-supplemented plasmas, the removal of lipoprotein-bound NEFA by adding fatty acid-poor albumin to total plasmas significantly decreased CETP activity and specific CETP activity, and the reductions in cholesteryl ester transfer rates were greater in nephrotic patients than in control subjects. It is concluded that, in addition to elevated CETP mass concentration, lipoprotein-bound NEFA, by increasing the negative electrostatic charge of nephrotic lipoproteins, can facilitate the CETP-mediated neutral lipid transfer reaction in total plasma from nephrotic patients.

Key words : Lipids - Nephrosis - Kidney - Hypoalbuminemia - Triglycerides.

INTRODUCTION

It is now clearly established that nephrotic syndrome is associated with hyperlipidemia, which is characterized mainly by a marked increase in plasma total cholesterol, apolipoprotein (apo) B and low density lipoprotein (LDL) cholesterol levels (1-3). Moreover, patients with heavy proteinuria display a substantial increase in plasma triglyceride (TG) and very low density lipoprotein (VLDL) levels (4, 5). Hypercholesterolemia in nephrotic syndrome was shown to relate significantly to both hypoalbuminemia (2, 3) and proteinuria (6-8), indicating a direct linkage between the pathophysiology of the nephrotic syndrome and the alterations in cholesterol metabolism. However, the reasons which may account for the observed abnormalities in plasma lipid and lipoprotein parameters still remain unclear. Earlier studies conducted in patients and animals suggested that the hyperlipidemic state associated with nephrotic syndrome might result either from a reduced catabolism of apo B-containing lipoproteins, *i. e*. VLDL and LDL, (4, 5, 9-13), or from an hepatic oversynthesis of apo B-containing lipoproteins in response to the low oncotic pressure (1, 4, 14, 15). However, that latter hypothesis was challenged by recent studies which revealed that the overproduction of apoB-containing lipoproteins does not constitute a constant feature in nephrotic patients (16). Futhermore, nephrotic syndrome has been recently shown to be associated with a significant increase in the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity (17-19) which *in vivo* catalyses the net mass transfer of cholesteryl esters from LDL and HDL towards the triglyceride-rich lipoproteins, *i.e.* VLDL and intermediate density lipoproteins (IDL), together with the reciprocal net mass transfer of triglycerides from the triglyceride-rich lipoproteins towards LDL and HDL (20, 21). Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from nephrotic patients was shown to relate both to an increase concentration of the cholesteryl ester transfer protein (17), and to some dysfunction of the donor and acceptor lipoprotein substrates (18). However, the abnormalities in lipoprotein particles which might account for alterations in specific CETP activity in nephrotic patients remain unknown.

In addition to the putative oversynthesis of some hepatic proteins in response to low oncotic pressure (1, 4, 14, 15), the marked increase in lipoprotein-bound non-esterified fatty acids (NEFA) (22) might constitute another important factor in accounting for the

dyslipidemic state associated with nephrotic syndrome. Indeed, it is now well-known that marked increases in lipoprotein-bound NEFA constitute one common feature of the hypoalbuminemic states as those observed in nephrotic syndrome and congenital analbuminemia (22-24). During the last decade, several studies conducted both in reconstituted experimental mixtures containing isolated lipoproteins and purified CETP (25-28), and in total human plasma (24, 29), demonstrated that lipoprotein-bound NEFA can increase the interaction of CETP at the lipoprotein surface. The resulting increase in the CETP-mediated transfer of neutral lipids between lipoprotein fractions has been explained in terms of the ability of NEFA to increase the electronegativity of lipoproteins, raising the electrostatic interaction of CETP at the lipoprotein surface, one key step of the neutral lipid transfer reaction (21). Therefore, in addition to a significant increase in CETP levels in nephrotic plasma (17), lipoprotein-bound NEFA might act as activators of CETP activity by enhancing the electrostatic interaction of CETP with nephrotic lipoproteins.

The aim of the present study was to investigate the putative role of lipoprotein-bound NEFA in enhancing CETP activity in nephrotic patients, and to evaluate the relevance of such a mechanism in accounting for some of the lipoprotein disorders associated with the nephrotic syndrome. To this end, both the mass concentration and the activity of CETP were measured in total plasma from fifteen patients with untreated idiopathic nephrotic syndrome and from nine normolipidemic control subjects. The amount of lipoprotein-bound NEFA, as well as their ability to influence the lipoprotein electronegativity were studied in parallel.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

Fifteen consecutive proteinuric patients (six females and nine males; 44±3 (mean ± SEM) years-old) from the Nephrology Department of Henri Mondor Hospital (Créteil, France) were studied. All the patients had untreated nephrotic syndrome defined by heavy proteinuria (> 3 g/day), and hypoalbuminemia (< 35 g/l). Patients with either diabetes mellitus, systemic lupus erythematosus, hypothyroidism, chronic hepatic disease, dyslipidemia preexisting the kidney disease, hematocrit lower than 35%, or an history of familial dyslipidemia were excluded. Study patients were prescribed diuretics (furosemide in seven patients), hypotensive drugs (prazosine in two patients, calcium channel blockers in two, and converting enzyme inhibitors in five) as well as allopurinol in one patient and colchicine in two. All patients were consuming a low salt (< 2g/day sodium) hypocholesterolemic Phase I diet as indicated in the National Cholesterol Education Program (30). Histopathological diagnosis was conducted in all nephrotic patients and were as follows : membranous glomerulonephritis, seven patients; focal segmental sclerosis, four patients; glomerular minimal change, two patients; and amyloidosis, two patients. Creatinine clearance was calculated by the reciprocal of serum creatinine with the formula of D. W. Cockroft et al. (31). The control group consisted of nine healthy normolipidemic subjects (three females and six males; 41±3 year-old) recruited among the medical staff. The mean body mass index (BMI) of nephrotic patients was not significantly different from the mean body mass index of control subjects (22±1 *vs* 23±1 kg/m^2, respectively; *n.s.*). All the study subjects were non-smokers and consumed less than 10 grams of alcohol per day. All of them had a sedentary profession. They did not practise any physical activity, except one nephrotic male and one control male who practised jogging for three to five hours a week, and except one nephrotic female and one control female who practised aerobics for one to two hours a week. The study was approved by the ethical commitee of Henri Mondor Hospital, and informed consents were obtained for all the study subjects.

Blood sampling

Venous blood was collected after an overnight fast into tubes containing 0.1 mg/ml of Na_2-EDTA and placed immediately on ice. Plasma was promptly separated with a 15-min centrifugation at 3,000 rpm, and maintained at 4°C before lipoprotein analysis. Plasma aliquots for cholesteryl ester transfer activity measurements were kept at -80°C until analysis.

Analysis of plasma lipid and lipoprotein components

Total cholesterol, free cholesterol, triglyceride and phospholipid concentrations were determined in total plasma and in isolated lipoprotein fractions with enzymatic reagents (Boehringer, Mannheim, Germany) by using an Abbott diagnostic VP analyser. Plasma concentrations of HDL-cholesterol were determined after precipitation of plasma apoB-containing lipoproteins with phosphotungstic acid and magnesium chloride (Boehringer, Mannheim, Germany). LDL-cholesterol levels were calculated using the formula of Friedewald et al. (32). Apo A-I and apo B were measured with an immunoturbidimetric method (Daichi pure chemicals, Tokyo, Japan). The cholesteryl ester mass content of lipoprotein fractions were calculated as the difference between total cholesterol and free cholesterol, multiplied by 1.67, representing the sum of the esterified cholesterol and fatty acid moieties. Protein concentrations were measured by using the method of Lowry et al. (33) with serum albumin as the standard. Non-esterified fatty acid concentrations were determined in triplicate by using an enzymatic kit (Wako pure Chemicals Industries, Osaka, Japan).

Preparation of lipoprotein fractions by sequential ultracentrifugation

Lipoprotein fractions were separated by sequential ultracentrifugation in a L8-65 ultracentrifuge (Beckman) according to a modification of the procedure of Havel et al. (34). Densities were adjusted by using KBr solutions. VLDL, IDL, LDL, HDL_2, and HDL_3 were isolated step by step as the $d < 1.006$ g/ml, $1.006 < d < 1.019$ g/ml, $1.019 < d < 1.063$ g/ml, $1.063 < d < 1.125$ g/ml, and $1.125 < d < 1.250$ g/ml plasma fractions, respectively. In order to avoid contamination with plasma albumin, HDL_2 and

HDL_3 fractions were washed by a second run at $d = 1.125$ g/ml and $d = 1.250$ g/ml, respectively.

Native polyacrylamide gradient gel electrophoresis

The size distribution of LDL and HDL was determined by electrophoresis of the $d < 1.21$ g/ml plasma fraction on nondenaturing gradient gels ranging from 15 to 250 g/l of polyacrylamide according to the general procedure previously described (35). Densitometric profiles of LDL and HDL were obtained by analyzing Coomassie brilliant blue G-stained gels on a GS-670 imaging densitometer (Bio-Rad). The mean apparent diameter of LDL and HDL subfractions was determined by comparison with protein standard (Pharmacia High Molecular Weight Protein Calibration kit), and carboxylated latex beads (Duke Scientific).

Agarose gel electrophoresis and determination of lipoprotein charge

The electrophoretic mobility of LDL and HDL particles was determined by electrophoresis of total plasma on 0.5 % agarose gels (Paragon Lipo Kit, Beckman), according to the method described by Sparks and Phillips (36). Mean migration distances of LDL and HDL fractions were obtained by analyzing the gel on a Bio-Rad GS-670 imaging densitometer. The surface charge of LDL and HDL was estimated by using the equations given by Sparks and Phillips (36). Electrophoretic mobilities (U) were calculated by dividing the electrophoretic velocity (mean migration distance (mm)/time(s)) by the electrophoretic potential (voltage(V)/gel distance(cm)). To correct the pI-dependent retardation effects, the following equation was applied:

U corrected = (U agarose - 0.136)/1.211

The surface potentials of lipoproteins were calculated by using the Henry's equation (37): S = U x 6pn/D

where n is the coefficient of viscosity (0.0089 poise), and D is the solvent dielectric constant.

CETP Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

CETP mass concentrations were measured by using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay on a Biomek 1000 Biorobotic System (Beckman Instruments) (38). CETP mass concentration values were determined in quadruplicate from a calibration curve obtained with a frozen plasma standard. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 4% and 6%, respectively (38). Results are expressed in milligram of CETP per liter of plasma.

Isotopic assay of plasma cholesteryl ester transfer activity

Plasma cholesteryl ester transfer activity was determined as the capacity of a plasma sample to induce the transfer of tritiated cholesteryl esters from a tracer dose of exogenous ^{3}H-CE-HDL$_3$ towards plasma apoB-containing lipoproteins. Briefly, total plasma (25 ml), ^{3}H-CE-HDL$_3$ (2.5 nmol of cholesterol), and iodoacetate (75 nmol) were incubated for 3 hours at 37°C in a final volume of 50 ml. At the end of the incubation period, incubation mixtures were adjusted to d = 1.068 g/mL, ultracentrifuged for 7 hours at 50000 rpm (269000 g) in a 50.4 Ti rotor on an L7 ultracentrifuge (Beckman). The recovered $d < 1.068$ and $d > 1.068$ g/ml fractions were mixed with a scintillation fluid (OptiPhase Hisafe 3, Pharmacia), and radioactivity was assayed for 5 minutes in a Wallac 1410 liquid scintillation counter (Pharmacia). Results were expressed as net percentages of total radiolabeled cholesteryl esters transferred from exogenous ^{3}H-CE-HDL$_3$ to the plasma apoB-containing lipoproteins (%) (35). Variations in CETP activity among various plasma samples were previously shown not to relate to the relative dilution of exogenous ^{3}H-CE-HDL$_3$ in the plasma HDL pool (35). The intraassay coefficient of variation of cholesteryl ester transfer assay was 5%.

Plasma specific CETP activity was calculated as the ratio of the plasma cholesteryl ester transfer activity to the amount of CETP in the incubation medium, and expressed in percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred per nanogram of CETP (%/ng).

Isotopic assay of plasma phospholipid transfer protein activity

Phospholipid transfer activity was determined in total plasma by measuring the transfer of radiolabeled phosphatidylcholine from phospholipid liposomes (^{14}C-PC-liposomes) to the plasma HDL fraction as previously described (24). The experimental system is specific for phospholipid transfer protein activity since CETP does not transfer phosphatidylcholine from liposomes towards HDL. The results were expressed as percentage of radiolabeled phosphatidylcholine transferred to the plasma HDL fraction (%).

Statistical analysis

Data medians were compared with the non-parametric Mann-Whitney and Wilcoxon signed rank statistic tests, as indicated. Correlation coefficients were calculated by using linear regression analysis.

RESULTS

Nephrologic status in nephrotic patients and control subjects

Plasma albumin concentrations were significantly decreased in nephrotic patients as compared to control subjects (mean±SEM, 25±1 and 45±1 g/l, respectively; $P < 0.001$). None of the nephrotic patients showed significant renal failure, and mean plasma creatinine concentrations were not significantly different in nephrotic patients and control subjects (1.15±0.14 and 0.99±0.12 mg/dl, respectively). Among all study subjects the creatinine clearance was constantly greater than 35 ml/min (range 35 to 173 ml/min), and mean values did not differ between nephrotic patients and control subjects (91±12 and 100±7 ml/min, respectively). Unlike control subjects, all the nephrotic patients showed an heavy proteinuria, ranging from 3 up to 12.5 g/day (mean±SEM: 6.8±0.7 g/day).

Plasma lipid parameters in nephrotic patients and control subjects

As shown in Table I, nephrotic syndrome was characterized by a significant increase in total cholesterol, LDL cholesterol, and triglyceride levels. Conversely, HDL cholesterol levels were significantly lower in nephrotic patients than in control subjects, resulting in a marked, 2.8-fold increase in the plasma LDL to HDL cholesterol ratio. Plasma apo A-I concentrations were not significantly altered in nephrotic patients, while apo B concentrations were significantly increased as compared with controls. Whereas plasma NEFA levels were in the normal range in all study subjects, they were significantly higher in nephrotic patients than in normolipidemic controls (Table I).

In accordance with previous reports (2, 3), plasma albumin concentration correlated negatively and significantly with plasma cholesterol (r = -0.72, $P < 0.001$), plasma triglyceride (r = -0.54, $P < 0.01$), and plasma apoB (r = -0.68, $P < 0.001$) concentrations among the whole population studied (n = 24), but not within nephrotic or control groups. Futhermore, the severity of dyslipidemia seemed to relate to the severity of nephrosis since the 24 hour-urinary protein loss in nephrotic patients (n = 15) correlated positively and significantly with plasma cholesterol levels (r = 0.60, $P < 0.05$), and with plasma apo B levels (r = 0.61, $P < 0.05$).

Composition of Plasma Lipoproteins

Whereas the protein content of isolated lipoproteins did not differ between nephrotic patients and control subjects, significant alterations in the lipid composition of individual lipoprotein fractions were observed. As shown in Table II, variations were characterized by significant increases in the cholesteryl ester content of the apoB-containing lipoprotein fractions, *i.e.* VLDL, IDL, and LDL. In contrast, the triglyceride content of nephrotic VLDL and IDL fractions was significantly decreased, while the triglyceride content of nephrotic HDL_2 and HDL_3 was significantly increased. It results that the cholesteryl ester to triglyceride ratio in lipoproteins from nephrotic patients is significantly higher in VLDL ($P < 0.001$) and IDL ($P < 0.001$), but significantly lower in HDL_2 ($P < 0.05$) and HDL_3 ($P < 0.001$) (Table II). In addition to alterations in the composition of the neutral lipid core of plasma lipoprotein fractions, phospholipids were significantly decreased only in nephrotic HDL_2 ($P < 0.001$). In contrast, the unesterified cholesterol content of plasma lipoprotein fractions was not altered. Overall, the lipid

composition at the lipoprotein surface was not markedly affected in nephrotic patients, and the phospholipid to unesterified cholesterol ratios did not differ significantly between homologous lipoprotein fractions isolated either from nephrotic patients or from control subjects (Table II).

Size Distribution of Plasma Lipoproteins

Based on the mean size of the major plasma LDL subfraction, all the nephrotic patients presented a typical LDL pattern B (mean diameter of the major LDL subfraction below 25.5 nm). In contrast, all the normal controls presented a typical LDL pattern A (mean diameter of the major LDL subfraction above 25.5 nm). The two-group comparison revealed that the mean size of plasma LDL was significantly lower in nephrotic patients than in control subjects (24.4±0.5 *vs* 26.3±0.5 nm, respectively; $P < 0.0001$).

In addition to alterations in LDL size, the distribution of plasma HDL subpopulations, *i.e.* HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b}, and HDL_{3c}, tended to be modified in nephrotic syndrome. The relative proportions of individual HDL subpopulations in nephrotic patients and control subjects, expressed in percentage of total HDL, were as follows: HDL_{2b}, 8.9±1.3 % and 9.5±1.1 %, respectively; HDL_{2a}, 29.6±1.6 % and 34.8±1.1 %, respectively; HDL_{3a}, 35.2±1.3 % and 33.1±1.2 %, respectively; HDL_{3b}, 22.6±2.0 % and 19.7±1.7 %, respectively; HDL_{3c}, 3.8±0.8 % and 2.8±0.3 %, respectively. Differences between nephrotic patients and control subjects reached the statistical significance level only with HDL_{2a} ($P < 0.05$).

Plasma phospholipid transfer activity

Plasma phospholipid transfer activity tended to be lower in nephrotic patients compared to control subjects (6.7±0.6 % *vs* 8.6±0.3 %, respectively). However, the difference did not reach the significance level ($P = 0.11$).

Plasma CETP Activity

As presented in Table III, the rate of transfer of radiolabeled cholesteryl esters from a tracer dose of tritiated HDL3 towards the plasma apoB-containing lipoprotein fraction was significantly increased by approximatively 2.5 fold in nephrotic patients as compared to normal subjects. The increase in plasma cholesteryl ester transfer rates was explained in part by a significant rise in the mass concentration of CETP in nephrotic patients (Table III). However, it is noteworthy that not only the CETP mass concentration but also the ability of CETP to interact with plasma lipoproteins was significantly enhanced in nephrotic plasmas. Indeed, as shown in Table III, specific CETP activity was significantly higher in patients with nephrotic syndrome than in normal controls ($P = 0.012$).

Correlations between neutral lipid transfer activity and plasma lipid and kidney parameters are presented in Table IV. Among all study subjects ($n = 24$), CETP activity, CETP mass, and specific CETP activity exhibited strong and positive correlations with plasma cholesterol concentration, plasma triglyceride concentration, apo B concentration, VLDL+LDL cholesterol concentration, and VLDL+LDL to HDL cholesterol ratio. Whereas HDL cholesterol levels did not correlate significantly with CETP mass, significant and negative correlations were observed with both CETP activity and specific CETP activity (Table IV). Overall, similar significant correlations of CETP activity and specific CETP activity with plasma lipid levels were also observed among nephrotic and control groups. However, specific CETP activity correlated significantly with plasma cholesterol only in control subjects ($P < 0.01$), while it correlated significantly with VLDL+LDL to HDL cholesterol ratio only in nephrotic patients ($p < 0.01$). Finally, whereas significant correlations were observed between CETP mass and plasma lipid levels in all study subjects (Table IV), the relationships did not reach the significance level among nephrotic and control groups.

As indicated in Table IV, plasma albumin concentrations correlated negatively with CETP activity ($P < 0.001$), CETP mass ($P < 0.01$), and specific CETP activity ($P < 0.01$) among all the study subjects ($n = 24$), but the correlations were no longer statistically significant when nephrotic patients and control subjects were considered separately. Among nephrotic patients, urinary protein excretion correlated positively with both CETP activity ($P < 0.05$) and specific CETP activity ($P < 0.05$), but not with CETP mass concentrations (Table IV). In the latter group, no significant correlations between creatinine clearance and CETP measurements, *i.e.* CETP activity, CETP mass, and specific CETP activity, were found.

Effect of Lipoprotein-bound Non-Esterified Fatty Acids on the Electrostatic Charge of Lipoproteins, and on CETP Activity in Plasmas from Nephrotic Patients and Control Subjects.

In addition to increased total plasma NEFA levels (Table I), nephrotic syndrome was associated with a significant increase in the relative proportion of lipoprotein-bound NEFA (34.4±7.7% of total in nephrotic patients *vs* 7.6±3.0% of total in control subjects, $P < 0.01$). As shown in Fig. 1, while NEFA contents were increased in all the ultracentrifugally isolated nephrotic lipoproteins, the difference between nephrotic patients and control subjects reached the significance level only for the LDL fraction (14.8±3.5 % of total plasma NEFA in nephrotic LDL *vs* 0.4±0.4% of total plasma NEFA in control LDL, $P < 0.001$).

In order to assess the consequence of the higher NEFA content of nephrotic lipoproteins in terms of electrostatic charge, the electrophoretic mobilities of plasma LDL and HDL fractions were determined in agarose gels according to the general procedure described under 'Methods'. As compared with controls, nephrotic patients showed significantly higher negative electrostatic charge of lipoproteins, both in LDL (-4.3±0.1 mV *vs* -3.9±0.1 mV, $P < 0.05$) and HDL (-11.5±0.1 mV *vs* -11.1±0.2 mV, $P < 0.05$) fractions. In support of a direct role of hypoalbuminemia in leading to the higher electronegativity of plasma lipoprotein particles, plasma albumin concentrations correlated positively with the mean electrostatic charge of plasma LDL and HDL fractions among all study subjects ($r = 0.77$, $P < 0.0001$ and $r = 0.52$, $P < 0.01$,

respectively) (Fig. 2). However, when nephrotic and control groups were studied separately, only the positive correlation between albumin concentration and the electrostatic charge of LDL in nephrotic plasmas reached the significance level (r = 0.67, $P < 0.01$).

Finally, the proportion of lipoprotein-bound NEFA in plasma was positively and significantly correlated to plasma CETP activity (r = 0.55, $P < 0.01$), and plasma specific CETP activity (r = 0.49, P <0.01) among all study subjects (Table V), but not in individual groups. None of the CETP measurements correlated significantly with the total plasma NEFA concentrations (Table V).

Effect of albumin supplementation on the charge properties of plasma lipoproteins and on CETP activity.

In order to demonstrate further that hypoalbuminemia in nephrotic syndrome can account for alterations in plasma cholesteryl ester transfer activity, the high binding capacity of fatty acid-poor albumin for NEFA was used to remove NEFA from plasma lipoproteins. Subsequently, the effect of the supplementation of total plasmas with albumin on specific CETP activity, as well as on the electrostatic charge of LDL and HDL was investigated (see 'Methods').

As expected, the removal of lipoprotein-bound NEFA by fatty acid-poor albumin induced significant alterations in the electrostatic charge of plasma lipoproteins. Mean charge of LDL increased from -4.3±0.1 mV before albumin supplementation up to -4.1±0.1 mV after albumin supplementation ($P < 0.05$) in nephrotic patients while it remained virtually unchanged in control subjects (-3.9±0.1 mV in both cases). Mean charge of HDL increased from -11.5±0.1 mV before albumin supplementation up to -10.6±0.1 mV after albumin supplementation in nephrotic patients ($P < 0.0001$) and from -11.1±0.1 mV before albumin supplementation up to -10.3±0.1 mV after albumin supplementation ($P < 0.001$) in control subjects.

Fig. 3 shows the effect of supplementation of both normal and nephrotic plasmas with fatty acid-poor albumin on CETP activity. Mean CETP activity decreased significantly from 46.9±4.4 % before albumin supplementation to 37.1±3.6 % after albumin supplementation in nephrotic plasmas ($P < 0.001$), and from 18.4±2.9 % to

14.4±2.2 % in control plasmas ($P < 0.05$) (Fig. 3). Mean specific CETP activity decreased significantly from 0.59±0.04 %/ng before albumin supplementation down to 0.46±0.04 %/ng after albumin supplementation in nephrotic plasmas ($P < 0.001$), and from 0.38±0.06 %/ng before albumin supplementation down to 0.30±0.05 %/ng after albumin supplementation in control plasmas ($P < 0.05$) (Fig. 3). The albumin-mediated reduction in CETP activity was significantly greater in nephrotic plasmas than in control plasmas (-9.8±1.8 % and -4.0±1.4 %, respectively; $P < 0.05$). A similar, however non significant tendency was observed when comparing the albumin-mediated reduction in specific CETP activity in nephrotic and control plasmas (-0.13±0.08 %/ng and -0.08±0.03 %/ng, respectively; $P = 0.09$).

DISCUSSION

In the past, hypoalbuminemia in nephrotic or analbuminemic patients has been often reported to be associated with hyperlipidemia and with high incidence of atherosclerosis (39-43). A recent prospective study conducted in a large group of non-diabetic patients reported a 2.8-fold increase in the relative risk of death from coronary artery disease in patients with nephrotic syndrome compared to control subjects (44). In fact, whereas a high incidence of coronary artery disease has been demonstrated to be associated with increased ratio of plasma non-esterified fatty acid (NEFA) to albumin (45), the high risk for coronary artery disease in hypoalbuminemic patients is still not completely understood. A recent study from our group in patients with familial analbuminemia, a rare genetic disease, revealed that increased amounts of lipoprotein-bound NEFA resulting directly from the hypoalbuminemic state can increase the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP), suggesting that the resulting increase in the transfer of cholesteryl esters from plasma high density lipoproteins (HDL) towards apoB-containing lipoproteins might account, at least in part, for alterations in the lipoprotein profile of analbuminemic patients (24, 41). In the present study, we addressed the question of the ability of plasma NEFA to substantially increase plasma

lipid transfer activity in a frequent disease characterized by both hypoalbuminemia and hyperlipidemia, *i.e.* the nephrotic syndrome.

As previously reported by others (1-3), we observed that nephrotic syndrome is associated with a significant increase in plasma total cholesterol, apolipoprotein B, and low density lipoprotein (LDL) cholesterol levels. Conversely, HDL cholesterol concentration in nephrotic patients was significantly decreased compared to control subjects, leading to an important rise in the LDL to HDL cholesterol ratio. Although the mean plasma triglyceride levels remained in the normal range in all cases, they were significantly higher in nephrotic patients compared to control subjects. In addition to alterations in the concentration of the main plasma lipid components, the composition of individual plasma lipoprotein fractions was significantly modified in nephrotic patients. In contrast to a recent study which reported a significant increase in the phospholipid percentage of nephrotic lipoproteins (3), the lipoprotein phospholipid percentage in the present study was significantly altered only in the nephrotic HDL_2. Overall, the surface lipid composition of individual lipoproteins was not markedly affected in nephrotic patients, and the phospholipid to free cholesterol ratio in various lipoprotein fractions did not vary significantly between nephrotic patients and control subjects. Unlike the surface lipid composition, the neutral lipid content of nephrotic lipoproteins differed significantly from the neutral lipid content of normal counterparts. Indeed, the nephrotic triglyceride-rich lipoproteins, *i.e.* very low density lipoproteins (VLDL) and intermediate density lipoproteins (IDL), showed an important and significant rise in their cholesteryl ester to triglyceride ratio, whereas both HDL_2 and HDL_3 showed a significant decrease in their cholesteryl ester to triglyceride ratio as compared with control lipoproteins. The latter data were in very good agreement with previous findings in nephrotic patients (3, 17, 18).

It is noteworthy that similar alterations in plasma lipoproteins, including significant increase in the cholesteryl ester to triglyceride ratio in VLDL as well as significant increase in the plasma LDL to HDL cholesterol ratio were observed in familial analbuminemia, and were shown to be associated with significant increase in plasma CETP activity (24). In accordance with previous studies (17), plasma CETP mass concentration was markedly and significantly increased in all the nephrotic patients of

the present study. Although in a previous study the plasma CETP mass concentration tended also to be raised above the normal values in patients with analbuminemia, the difference from control values did not reach the significance level due to the small number of analbuminemic patients studied (24). Overall, it appears that the hypoalbuminemic state might result *in vivo* in a significant increase in the plasma CETP mass concentration. Although no conclusive explanation can be provided at this stage, at least two main hypothesis might account for increased plasma CETP concentration in nephrotic patients: *i)* as previously observed for some hepatic proteins (1, 4), CETP might be overproduced in response to the low oncotic pressure associated with hypoalbuminemia, and *ii)* hypercholesterolemia *per se* might secondarily induce increased plasma CETP levels (46). In support of increased plasma CETP activity in nephrotic patients, the isotopic transfer of cholesteryl esters from HDL towards plasma apoB-containing lipoproteins was significantly increased in nephrotic plasmas as compared with normal controls. Conversely, phospholipid transfer activity tended to be lower in nephrotic patients than in control subjects, but the difference between the two groups did not reach the significance level.

Plasma NEFA are known to partition between albumin, membranes of endothelial and blood cells, and lipoprotein particles (47), and the distribution of NEFA was shown to be dependent on the NEFA to albumin ratio (48). In support of the latter view, direct analysis of the NEFA content of plasma lipoproteins revealed that hypoalbuminemic states, as observed in nephrotic syndrome or familial analbuminemia, are accompanied by the shift of NEFA from the albumin-containing plasma fraction towards the lipoprotein-containing plasma fraction (22-24). It is now clearly established that an increased proportion of lipoprotein-bound NEFA can increase the electronegativity of plasma lipoproteins, increasing both the interaction of CETP at the lipoprotein surface and the transfer of cholesteryl esters between lipoprotein particles (25, 26, 28, 49). In accordance with previous studies (22), we observed that the nephrotic syndrome was associated with a redistribution of plasma NEFA towards the lipoprotein fractions, and as a consequence the electronegativity of LDL and HDL was significantly higher in nephrotic patients than in control subjects. In fact, significant relationships between the electronegativity of plasma lipoproteins and the severity of hypoalbuminemia were

observed in nephrotic patients. These observations extended previous data from our group conducted both in normal subjects (29), and in patients with familial analbuminemia (24). They indicate that the NEFA-mediated increase in plasma CETP activity may be of pathophysiological relevance.

In order to demonstrate further the role of lipoprotein-bound NEFA in increasing CETP activity in plasma from nephrotic patients, we took advantage of the high binding capacity of albumin for NEFA to remove NEFA from plasma lipoprotein particles, and to evaluate the effect in terms of lipoprotein electrostatic charge and cholesteryl ester transfer activity. As predicted, the incubation of total nephrotic plasmas with fatty acid-poor albumin reduced significantly the electronegativity of LDL and HDL fractions. While fatty acid-poor albumin also reduced the electronegativity of normal HDL in normal plasmas, no changes in normal LDL were observed. Finally, mean CETP activity and specific CETP activity were significantly reduced by the fatty acid-poor albumin treatment, and reductions in cholesteryl ester transfer rates were greater in nephrotic patients than in control subjects. The latter observations might explain in part the reduction in lipoprotein abnormalities observed *in vivo* after infusions of albumin in patients with nephrotic syndrome (50).

Another important point of the present study was the modification in the size distribution of lipoprotein particles in nephrotic patients as compared with normal controls. We observed that increased CETP activity in nephrotic syndrome is associated with the predominance of small-sized LDL particles which are characteristic of LDL pattern B, whereas control subjects showed typical LDL pattern A with the predominance of large-sized LDL particles (51). Since CETP has been shown to constitute one key factor in determining the size distribution of LDL particles (52, 53), and in particular in transforming typical LDL pattern A into typical LDL pattern B (53), the predominance of small-sized LDL in nephrotic patients might directly result from increased plasma lipid transfer activity. Not only the size distribution of plasma LDL, but also the size distribution of plasma HDL subpopulations tended to be modified in nephrotic syndrome. Indeed, as compared with normal HDL, nephrotic HDL tended to be shifted towards the small-sized range. However, only the decrease in the relative abundance of HDL_{2a} in nephrotic plasmas reached the statistical significance. Recent

studies from our group demonstrated that plasma CETP can specifically reduce the relative abundance of HDL_{2a}, while plasma PLTP can specifically increase the relative abundance of HDL_{2b} (54). In good agreement with the latter observations, it is noteworthy that in nephrotic patients the significant increase in plasma CETP activity was associated with a significant decrease in the HDL_{2a} subpopulation, while neither plasma PLTP activity nor the relative abundance of HDL_{2b} were significantly modified. Taken together, alterations in the size distribution of LDL and HDL particles in nephrotic patients point out the important role of CETP in reducing the size of lipoprotein particles *in vivo*.

In conclusion, the present study demonstrated that nephrotic syndrome is associated with significant increases in both the mass concentration and the activity of plasma CETP. In particular, abnormally elevated proportions of lipoprotein-bound NEFA in nephrotic patients were shown to significantly increase the ability of CETP to transfer cholesteryl esters between plasma lipoproteins. These observations might account at least in part for some of the lipoprotein abnormalities associated with nephrotic syndrome.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, the Groupe Lipides Nutrition, the Université de Bourgogne, the Conseil Régional de Bourgogne, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Caroline Rousseau and Françoise Berneau are greatly acknowledged for their secretarial assistance.

FOOTNOTES

[1] Abbreviations used: Apo, Apolipoprotein; BMI, Body Mass Index; CE, Cholesteryl esters; CETP, Cholesteryl Ester Transfer Protein; HDL, High Density Lipoprotein; IDL, Intermediate Density Lipoprotein; ^{3}H-CE-HDL$_3$, HDL$_3$ containing radiolabeled cholesteryl esters; LCAT, Lecithin:Cholesterol Acyltransferase; LDL, Low Density Lipoprotein; NEFA, Non-Esterified Fatty Acids; PLTP, phospholipid transfer protein; TG, Triglycerides; VLDL, Very Low Density Lipoprotein

REFERENCES

1. Joven J, Villabona CV, Vilella E, Masaa L, Alberti R, Valles M. Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1990;323:579-584.
2. Appel GB, Blum CB, Chien SC, Kunis CL, Appel AS. The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome. Relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure, and viscosity. *N Engl J Med* 1985;312:1544-1548.
3. Gherardi E, Rota E, Calandra S, Genova R, Tamborino A. Relationship among the concentrations of serum lipoproteins and changes in their chemical composition in patients with untreated nephrotic syndrome. *Eur J Clin Invest* 1977;7:563-570.
4. Warwick GL, Caslake MJ, Boulton-Jones JM, Dagen M, Packard CJ, Sheperd J. Low-density lipoprotein metabolism in the nephrotic syndrome. *Metabolism*. 1990;39:187-192.
5. Warwick GL, Packard CJ, Demant T, Bedford DK, Boulton-Jones JM, Sheperd J. Metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in subjects with nephrotic-range proteinuria. *Kidney Int* 1991;40:129-138.
6. Keilani T, Schlueter WA, Levin ML, Batlle DC. Improvement of lipid abnormalities associated with proteinuria using Fosinopril, and angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Ann Intern Med* 1993;118:246-254.
7. Kaysen GA, Gambertoglio J, Felts J, Hutchison FN. Albumin synthesis, albuminuria, and hyperlipidemia in nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1987;31:1368-1376.
8. Joven J, Simo JM, Vilella E, Camps J, Espinel E, Villbona C. Accumulation of atherogenic remnants and lipoprotein(a) in the nephrotic syndrome: relation to remission of proteinuria. *Clin Chem* 1995;41:908-913.
9. Garber DW, Gottlieb BA, Marsh JB, Sparks CE. Catabolism of very low density lipoproteins in experimental nephrosis. *J Clin Invest* 1984;74:1375-1383.
10. Strapans I, Felts JM, Couser WG. Glycosaminoglycans and chylomicron metabolism in control and nephrotic rats. *Metabolism* 1987;36:496-501.
11. Yoshino G, Hirano T, Nagata K, Maeda E, Naka Y, Murata Y, Kasumi T, Kasuga M. Hypertriglyceridemia in nephrotic rats is due to a clearance defect of plasma triglycerides: overproduction of triglyceride-rich lipoprotein is not an obligatory factor. *J Lipid Res* 1993;34:875-884.
12. Levy E, Ziv E, Bar-On H, Shafrir E. Experimental nephrotic syndrome: removal and tissue distribution of chylomicrons and very-low-density lipoproteins of normal and nephrotic origins. *Biochim Biophys Acta* 1990;1043:259-266.
13. Davies RW, Staprans L, Hutchison FN, Kaysen GA. Proteinuria, not altered albumin metabolism, affects hyperlipidemia in nephrotic rats. *J Clin Invest* 1990;86:600-605.
14. Marsh JB, Sparks CE. Hepatic secretion of lipoproteins in the rat and the effect of experimental nephrosis. *J Clin Invest* 1979;64:1229-1237.
15. Davis RA, Engelhorn SC, Weinstein DB, Steinberg D. Very low density lipoprotein secretion by cultured rat hepatocytes. Inhibition by albumin and other macromolecules. *J Biol Chem* 1980;255:2039-2045.

16. Vega GL, Toto RD, Grundy SM. Metabolism of low density lipoproteins in nephrotic dyslipidemia: comparison of hypercholesterolemia alone and combined hyperlipidemia. *Kidney Int* 1995;47:579-586.
17. Moulin P, Appel GB, Gonsberg HN, Tall AR. Increased concentration of plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome: role in dyslipidemia. *J Lipid Res* 1992;33:1817-1822.
18. Subbaiah P, Rodby RA. Abnormal acyltransferase activities and accelerated cholesteryl ester transfer in patients with nephrotic syndrome. *Metabolism* 1994;43:1126-1133.
19. Dullaart RPF, Gansevoort RT, Dikkeschei BD, De Zeeuw D, De Jong PE, Van Tol A. Role of elevated lecithin: cholesterol acyltansferase and cholesteryl ester transfer protein activities in abnormal lipoproteins from proteinuric patients. *Kidney Int* 1993;44:91-97.
20. Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 1995;64:235-257.
21. Lagrost L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity. Review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1994;1215:209-236.
22. Shafrir E. Partition of unesterified fatty acids in normal and nephrotic syndrome serum and its effect on serum electrophoretic pattern. *J Clin Invest* 1958;37:1775-1782.
23. Baldo-Enzi G, Baiocchi MR, Vigna G, Andrian C, Mosconi C, Fellin R. Analbuminaemia: a natural model of metabolic compensatory systems. *J Inher Dis* 1987;10:317-329.
24. Braschi S, Lagrost L, Florentin E, Martin C, Athias A, Gambert P, Krempf M, Lallemant C, Jacotot B. Increased cholesteryl ester transfer activity in plasmas from analbuminemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:441-449.
25. Sammett D, Tall AR Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. *J Biol Chem* 1985;260:6687-6697.
26. Barter PJ, Chang LBF, Rajaram OV. Sodium oleate promotes a redistribution of cholesteryl esters from high to low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1990;84:13-24.
27. Lagrost L, Barter PJ. Effects of various non-esterified fatty acids on the transfer of cholesteryl esters from HDL to LDL induced by the cholesteryl ester transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1991;1085:209-216.
28. Nishida HI, Arai H, Nishida T. Cholesteryl ester transfer mediated by lipid transfer protein is influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *J Biol Chem* 1993;268:16352-16360.
29. Lagrost L, Florentin E, Guyard-Dangremont V, Athias A, Gandjini H, Lallemant C, Gambert P. Evidence for nonesterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1388-1396.
30. National Cholesterol Education Program. Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel II). *Circulation* 1994;89:1329-1445.
31. Cockroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.

32. Friedewald TW, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of the low density lipoprotein cholesterol in serum, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein mesurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;192:265-270.
34. Havel RJ, Heder HA, Bragdon JM. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-1353.
35. Lagrost L, Gandjini H, Athias A, Guyard-Dangremont V, Lallemant C, Gambert P. Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993;13:815-825.
36. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res* 1991;33:123-130.
37. Abramson HA, Moyer LS, Gorin MH. Electrophoresis of proteins. Reinhold Publishing Corp., New York. 1942;105-172.
38. Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P, Lallemant C. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin Chim Acta* 1994;231:147-160.
39. Shetlar MR, Payne RW, Stidworthy G, Mock D. Absence of serum albumin associated with rheumatoid arthritis. *Ann Int Med* 1959;51:1379-1384.
40. Montgomery DAD, Neill DW, Dowdle EBD. Idiopathic hypoalbuminaemia. *Clin Sci* 1962;22:141-154.
41. Waldmann TA, Gordon RS, Rosse W. Studies on the metabolism of the serum proteins and lipids in a patient with analbuminemia. *Am J Med* 1964;37:960-968.
42. Berlyne GM, Mallick NP. Ischemic heart disease as a complication of nephrotic syndrome. *Lancet* 1969;ii:399-400.
43. Curry RC, Roberts WC. Status of the coronary arteries in the nephrotic syndrome. Analysis of 20 necropsy patients aged 15 to 35 to determine if coronary atherosclerosis is accelerated. *Am J Med* 1977;63:183-192.
44. Ordonez JD, Hiatt RA, Killebrew EJ, Fireman BH. The increased risk of coronary heart disease associated with nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1993;44:638-642.
45. Pickard L. Increased ratio of plasma free fatty acids to albumin during normal agin and in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1983;46:21-28.
46. McPherson R, Mann CJ, Tall AR, Hogue M, Martin L, Milne RW, Marcel YL. Plasma concentrations of cholesteryl ester transfer protein in hyperlipoproteinemia. Relation to cholesteryl ester transfer protein activity and other lipoprotein variables. *Arterioscler Thromb* 1991;11:797-804.
47. Small DM. Physical properties of fatty acids and their extracellular and intracellular distribution. In Polyunsaturated Fatty Acids in human Nutrition. U. Bracco and R.J. Deckelbaum, editors. Neslé Nutrition Workshop Series. Nestec Ltd. Vevey/Raven Press Ltd. New-York. 1992;28:25-39.
48. Cistola DP, Small DM. Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance study. *J Clin Invest* 1991;87:1431-1441.

49. Pattnaik NM, DB Zilversmit. Interactions of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1979;254:2782-2786.
50. Baxter JM, Goodman HC, Allen JC. Effects of infusions of serum albumin on serum lipids and lipoproteins in nephrosis. *J Clin Invest* 1961;40:490-497.
51. Austin MA, Krauss RM. Genetic control of low density lipoprotein subclasses. *Lancet* 1986;8507:592-595.
52. Deckelbaum RJ, Eisenberg S, Oschry Y, Butbul E, Sharon I, Olivecrona T. Reversible modification of human plasma low density lipoproteins towards triglyceride-rich precursors: a mechanism for losing excess cholesterol esters. *J Biol Chem* 1982;257:6509-6517.
53. Lagrost L, Gambert P, Lallemant C. Combined effects of lipid transfers and lipolysis on gradient gel patterns of human plasma LDL. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1327-1336.
54. Lagrost L, Athias A, Herbeth B, Guyard-Dangremont V, Artur Y, Paille F, Gambert P, Lallemant C. Opposite effects of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein on the size distribution of plasma high density lipoproteins. Physiological relevance in alcoholic patients. *J Biol Chem* 1996;271:19058-19065.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Distribution of non-esterified fatty acids among plasma lipoprotein fractions. Plasma lipoprotein fractions were isolated by sequential ultracentrifugation and NEFA were assayed as described under 'Methods'. The results are expressed as the percentage of total plasma NEFA bound to each lipoprotein fraction in fifteen nephrotic patients and nine control subjects. Values are mean±SEM. Significance of the difference between nephrotic patients and control subjects, ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney test). NEFA, non-esterified fatty acids; VLDL, very low density lipoproteins; IDL, intermediate density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins; HDL, high density lipoproteins.

Fig. 2. Relationships between the plasma albumin concentration and the electrostatic charge of plasma LDL and HDL lipoprotein fractions. Plasma LDL and HDL fractions were isolated by sequential ultracentrifugation and their electrophoretic charges was determined as described under 'Methods'. The scatterplot shows data from fifteen nephrotic patients (closed circles) and nine control subjects (opened circles). Coefficients of correlation were determined by linear regression analysis.

Fig. 3. Effects of supplementation of total plasmas with fatty acid-poor albumin on CETP activity and specific CETP activity. CETP activity (upper graphs) is expressed as the percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred from exogenous HDL_3 towards plasma apo B-containing lipoproteins in the incubation conditions (see 'Methods'). Specific CETP activity (lower graphs) has been calculated as the percentage of the CETP activity to the CETP mass in the incubation medium, and expressed in percentage of radiolabeled cholesteryl esters transferred per hour and per nanogram of CETP (see 'Methods'). Cholesteryl ester transfer activities were determined in total plasma which were supplemented or not with fatty acid-poor albumin (40 g/l). Individual decreases in CETP activity and specific CETP activity are represented with thin lines. Means±SEM of nephrotic and control populations are represented with big

points. Thick lines represent the mean decrease in cholesteryl ester transfer. *P* values were determined by using Wilcoxon signed rank test.

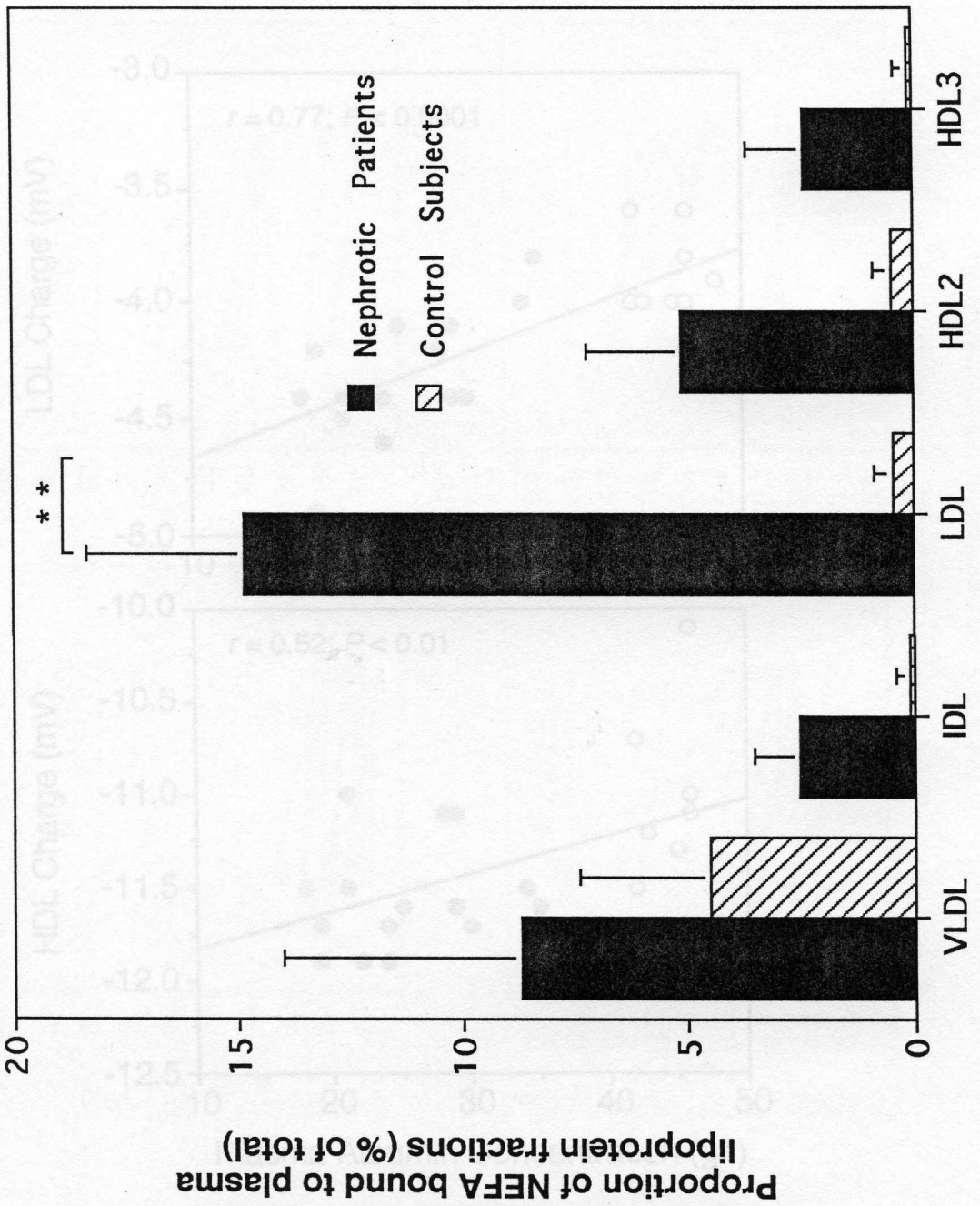


Figure 1: **Distribution of non-esterified fatty acids among plasma lipoproteins fractions.**

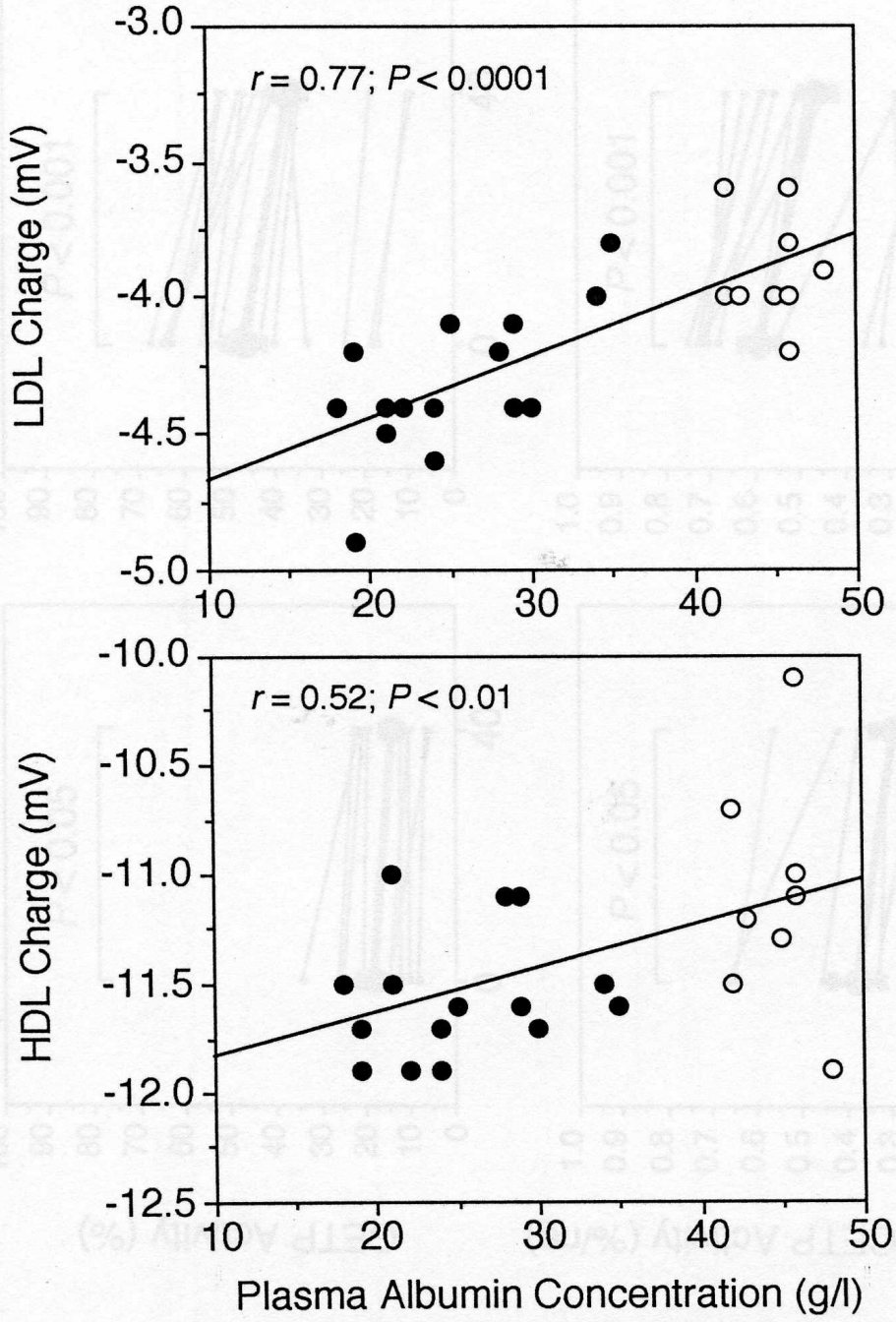


Figure 2: **Relationships between the plasma albumin concentration and the electrostatic charge of plasma LDL and HDL lipoprotein fractions.**

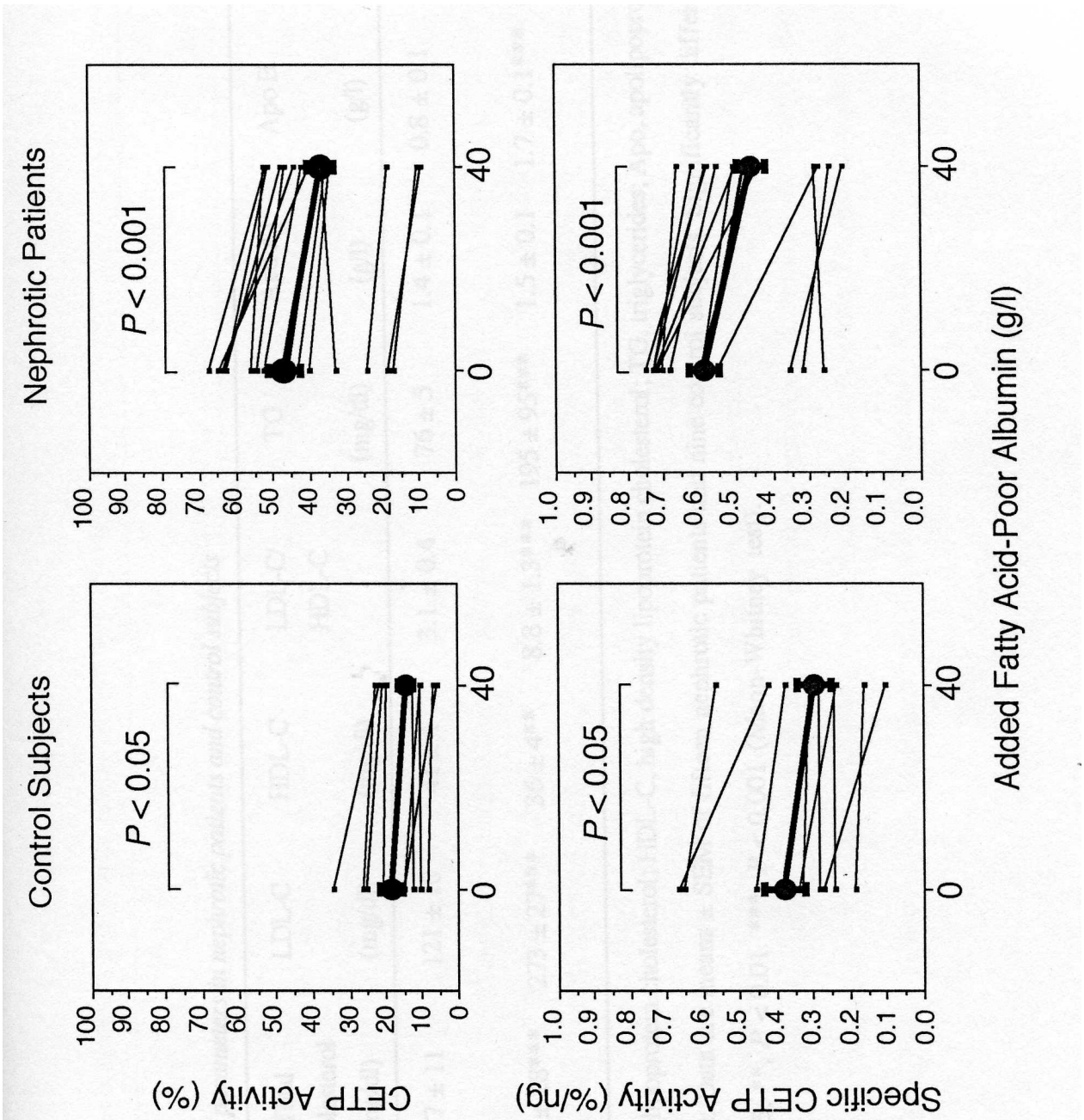


Figure 3: **Effects of supplementation of total plasmas with fatty acid-poor albumin on CETP activity and specific CETP activity.**

Table I. Plasma lipid parameters in nephrotic patients and control subjects

Subjects	Total cholesterol (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C/ HDL-C	TG (mg/dl)	Apo A1 (g/l)	Apo B (g/l)	NEFA (mmol/l)
Control subjects	177 ± 11	121 ± 10	41 ± 1	3.1 ± 0.4	76 ± 5	1.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.121 ± 0.060
Nephrotic patients	348 ± 28***	273 ± 27***	36 ± 4**	8.8 ± 1.3***	195 ± 95***	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1***	0.193 ± 0.028*

LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; Apo, apolipoprotein; NEFA, non esterified fatty acids. Data are means ± SEM of fifteen nephrotic patients and nine control subjects. Significantly different from control subjects; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test).

Table II. Plasma lipoprotein composition in nephrotic patients and control subjects

Lipoproteins	Patients	PL	FC	TG	CE	Protein	PL/CL ratio	CE/TG ratio
				(% of lipoprotein mass)				
VLDL	Controls	17.9±0.6	5.3±0.6	57.5±1.4	7.1±1.0	12.1±1.3	3.7±0.3	0.1±0.1
	Nephrotic	18.9±0.5	6.0±0.4	49.1±1.4**	13.6±0.9***	12.3±1.7	3.1±0.3	0.3±0.1***
IDL	Controls	22.2±0.8	8.3±1.0	35.7±1.9	18.5±1.9	15.5±1.6	3.0±0.4	0.5±0.1
	Nephrotic	21.2±0.4	8.2±0.2	27.9±1.3**	26.9±1.2**	15.5±1.3	2.6±0.1	1.0±0.1***
LDL	Controls	24.1±0.7	9.9±0.3	5.7±0.3	37.9±1.1	22.3±1.5	2.4±0.1	6.9±0.6
	Nephrotic	22.8±0.3	9.9±0.2	6.3±0.4	41.5±0.9*	19.4±1.1	2.3±0.1	6.9±0.5
HDL2	Controls	32.9±1.6	5.3±0.3	3.1±0.3	18.0±2.0	40.5±2.4	6.3±0.3	6.2±0.7
	Nephrotic	24.0±1.0***	4.7±0.2	5.3±0.4**	22.3±1.2	43.7±2.0	5.3±0.3	4.2±0.4*
HDL3	Controls	24.9±0.9	2.9±0.2	2.5±0.2	15.7±1.4	53.9±2.2	8.8±0.7	6.4±0.5
	Nephrotic	21.8±1.3	2.5±0.2	3.8±0.3**	15.4±1.2	56.5±2.5	9.7±1.0	4.2±0.3***

Plasma lipoprotein fraction were ultracentrifugally isolated and lipoprotein components were assayed as described under 'Materials and Methods'. Results are expressed as percentage of total lipoprotein mass. VLDL, Very low density lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; PL, phospholipids; FC, free cholesterol; TG, triglycerides; EC, esterified cholesterol. Data are means ± SEM of fifteen nephrotic patients and nine control subjects. Significantly different from controls; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test).

Table III. Plasma cholesteryl ester transfer activity in nephrotic patients and control subjects

Subjects	CETP activity (%)	CETP mass (mg/l)	Specific CETP activity (%/ng)
Control subjects	18.5±2.9	1.9±0.1	0.38±0.06
Nephrotic patients	46.9±4.4***	3.2±0.9***	0.59±0.04*

CETP activity represents the percentage of radiolabelled cholesteryl esters transferred from a tracer dose of exogenous HDL3 towards the $d < 1.068$ g/mL plasma fraction. CETP mass was determined with a competitive enzyme-linked immunosorbent assay as indicated in 'Methods'. The specific CETP activity was calculated as the ratio of the CETP activity to the CETP mass in the incubation media (See 'Methods'). CETP, cholesteryl ester transfer protein. Values are means ± SEM of 15 nephrotic patients and 9 normolipidemic control subjects. Significantly different from controls; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test).

Table IV. Correlations of CETP activity and CETP mass with plasma lipoprotein and kidney parameters in nephrotic patients and control subjects (n = 24)

Lipoprotein and kidney parameters	CETP mass	CETP activity	Specific CETP activity
Cholesterol	.65***	.82***	.68***
Triglycerides	.56**	.66***	.54**
Apolipoprotein B	.57**	.84***	.77***
VLDL+LDL cholesterol	.63***	.87***	.72***
HDL cholesterol	- .16	- .42*	- .63***
VLDL+LDL/HDL cholesterol	.46*	.83***	.77***
Albumin	-.64***	-.60**	-.51**
Proteinuria	.62*	.19	.53*

Values are linear correlation coefficients (r). Correlations of CETP activity and CETP mass with proteinuria concern only nephrotic patients.

CETP, cholesteryl ester transfer protein; VLDL, very low density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (Linear regression analysis).

Table V. Correlation of plasma NEFA and lipoprotein-bound NEFA with CETP activity.

CETP activity	Total plasma NEFA	Lipoprotein-bound NEFA (% of total plasma NEFA)
CETP mass	- .12	.38
CETP activity	- .22	.55**
Specific CETP Activity	- .19	.49**

Values are linear coefficients of correlation (r) calculated with all study subjects ($n = 24$).

NEFA, non-esterified fatty acids; CETP, cholesteryl ester transfer protein.

**$P < 0.01$ (Linear regression analysis).

ANNEXE 4

Polyacrylamide gradient gel electrophoresis as a method to measure transfers of radiolabeled cholesteryl esters between several plasma lipoprotein fractions.

FLORENTIN, E., LAGROST, L., LALLEMANT, C. & GAMBERT, P.

Anal. Biochem. **216**, 352-357 (1994)

ANALYTICAL BIOCHEMISTRY **216,** 352–357 (1994)

Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis as a Method to Measure Transfers of Radiolabeled Cholesteryl Esters between Several Plasma Lipoprotein Fractions

Emmanuel Florentin, Laurent Lagrost, Christian Lallemant, and Philippe Gambert
Laboratoire de Biochimie des Lipoprotéines, Faculté de Médecine, Dijon, France

Received August 23, 1993

In human plasma, cholesteryl esters can redistribute between various lipoprotein fractions through an exchange reaction mediated by the cholesteryl ester transfer protein. In the present study, liquid scintillation counting of polyacrylamide gradient gel fragments was applied to the determination of transfers of radiolabeled cholesteryl esters between different lipoprotein fractions. This method consisted in four successive steps: (1) incubation of total human plasmas with a tracer dose of high-density lipoproteins (HDL) containing tritium ^{3}H-labeled cholesteryl esters, (2) separation of plasma lipoprotein fractions by electrophoresis in 20–160 g/liter polyacrylamide gels, (3) cutting off and dissolution with a NaOCl solution of polyacrylamide gel fragments which contained the different lipoprotein fractions, (4) liquid scintillation counting of the dissolved gel fragments. The present method provided a convenient and accurate method of determining the rate of cholesteryl ester transferred between several plasma lipoprotein classes. As an example, it was applied to the measurement of the rates of radiolabeled cholesteryl esters transferred from either HDL_3 or HDL_2 toward the two other main plasma lipoprotein fractions, very-low-density lipoproteins and low-density lipoproteins. © 1994 Academic Press, Inc.

In plasma, cholesteryl esters and triglycerides are transported in the hydrophobic core of lipoprotein particles. In a number of species, including man, neutral lipids may redistribute between various lipoprotein fractions through an exchange reaction mediated by a specific factor, the cholesteryl ester transfer protein (CETP)[1] (1). Cholesteryl ester transfer reactions result in the net mass transfer of cholesteryl esters from high-density lipoproteins (HDL) to lipoproteins of lower densities, very-low-density lipoproteins (VLDL) and low-density lipoproteins (LDL). Many epidemiological studies have clearly demonstrated that the incidence of coronary artery disease correlates positively with plasma LDL-cholesterol levels but negatively with plasma HDL-cholesterol levels (2,3). As CETP is one of the factors which may determine the distribution of cholesterol between LDL and HDL fractions, several assays have been developed to measure cholesteryl ester transfer activity in various biological samples, including human plasma. Most of the methods used to assay cholesteryl ester transfer activity were based on the measurement of the rate of radiolabeled cholesteryl esters transferred from one donor to one acceptor lipoprotein substrate (4). However, the transfer reaction catalyzed by CETP is very complex and cholesteryl ester transfers may occur between all plasma lipoprotein fractions. Thus, the measurement of the transfer of radiolabeled cholesteryl esters from one radiolabeled lipoprotein tracer toward one single acceptor lipoprotein substrate may only partially reflect cholesteryl ester transfers as they occur in native plasma. Consequently, complete and reliable evaluations of cholesteryl ester transfer activity in total plasma should integrate the totality of cholesteryl ester transfer reactions. This implies the fractionation of all the distinct plasma lipoprotein classes, which is somewhat difficult to realize with sequential techniques, such as ultracentrifugation or precipitation. In the present study, multiple cholesteryl ester transfers were evaluated by using another approach

[1] Abbreviations used: CETP, cholesteryl ester transfer protein; HDL, high-density lipoproteins; VLDL, very-low-density lipoproteins; LDL, low-density lipoproteins; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HDL_3, high-density lipoprotein-subfraction 3; PBS, phosphate-buffered saline; LCAT, lecithin:cholesterol acyltransferase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

0003-2697/94 $6.00
Copyright © 1994 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

to separate various lipoprotein classes. It consisted in the electrophoretic separation of lipoprotein classes in native polyacrylamide gradient gels followed successively by cutting off, sodium hypochlorite (NaOCl) dissolution, and radioactive counting of the polyacrylamide gel fragments which contained the different lipoprotein classes. As an example, this electrophoretic method was used in the present report to evaluate the rate of radiolabeled cholesteryl esters transferred from HDL toward the two other main plasma lipoprotein fractions, VLDL and LDL.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

[1α,2α(n)-^{3}H]Cholesterol (sp act 46 Ci/mmol) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, England). Scintillation fluid (OptiPhase HiSafe 3) was obtained from LKB Scintillation Products (FSA Laboratories Supplies, Loughbourough, Leics, England). Sodium hypochlorite (NaOCl) was purchased from S.A. GEDE (Lyas PRIVAS 07, France). Sudan Black B were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Urea (R.P. Normapur AR) was from Prolabo Rhône-Poulenc Ltd. (Manchester, England). Polyacrylamide gradient gels PAA 2/16 were purchased from Pharmacia LKB (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Plasma Samples

Venous blood was collected after an overnight fast into EDTA-containing tubes which were immediately placed at 4°C. Plasmas were promptly separated by a 5-min centrifugation and were kept at 4°C.

Preparation of Radiolabeled HDL_3 and HDL_2

HDL_3 were biosynthetically labeled according to the general procedure previously described (5). Briefly, the $d > 1.13$ g/ml fraction from 20 ml of normolipidemic plasma was incubated with 10 nmol of radiolabeled cholesterol for 24 h at 37°C in a shaking water bath to allow the biosynthesis of radiolabeled cholesteryl esters in HDL_3 particles through the lecithin:cholesterol acyltransferase reaction (6). When required, radiolabeled HDL_2 were prepared by adding to the incubated mixture the $1.070 < d < 1.120$ g/ml fraction obtained from 20 ml of normolipidemic plasma. The incubation was then prolonged for a 6-h period to allow the exchange of radiolabeled esterified cholesterol between HDL subfractions. At the end of the incubation, radiolabeled HDL_3 and HDL_2 were isolated by sequential ultracentrifugation. Densities were adjusted with solid KBr. Sequential ultracentrifugation was conducted at a speed of 100,000 rpm (356,000g) in a TLA-100.2 rotor in a Beckman TL-100 ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA). HDL_3 were isolated as the fraction of density 1.13–1.21 g/ml with a single 7-h spin at the lowest density and two 10-h spins at the highest density. HDL_2 were isolated as the fraction of density 1.07–1.12 g/ml with a single 5-h spin at the lowest density and two 7-h spins at the highest density. The resulting HDL subfractions were dialyzed overnight at 4°C against a 154 mmol/liter NaCl, 10 mmol/liter, Na_2HPO_4, 5 mmol/liter NaH_2PO_4, buffer (PBS buffer), pH 7.2. As determined by thin-layer chromatography, the final HDL_3 and HDL_2 preparations contained labeled cholesteryl ester which accounted for at least 95% of the total radioactivity. A tracer dose (10 nmol of cholesterol) of either radiolabeled HDL_3 or radiolabeled HDL_2 was added to 150 μl of human plasma in a final volume of 200 μl. Plasma lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) activity was blocked by adding iodoacetate (final concentration, 1.5 mmol/liter). Mixtures were incubated at 37°C in an incubator.

Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis

Prior to electrophoresis, lipoproteins were prestained for lipids by mixing 1 vol of incubated mixtures with 1 vol of a 5 g/liter solution of Sudan black B in ethylene glycol, as described by Gambert *et al.* (7). Sudan black B solution was added under gentle stirring and samples were placed at 4°C for 15 min. Electrophoresis was conducted according to the general procedure previously described (7). After a 1-h, 50-V preelectrophoresis, a 10-μl aliquot of stained incubation mixtures was applied to a 20–160 g/liter polyacrylamide gradient gel in a 3-mm large slot. The electrophoresis was performed at 4°C for 2 h at 30 V, 1 h at 60 V and 14 h at 80 V. The migration buffer was a 14 mmol/liter Tris, 110 mmol/liter glycine, 1.5 mmol/liter sodium azide, solution, pH 8.4. At the end of electrophoresis, portions of the gel containing each lipoprotein fractions were cut off with a scalpel blade and transferred into polyethylene, screw-capped, 20-ml tubes.

Radioactivity Counting of Polyacrylamide Gel Fragments

Total radioactivity in polyacrylamide gel fragments was counted after their dissolution in the presence of sodium hypochlorite (NaOCl). Dissolution was based on the conversion of amides into amines induced by the treatment with NaOCl according to the Hofmann reaction (8). In practice, gel fragments were mixed with 6 ml of a 90 g/liter sodium hypochlorite solution. The mixtures were subsequently kept overnight at room temperature in order to allow the complete dissolution of gel portions. After dissolution, the excess of NaOCl was neutralized by adding slowly 400 μl of a 8 mol/liter urea aqueous solution to each counting vial. Finally, a 12-ml volume of scintillation fluid was added to each vial and the radioactivity was assayed for 5 min in a Wallac 1410 liquid scintillation counter (Pharmacia) and expressed in dpm.

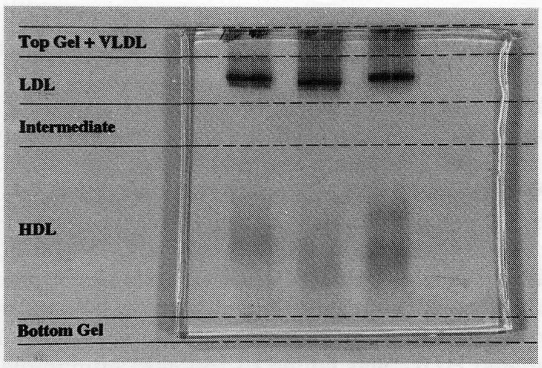


FIG. 1. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of total plasma prestained for lipids with Sudan Black B. Ten-microliter aliquots of plasma samples prestained for lipids were applied to a 20–160 g/liter polyacrylamide gradient gel and submitted to electrophoresis as described under Materials and Methods. At the end of the electrophoresis, 'top-gel + VLDL', 'LDL', 'intermediate', 'HDL' and 'bottom gel' portions were delimited as shown on this figure and were cut off with a scalpel blade.

Ultracentrifugation

In some experiments, plasma VLDL + LDL were also separated from other plasma components by a single ultracentrifugation spin at density 1.063 g/ml. Density was adjusted by the addition of KBr. Ultracentrifugation was conducted for 16 h at a speed of 37,000 rpm (140,000*g*) in a 50.4 Ti rotor in a Beckman L-7 ultracentrifuge. VLDL + LDL-containing fraction ($d < 1.063$ g/ml) and HDL-containing fraction ($d > 1.063$ g/ml) were recovered by tube slicing in a volume of about 1 ml and were transferred into counting vials. A volume of 2 ml of scintillation fluid was added to each vial and the radioactivity was assayed for 5 min. Results were expressed in percentage of total radioactivity transferred from radiolabeled HDL_3 to the $d < 1.063$ g/ml plasma fraction.

Statistical Analysis

Comparisons were computed using one-way analysis of variance. Correlations were analyzed by linear regression analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Separation of Plasma Lipoprotein Fractions by Gradient Gel Electrophoresis

After incubation, plasma lipoprotein fractions prestained for lipids were separated by native polyacrylamide gradient gel electrophoresis according to the general procedure described under Materials and Methods. As shown in Fig. 1, the three main lipoprotein fractions of normolipidemic plasma, VLDL, LDL, and HDL, were well separated by the electrophoresis procedure. Gel bands corresponding to each samples were cut off into five distinct portions: top gel + VLDL, LDL, intermediate, HDL, and bottom gel bands. Treatments previously proposed to dissolve polyacrylamide gels (9–12) were inoperative in dissolving the bis-acrylamide gels used in the present study. Consequently, we used another method which consisted in the dissolution of gel fragments with NaOCl. The quantity of NaOCl required to dissolve completely the gel fragments increased lineary with the dried mass of polyacrylamide (Fig. 2). Under our experimental conditions, the polyacrylamide content of individual gel fragments never exceeded 90 mg. Consequently, all the gel portions were dissolved by the addition of a 6-ml volume of a 2.5 mol/liter NaOCl solution.

Radioactive Counting of Gel Fragments

It has been previously observed that elution treatments of polyacrylamide gel fragments may lead to an incomplete recovery of radioactivity due to chemiluminescence problems (11). In order to determine whether NaOCl interfered in the scintillation radioactive counting procedure, aliquots of a radiolabeled cholesterol solution were added into counting vials containing 6 ml of NaOCl solutions of concentration ranging from 0 to 1.7 mol/liter. Each vial received a 12-ml volume of scintillation fluid and radioactivity was immediately counted for 5 min. As shown in Fig. 3, NaOCl induced a progressive

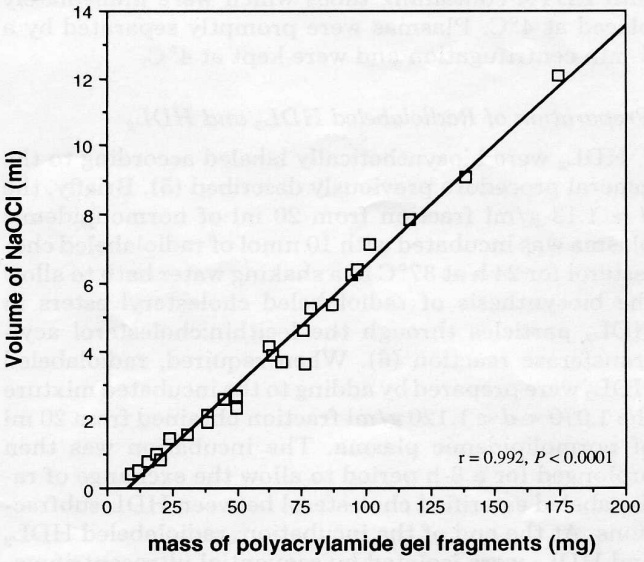


FIG. 2. Determination of the amount of NaOCl required to dissolve dehydrated polyacrylamide gel fragments of various masses. Polyacrylamide gradient gel fragments were kept overnight at 60°C until complete dehydration. Thereafter, 50-μl volumes of a 2.5 mol/liter NaOCl solution were added progressively until complete dissolution of polyacrylamide fragments.

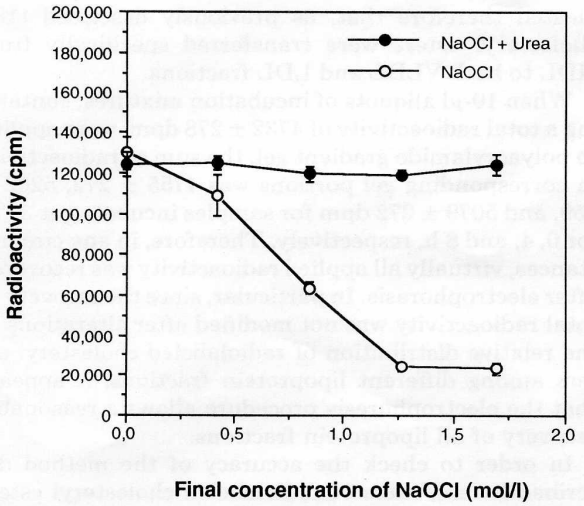


FIG. 3. Effect of NaOCl and urea on the radioactivity counting. Constant amount of radiolabeled cholesterol were mixed with a 6-ml volume of a NaOCl solution ranging from 0 to 1.7 mol/liter. Each vial received either a 0.5-ml volume of PBS (opened circles) or a 0.5-ml volume of a 8 mol/liter urea solution (closed circles). After addition of a 12-ml volume of scintillation fluid to each vial, total radioactivity was counted for 5 min. Results represent mean ± SD of three determinations.

decrease in the radioactivity counting. The decrease in total radioactive counts was dependent on the concentration of the NaOCl solution. Consequently, it was necessary to neutralize the excess of NaOCl. As shown in Fig. 3, this was realized by adding an excess of urea (0.5 mol/liter) to the counting vials before the addition of scintillation fluid. While urea alone at a concentration of 0.5 mol/liter did not alter the radioactive counting (results not shown), it was able to suppress completely the NaOCl-induced decrease in radioactive counts. In the subsequent experiments, polyacrylamide gel fragments were dissolved in a 6-ml volume of NaOCl. Following dissolution, the excess of NaOCl which did not react with amide groups of polyacrylamide gel was neutralized by the addition of 400 μl of an 8 mol/liter aqueous solution of urea. Under these conditions, the average recovery of radioactivity, determined by comparing the activity of NaOCl-treated gel fragments to their known total activity content, was constantly greater than 95%.

Transfer of Radiolabeled Cholesteryl Esters from HDL to VLDL and LDL Plasma Fractions

As an example, the present electrophoretic method was applied to the measurement of the rates of radiolabeled cholesteryl ester transferred from HDL_3 toward VLDL and LDL plasma fractions.

An aliquot of 150 μl of total plasma was incubated for 0, 4, or 8 h at 37°C in the presence of radiolabeled HDL_3 (50 μmol/liter of cholesterol) and iodoacetate (1.5 mmol/liter) in a final volume of 200 μl. At the end of incubation, plasma lipoprotein fractions were separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis, gel portions were cut off as described in the legend to Fig. 1 and their radiolabeled cholesteryl ester contents were assayed as described above. In subsequent experiments, radioactivity contents of individual gel portions were expressed as percentage of total recovered radioactivity.

As shown in Table 1, when mixtures were kept at 4°C ($t = 0$), about 78.4% of total recovered radioactivity was localized in the HDL band. During the course of the incubation of plasma at 37°C, the relative proportion of total radioactivity in the HDL band decreased significantly while it increased significantly in the top gel + VLDL and LDL bands. By contrast, radioactivity content of intermediate and bottom gel bands did not vary significantly upon the incubation at 37°C. In nonincubated controls, 11.3% of total radioactivity was recovered in the top gel + VLDL fraction. This relatively high value probably represented the accumulation, at the deposit point, of substantial amounts of radiolabeled material bound to aggregated lipoproteins which did not enter the polyacrylamide gradient gel. Complementary experiments, conducted with incubation mixtures deprived of VLDL, indicated that the radioactivity con-

TABLE 1

Transfer of 3H-Cholesteryl Esters from HDL_3 to Other Plasma Lipoprotein Fractions

Electrophoretic fractions	Incubation time at 37°C		
	0 h	4 h	8 h
Top gel + VLDL	11.3 ± 1.9	20.6 ± 4.0[a] (+9.3)	25.0 ± 7.1[b] (+13.7)
LDL	6.1 ± 0.6	19.2 ± 5.3[c] (+13.1)	33.1 ± 6.2[d] (+27.0)
Intermediate	2.6 ± 0.4	1.6 ± 0.5	1.35 ± 0.4
HDL	78.4 ± 2.7	57.0 ± 9.5[c] (−21.4)	39.2 ± 9.9[d] (−39.2)
Bottom gel	1.7 ± 0.4	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.5

Note. All the incubation mixtures contained normolipidemic plasma (150 μl) and radiolabeled HDL_3 (10 nmol of cholesterol) in a 200-μl total volume. Samples were either kept at 4°C ($t = 0$) or incubated for 4 or 8 h at 37°C ($t = 4$ and $t = 8$). After incubation, samples were subjected to gradient gel electrophoresis and gel fragments were cut off and treated as described under Materials and Methods. Values represent mean ± SD of six determinations. Numbers in parentheses indicate the percentage difference from the corresponding fragments of control mixtures kept at 4°C.

[a] 4 vs 0 h, $P < 0.01$.
[b] 8 vs 4 h, $P < 0.01$.
[c] 4 vs 0 h, $P < 0.001$.
[d] 8 vs 4 h, $P < 0.001$.

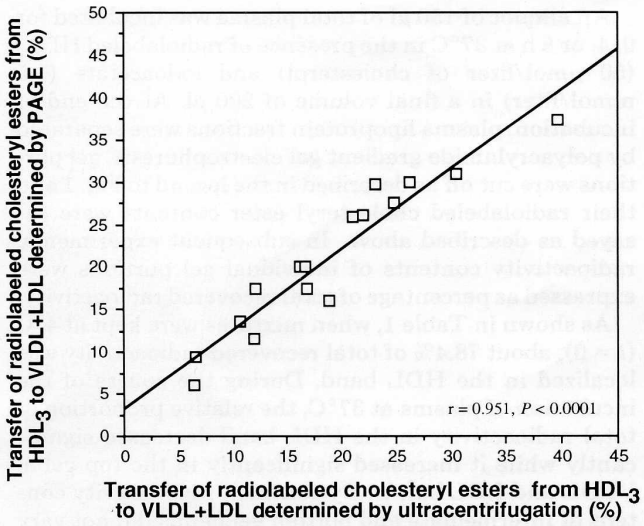


FIG. 4. Correlation between transfers of radiolabeled cholesteryl esters from HDL_3 to VLDL + LDL as measured by using ultracentrifugation or polyacrylamide gradient gel electrophoresis fractionation procedures. Sixteen plasmas were incubated for 4 h at 37°C in the presence of radiolabeled HDL_3 (10 nmol of cholesterol) and iodoacetate (1.5 mmol/liter) in a final volume of 200 μl. At the end of the incubation, VLDL + LDL and HDL fractions were separated either by a single ultracentrifugation spin at density 1.063 g/ml (horizontal axis) or by electrophoresis in 20–160 g/liter polyacrylamide gradient gels (vertical axis) (see Materials and Methods). In both cases, results were calculated compared with a control mixture kept at 4°C and were expressed as percentage of total radioactivity transferred from HDL toward the VLDL + LDL plasma fraction.

tent of top gel + VLDL fraction did not vary significantly upon the incubation at 37°C (results not shown). When lipoproteins were prestained with only 0.5 instead of 1 vol of the 5 g/liter Sudan black B solution, the radioactivity content of the top gel + VLDL fraction of 4°C control samples was reduced down to less than 7% of total radioactivity. However, under these conditions, localization of poorly stained lipoprotein fractions became hazardous (results not shown). When cholesteryl ester transfer rates were calculated by difference with control mixtures kept at 4°C, 9.3 and 13.1% of radiolabeled cholesteryl esters content of HDL were transferred to VLDL- and LDL-containing fractions after a 4-h incubation at 37°C, respectively. After an 8-h incubation at 37°C, transfer rates toward VLDL and LDL raised to 13.7 and 27.0%, respectively. The difference between transfers to VLDL and LDL was statistically significant ($P < 0.05$). These data indicated therefore that the relative proportions of radiolabeled cholesteryl esters transferred can differ from one plasma lipoprotein fraction to the other. Radioactivity content of lipoprotein-free gel portions, the intermediate and bottom gel bands, remained very low (less than 3% of total) upon incubation of mixtures at 37°C. These results indicated therefore that, as previously described (13), cholesteryl esters were transferred specifically from HDL to both VLDL and LDL fractions.

When 10-μl aliquots of incubation mixtures, containing a total radioactivity of 4732 ± 278 dpm, were applied to polyacrylamide gradient gel, the sum of radioactivity in corresponding gel portions was 4755 ± 272, 5202 ± 259, and 5079 ± 272 dpm for samples incubated at 37°C for 0, 4, and 8 h, respectively. Therefore, in any circumstances, virtually all applied radioactivity was recovered after electrophoresis. In particular, since the recovery of total radioactivity was not modified after alterations in the relative distribution of radiolabeled cholesteryl esters among different lipoprotein fractions, it appears that the electrophoresis procedure allows a reasonable recovery of all lipoprotein fractions.

In order to check the accuracy of the method described herein, rates of radiolabeled cholesteryl esters transferred from HDL to the VLDL + LDL fractions during a 4-h incubation at 37°C were determined in 16 plasmas after separation of HDL and VLDL + LDL fractions either by gradient gel electrophoresis or by ultracentrifugation. The electrophoresis measurements

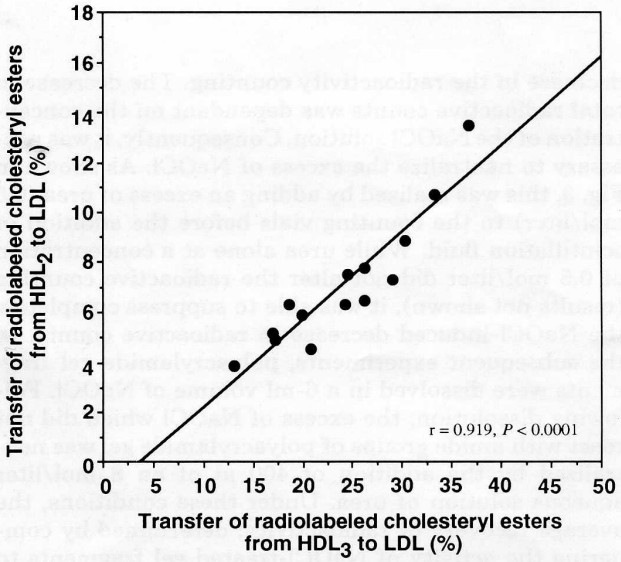


FIG. 5. Correlation between cholesteryl ester transfer rates as measured either from radiolabeled HDL_3 or from radiolabeled HDL_2 to the VLDL + LDL plasma fraction. Fourteen plasmas were incubated for 4 h at 37°C in the presence of iodoacetate (1.5 mmol/liter) and a tracer dose (10 nmol of cholesterol) of either radiolabeled HDL_3 (horizontal axis) or radiolabeled HDL_2 (vertical axis) in a final volume of 200 μl. At the end of the incubation, plasma lipoproteins were separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis (see Materials and Methods). Cholesteryl ester transfer rates were calculated compared with a control mixture kept at 4°C and were expressed as percentage of total radioactivity transferred from HDL toward the VLDL + LDL plasma fraction.

were conducted as previously described except that top gel + VLDL and LDL fractions were pooled together. Similarly, VLDL + LDL and HDL plasma fractions were separated by ultracentrifugation of the incubation mixtures at density 1.063 g/ml as described under Materials and Methods. Cholesteryl ester transfer rates as measured by using either electrophoresis or ultracentrifugation did not vary significantly (21.2 ± 8.8 and 19.0 ± 8.8%, respectively) and linear regression analysis revealed the existence of a good correspondence between the two independent methods ($r = 0.95$, $P < 0.0001$) (Fig. 4).

Comparative Transfer of Radiolabeled Cholesteryl Esters from Either HDL_2 Or HDL_3 to the VLDL + LDL Plasma Fraction

In order to determine the effect of variation in the structure and composition of radiolabeled lipoprotein tracer on cholesteryl ester transfer rates, CETP activity was measured in 14 normolipidemic plasmas in the presence of either radiolabeled HDL_3 or radiolabeled HDL_2. Cholesteryl ester transfer rates were significantly higher when measured with HDL_3 than with HDL_2 (24.0 ± 6.8 and 7.1 ± 2.6%, respectively; $P < 0.001$). This observation confirmed that alterations of the lipid (14–18) and apolipoprotein (19–22) composition of lipoprotein substrates can influence the cholesteryl ester transfer reaction. However, linear regression analysis revealed the existence of a significant correlation between the rates of radiolabeled cholesteryl esters transferred from HDL_2 and HDL_3 to the VLDL + LDL plasma fraction ($r = 0.919$, $P < 0.0001$) (Fig. 5). It follows, therefore, that one given HDL tracer can constitute an appropriate tool to evaluate relative CETP activity in various plasma samples.

In conclusion, liquid scintillation counting of polyacrylamide gradient gel fragments provided a convenient method for determining the relative rates of cholesteryl esters transferred between several lipoprotein classes, as it actually occurs in total plasma. This method might also constitute a valuable tool to study the exchange of other lipoprotein components between lipoprotein substrates of different sizes.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by the Université de Bourgogne, the Conseil Régional de Bourgogne, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

REFERENCES

1. Hesler, C. B., Tall, A. R., Swenson, T. L., Weech, P. K., Marcel, Y. L., and Milne, R. W. (1988). *J. Biol. Chem.* **263,** 5020–5023.
2. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., and Dawber, T. R. (1977) *JAMA* **238,** 497–499.
3. Miller, G. J., and Miller, N. E. (1975) *Lancet* **i,** 16–19.
4. Quig, D. W., and Zilversmit, D. B. (1990) *Annu. Rev. Nutr.* **10,** 169–193.
5. Tollefson, J. H., Liu, A., and Albers, J. J. (1988) *Am. J. Physiol.* **255,** E894–E902.
6. Lagrost, L., and Barter, P. J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1085,** 209–216.
7. Gambert, P., Bouzerand-Gambert, C., Athias, A., Farnier, M., and Lallemant, C. (1990) *J. Lipid Res.* **31,** 1199–1210.
8. Wallis, E. S., and Lane, J. F. (1948) *in* Organic Reactions (Adams, R., Ed), Vol. III, pp. 267–306, Wiley, New York.
9. Paus, P. N. (1971) *Anal. Biochem.* **42,** 372–376.
10. Späth, P. J., and Koblet, H. (1979) *Anal. Biochem.* **93,** 273–285.
11. Moore, P. A. (1980) *Anal. Biochem.* **108,** 151–155.
12. Gambert, P., Lallemant, C., Athias, A., and Padieu, P. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **713,** 1–9.
13. Tall, A. R. (1986) *J. Lipid Res.* **27,** 361–366.
14. Morton, R. E., and Zilversmit, D. B. (1983) *J. Biol. Chem.* **258,** 11751–11757.
15. Eisenberg, S. (1985) *J. Lipid Res.* **26,** 487–494.
16. Sparks, D. L., and Pritchard, P. H. (1989) *J. Lipid Res.* **30,** 1491–1498.
17. Fielding, C. J., Reaven, G. M., Liu, G., and Fielding, P. E. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81,** 2512–2516.
18. Morton, R. E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263,** 12235–12241.
19. Son, Y.-C., and Zilversmit, D. B. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **795,** 473–480.
20. Nishida, H. I., Kato, H., and Nishida, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265,** 4876–4883.
21. Milner, T. G., Ko, K. W. S., Ohnishi, T., and Yokoyama, S. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1082,** 71–78.
22. Kinoshita, M., Arai, H., Fukasawa, M., Watanabe, T., Tsukamoto, K., Hashimoto, Y., Inoue, K., Kurokawa, K., and Teramoto, T. (1993) *J. Lipid Res.* **34,** 261–268.

ANNEXE 5

Modulation of the activity of the human cholesteryl ester transfer protein by carboxylated derivatives. Evidence for 13-*cis* retinoic acid as a potent regulator of the protein's activity in plasma.

FLORENTIN, E., ATHIAS, A. & LAGROST, L.

Eur. J. Biochem. **240**, 699-706 (1996)

Eur. J. Biochem. *240*, 699−706 (1996)
© FEBS 1996

Modulation of the activity of the human cholesteryl ester transfer protein by carboxylated derivatives

Evidence for 13-*cis*-retinoic acid as a potent activator of the protein's activity in plasma

Emmanuel FLORENTIN, Anne ATHIAS and Laurent LAGROST

Laboratoire de Biochimie des Lipoprotéines, INSERM CJF 93-10, Faculté de Médecine, Dijon, France

(Received 18 June 1996) − EJB 96 0899/5

The influence of palmitic acid, 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, and all-*trans*-retinol on the activity of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) was evaluated either in total human plasma supplemented with a tracer dose of ^{3}H-labeled cholesteryl-ester-containing high-density lipoprotein subfraction 3 ([^{3}H]CE-HDL$_3$), or in reconstituted mixtures containing [^{3}H]CE-HDL$_3$, isolated low-density lipoproteins (LDL), and purified CETP. In reconstituted mixtures, all the carboxylated derivatives increased progressively and significantly the transfer of ^{3}H-labeled cholesteryl esters from [^{3}H]CE-HDL$_3$ towards LDL in the 20−100 μM concentration range. Under identical experimental conditions, CETP activity was only minimally modified in the presence of all-*trans*-retinol. When present at a concentration of 60, 80, or 100 μM, 13-*cis*-retinoic acid was a significantly more potent activator of CETP activity than all the other derivatives studied ($P < 0.01$ in all cases). In contrast to observations made with reconstituted mixtures, only 13-*cis*-retinoic acid, but not palmitic acid, was able to induce a significant, concentration-dependent stimulation of CETP activity in total human plasma. In fact, differences in the ability of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid to modulate the plasma cholesteryl ester transfer reaction were linked to their relative affinity for albumin and lipoprotein substrates: fatty-acid-poor albumin reduced CETP activity to a significantly greater extent in reconstituted mixtures containing palmitic acid than in reconstituted mixtures containing 13-*cis*-retinoic acid ($P < 0.01$ for all the incubation mixtures in the 1−10 g/l albumin concentration range); palmitic acid presented a markedly lower ability to increase the electrophoretic mobility of LDL and HDL fractions in total plasma than 13-*cis*-retinoic acid. In support of a key role of the negatively charged carboxylic group of 13-*cis*-retinoic acid in upregulating CETP activity, cholesteryl ester transfer rates correlated positively with the electrophoretic mobility of LDL ($r = 0.98$; $P < 0.0002$) and HDL ($r = 0.96$; $P < 0.0008$) in total plasma supplemented with the carboxylated compound. It is concluded that 13-*cis*-retinoic acid can upregulate the CETP-mediated cholesteryl ester transfer reaction both in reconstituted mixtures containing isolated lipoproteins and purified CETP, and in total normolipidemic human plasma.

Keywords: cholesteryl ester transfer protein; lipoproteins; electrostatic charge; 13-*cis*-retinoic acid; non-esterified fatty acids.

The cholesteryl ester transfer protein (CETP) is responsible for all cholesteryl ester and triacylglycerol transfer activities in human plasma, and for only a part of phospholipid transfer activity [1]. During the last decade, many studies have dealt with one particular point of CETP activity with a high physiopathological relevance, i.e. the ability of CETP to redistribute neutral lipid species, in particular cholesteryl esters, between pro- and anti-atherogenic plasma lipoprotein fractions. CETP arose from previous studies as a potentially important factor in determining the atherogenicity of the plasma lipoprotein profile, a statement which raised a considerable interest in identifying the factors which may regulate CETP activity [2−4]. Not only CETP mass concentration, but also many additional factors may affect plasma neutral lipid transfer activity, among them the lipoprotein substrate concentration, and the unesterified cholesterol, phospholipid, neutral lipid, non-esterified fatty acid (NEFA), and apolipoprotein content of lipoproteins (see [4] for a review). In particular, earlier studies [5−7] demonstrated that the accumulation at the lipoprotein surface of charged, amphipathic lipolytic products, such as NEFA, was associated with increased CETP-mediated cholesteryl ester transfer. Since the activating effect of NEFA was abolished by lowering the pH from 7.5 to 6.0, the involvement of ionized carboxylic groups of NEFA in the lipid transfer process was suspected [7, 8]. In support of that latter view, earlier studies of Pattnaik and Zilversmit [5] demonstrated that the neutral lipid transfer process is driven by the interaction of CETP with negative charges at the lipoprotein surface.

Based on the concept of a direct interaction of CETP with ionized carboxylic groups, not only NEFA, but other structurally related compounds might act as putative modulators of the neutral lipid transfer process. In the present study, we investigated the ability of 13-*cis*-retinoic acid, a synthetic retinoid which is

Correspondence to L. Lagrost, Laboratoire Central de Biochimie Médicale Hôpital du Bocage, B. P. 1542, F-21034 Dijon Cedex, France
Fax: +33 80 29 36 61.

Abbreviations. CETP, cholesteryl ester transfer protein; HDL, high-density lipoproteins; HDL$_3$, high-density lipoprotein subfraction 3; [^{3}H]CE-HDL$_3$, complex of [1α,2α-^{3}H]cholesteryl ester and HDL$_3$; HSA, human serum albumin; LDL, low-density lipoproteins; NEFA, non-esterified fatty acids; VLDL, very low-density lipopoproteins.

used in the treatment of severe acne and other forms of dermatosis [9−11], to modulate *in vitro* the CETP-mediated neutral lipid transfer reaction. Indeed, 13-*cis*-retinoic acid presents the main structural features of long-chain fatty acids which are known to constitute potent activators of CETP activity [4]. In addition, the hyperlipidemic state induced by treatment of humans with 13-*cis*-retinoic acid [12−19] is associated with increase in the plasma very-low + low-density lipoprotein/high-density lipoprotein (VLDL+LDL/HDL) cholesterol ratio, one characteristic which may reflect a specific increase in plasma CETP activity as previously demonstrated under a number of pathophysiological conditions [20−26].

In fact, several adverse effects of 13-*cis*-retinoic acid therapy have been reported in the litterature, the most striking of them being teratogenicity [27, 28], and hyperlipidemia [12]. In the present study, the ability of palmitic acid, one of the most potent activators of CETP activity among NEFA [29], and 13-*cis*-retinoic acid in modulating the cholesteryl ester transfer reaction were compared in both reconstituted experimental mixtures and total human plasma. It was discovered that 13-*cis*-retinoic acid can alter markedly the plasma neutral lipid transfer process by modifying the charge properties of the plasma lipoprotein substrates.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. [1α,2α(n)-[^{3}H])Cholesterol (n = nominal; specific activity, 46 Ci/mmol) was purchased from Amersham. Scintillation fluid (OptiPhase HiSafe 3) was obtained from LKB Scintillation Products. 13-*cis*-Retinoic acid (or isotretinoin), all-*trans*-retinoic acid, palmitic acid, retinol, essentially fatty-acid-free human serum albumin (HSA) were purchased from Sigma. Arotinoid ethylsulfonic acid (Ro 15-1570) was a generous gift from Dr M. Klaus (F. Hoffmann La Roche Ltd, Basel).

All solvents, i.e. acetic acid (RP Normapur Prolabo, Rhône-Poulenc, Paris), *n*-hexane, ethanol, propan-2-ol (SDS, Peypin, France) were of analytical reagent grade.

Blood samples. Venous blood from healthy normolipidemic subjects was collected after an overnight fast into tubes containing EDTA-Na_2 which were immediately placed at 4 °C. Plasma was promptly separated by a 15-min centrifugation (1500 *g*) at 4 °C.

Lipoprotein preparation. Lipoproteins were prepared by sequential ultracentrifugation [30] at a speed of 100000 rpm (356000 *g*) in a TLA-100.2 rotor in a Beckman TL-100 ultracentrifuge. Densities were adjusted by the addition of solid KBr. LDL were isolated as the plasma fraction of density ranging between 1.019−1.063 g/ml with 4-h and 5-h spins, respectively. HDL were isolated as the plasma fraction of density ranging between 1.063−1.210 g/ml with 5-h and 7-h spins, respectively. The isolated lipoproteins were dialyzed overnight against NaCl/P_i (150 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4, 5 mM NaH_2PO_4, 5 mM EDTA-Na_2, 3 mM NaN_3, pH 7.4).

Preparation of ^{3}H-labeled HDL_3. HDL_3 were biosynthetically labeled according to the general procedure previously described [31, 32]. Briefly, the > 1.13-g/ml density fraction from 20 ml normolipidemic plasma was incubated with 10 nmol ^{3}H-[^{3}H]cholesterol for 24 h at 37 °C in a shaking water bath to allow the biosynthesis of ^{3}H-labeled cholesteryl esters in HDL_3 particles through the lecithin:cholesterol acyltransferase reaction [29]. At the end of the incubation, ^{3}H-labeled HDL_3 were isolated by sequential ultracentrifugation which was conducted at a speed of 100000 rpm (356000 *g*) in a TLA-100.2 rotor of a Beckman TL-100 ultracentrifuge. HDL_3 were isolated as the 1.13−1.21-g/ml fraction with one single 7-h spin at the lower density and two 10-h spins at the higher density. The resulting lipoprotein fraction was dialysed overnight at 4 °C against NaCl/P_i.

Purification of the cholesteryl ester transfer protein. CETP was purified from 2500 ml citrated, normolipidemic human plasma by using a combination of the procedures previously described by our group [32, 33]. Briefly, the plasma protein fraction precipitated with ammonium sulfate between 35−55% saturation was subjected to ultracentrifugation at a density of 1.25 g/ml. The resulting > 1.25-g/ml fraction was then subjected successively to hydrophobic interaction chromatography on a phenyl-Sepharose CL-4B column (Pharmacia), to cation-exchange chromatography on a carboxymethyl-cellulose column (Whatman), to affinity chromatography on a heparin-Ultrogel A4R column, and to anion-exchange chromatography on a Mono Q HR 5/5 column (Pharmacia). Chromatographic separations were performed on an FPLC system (Pharmacia) at 4 °C, with the exception of anion-exchange chromatography which was conducted at room temperature. A linear gradient of 0−0.5 M NaCl was used to elute the cholesteryl ester transfer activity from the Mono Q column. The active fractions, eluted with 20 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.4, were pooled, aliquoted, and stored at −80 °C.

Cholesteryl ester transfer assay. Cholesteryl ester transfer activity was evaluated by measuring the transfer of [^{3}H]cholesteryl esters from HDL_3 donors ([^{3}H]CE-HDL_3) to unlabeled apoB-containing lipoprotein acceptors [31, 32]. Cholesteryl ester transfers were assayed either in 50-µl reconstituted mixtures containing [^{3}H]CE-HDL_3 (2.5 nmol or 6.25 nmol cholesterol), LDL (10 nmol or 6.25 nmol cholesterol), and purified CETP (4.5 µg), or in 50-µl mixtures containing total human serum (18 µl) and [^{3}H]CE-HDL_3 (2.5 nmol cholesterol). Incubation mixtures were prepared in NaCl/P_i. Plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity was blocked by adding iodoacetic acid (final concentration, 1.5 mM). The tubes were capped and incubated for 3 h at 37 °C. At the end of the incubation, the tubes were immediately centrifuged for 1 min in an Eppendorf centrifuge to recover condensed water. A volume of 45 µl of the incubation mixture was added to 2 ml of a 1.07-g/ml KBr solution in Quickseal Beckman ultracentrifugation tubes. The tubes were then subjected to ultracentrifugation for 16 h at 40000 rpm (172000 *g*) in a 50.4 rotor in a L7-65 Beckman ultracentrifuge. The < 1.068 g/ml and > 1.068-g/ml fractions were subsequently recovered in a volume of about 1 ml after tube slicing and transferred into plastic counting vials; 2 ml scintillation fluid was added to each vial and the radioactivity was assayed for 5 min in a Pharmacia Wallac 1410 liquid scintillation counter.

Preparation of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid solutions. Because of the light sensitivity of 13-*cis*-retinoic acid [34], all the experiments were performed in subdued light, and 13-*cis*-retinoic acid was stored at −20 °C in sealed vials, in the darkness, and under nitrogen. 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid were prepared as ethanolic solutions and were added to 50-µl-incubation mixtures in a 1-µl volume.

Assay of 13-*cis*-retinoic acid. All sample manipulations were performed in subdued light to avoid photoisomerization of retinoic acids. 13-*cis*-Retinoic acid was extracted from incubation mixtures as described by Meyer et al. [35]. Briefly, 1 ml of an ethanolic solution of arotinoid ethyl sulfonic acid (Ro 15-1570; 400 ng/ml), used as an internal standard, was added to 500-µl samples. After addition of 5 ml distilled water and 7.5 ml *n*-hexane, the solution was acidified with 0.3 ml a 2 M HCl. The mixture was then rotated end-over-end for 10 min and centrifugated for 10 min at 2500 *g*. The resulting upper organic layer was then transferred into glass tubes, and the solvent was evaporated off under a nitrogen stream. Subsequently, 200 µl *n*-

hexane/propan-2-ol/acetic acid (200:1:0.135) was added to the tube.

Extracted 13-*cis*-retinoic acid was assayed under isocratic conditions on a Gold HPLC system (Beckman) by using the general method of Meyer et al. [35]. The analytical column was a Spherisorb silica adsorption column (250×4.6 mm, 5 µm particle size) (Brownlee, Touzart & Matignon, Vitry-sur-Seine, France). The mobile phase was an *n*-hexane/propan-2-ol/acetic acid (200:1:0.135). The flow rate was 1.5 ml/min. Samples maintained at 4 °C and in subdued light were injected manually. The effluents was monitored by using a diode array detector module 168 simultaneously on channel A at a wavelength of 350 nm for 6 min and thereafter at 325 nm, and on channel B at a wavelength of 300 nm with range setting 0.02 *A* full scale. Spectra were automatically stored and integrated using the System Gold software (Beckman).

Electrophoretic mobility of lipoprotein particles. Incubated mixtures were analysed on a preformed 0.5% agarose gel (Paragon Lipo kit, Beckman) by using the general procedure previously described [36]. Briefly, 20 µl of incubation mixtures were applied to the gel and were allowed to penetrate into the gel for 30 min before electrophoresis. Electrophoresis was performed for 45 min at 100 V in sodium barbital pH 8.6, by using an electrophoresis constant power supply (ECPS 3000/150, Pharmacia). At the end of the electrophoresis, the gels were fixed in ethanol/acetic acid/distilled water (90:15:45) for 5 min, before being dried for 1 h at 80 °C. Gels were then stained for 5 min with an ethanolic solution of Paragon lipo stain (Sudan black B 0.07%) and destained with a 45% ethanolic solution. Lipoprotein profiles were obtained on a GS-670 imaging densitometer by using the Molecular Analyst software (Bio-Rad).

Other lipid analyses. Total cholesterol and triacylglycerols were measured on a Cobas-Fara Centrifugal Analyzer (Roche) by using Boehringer Mannheim reagents.

Statistical analysis. Comparisons of data means were performed by using two-way analysis of variance followed by Dunnett or Newman-Keuls tests [37]. Coefficients of correlation (*r*) were calculated by using linear regression analysis.

RESULTS

Comparative effects of 13-*cis*-retinoic acid, all-trans retinoic acid, retinol, and palmitic acid on the transfer of [^{3}H]cholesteryl esters between isolated HDL_3 and LDL particles. [^{3}H]CE-HDL_3, LDL, and purified CETP were incubated for 3 h at 37 °C in the presence of either 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, retinol or palmitic acid at final concentrations ranging over 0−100 µM. As shown in Fig. 1, all the carboxylated derivatives induced a concentration-dependent stimulation of the CETP-mediated transfer of [^{3}H]cholesteryl esters from [^{3}H]CE-HDL_3 to LDL. In contrast to carboxylated compounds, retinol did not affect markedly the neutral lipid transfer reaction, with only a slight but significant ($P < 0.01$) increase with the highest concentration studied (100 µM; Fig. 1). When present at a concentration of 60, 80, or 100 µM, 13-*cis*-retinoic acid appeared clearly as a significantly more potent activator of CETP activity than all the other derivatives studied ($P < 0.01$ in all cases). With all the 13-*cis*-retinoic acid concentrations studied, at least 95% of it was recovered in the lipoprotein fractions isolated by ultracentrifugation, as judged by HPLC. As calculated by pooling data obtained with various concentrations, the LDL, HDL, and >1.210-g/ml fractions contained 35.7 ± 2.1%, 61.3 ± 2.0%, and 3.0 ± 1.0% of recovered 13-*cis*-retinoic acid.

In order to determine the effect of alterations in the LDL/[^{3}H]CE-HDL_3 ratio on the ability of 13-*cis*-retinoic acid to modulate CETP activity, lipoprotein substrates were added to incubation mixtures at concentrations leading to an LDL/HDL_3 cholesterol molar ratio of 1 or 4. As shown in Fig. 2, the rate of [^{3}H]cholesteryl esters transferred from HDL_3 to LDL was markedly increased as the LDL/HDL_3 cholesterol molar ratio

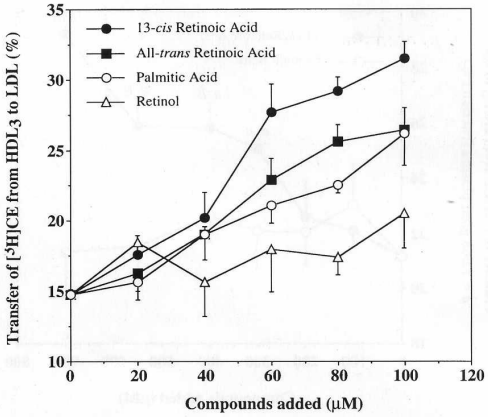


Fig. 1. Effect of 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, palmitic acid, and retinol on the transfer of cholesteryl esters from [^{3}H]CE-HDL_3 towards LDL. Each incubation mixture contained [^{3}H]CE-HDL_3 (2.5 nmol cholesterol), LDL (10 nmol cholesterol), purified CETP (4.5 µg), and either 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, palmitic acid, or retinol at final concentrations ranging over 0−100 µM in a final volume of 50 µl. Samples were incubated for 3 h at 37 °C and then subjected to ultracentrifugation to a density of 1.068 g/ml. The rate of transfer was expressed as the percentage of total radioactivity recovered in the <1.068-g/ml fraction. Each point represents mean ± SD of three determinations.

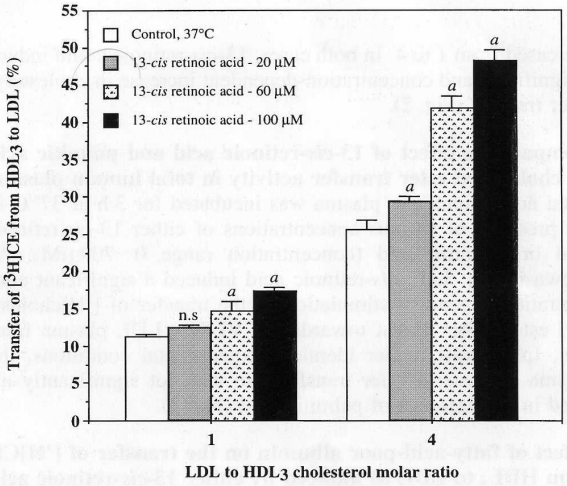


Fig. 2. Effect of variations in the LDL/[^{3}H]CE-HDL_3 ratio on the modulation of CETP activity mediated by 13-*cis*-retinoic acid. Incubation mixtures contained purified CETP (4.5 µg), [^{3}H]CE-HDL_3, LDL, and 13-*cis*-retinoic acid (final concentrations ranging over 20−100 µM) in a final volume of 50 µl. The LDL/[^{3}H]CE-HDL_3 cholesterol molar ratio was 1 (LDL cholesterol 6.25 nmol, HDL_3 cholesterol 6.25 nmol) or 4 (LDL cholesterol 10.0 nmol, HDL_3 cholesterol 2.5 nmol). Samples were incubated for 3 h at 37 °C and then subjected to ultracentrifugation to a density of 1.068 g/ml. The rate of transfer was expressed as the percentage of total radioactivity recovered in the <1.068-g/ml fraction. Each point represents mean ± SD of three determinations; n.s., not significant; a, significantly different from control ($P < 0.01$).

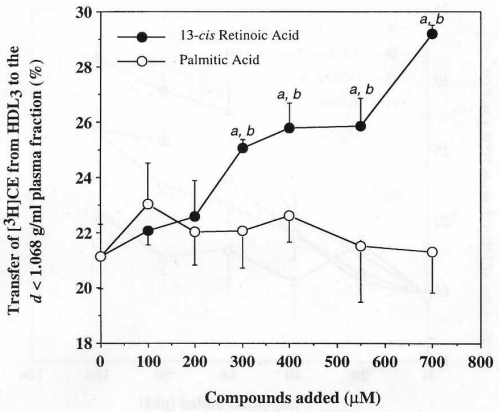


Fig. 3. Effects of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid on the transfer of cholesteryl esters from [^{3}H]CE-HDL$_3$ towards the <1.068 g/ml plasma fraction. Each incubation mixture contained [^{3}H]CE-HDL$_3$ (2.5 nmol cholesterol), 18 μl human normolipidemic plasma (cholesterol 2.30 g/l, triacylglycerols 1.2 g/l), iodoacetate (final concentration 1.5 mM), and either 13-*cis*-retinoic acid or palmitic acid (final concentrations, 0−700 μM) in a final volume of 50 μl. Samples were incubated for 3 h at 37°C and then subjected to ultracentrifugation to a density of 1.068 g/ml. The rate of transfer was expressed as the percentage of total radioactivity recovered in the <1.068-g/ml plasma fraction. Each point represents mean ± SD of three determinations, a, significantly different from non-supplemented control ($P < 0.01$); b, significantly different from homologous mixtures containing palmitic acid ($P < 0.005$).

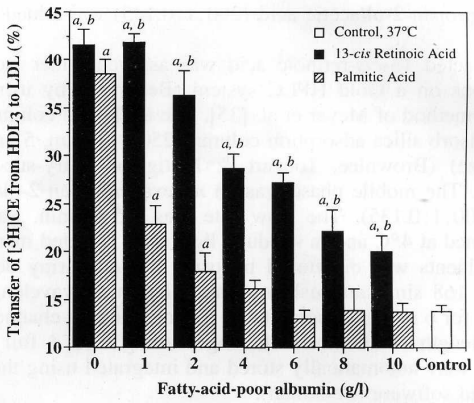


Fig. 4. Effect of fatty-acid-poor albumin on the ability of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid to enhance the CETP-mediated transfer of cholesteryl esters from [^{3}H]CE-HDL$_3$ towards LDL. Mixtures containing [^{3}H]CE-HDL$_3$ (2.5 nmol cholesterol), LDL (10 nmol cholesterol), purified CETP (4.5 μg), and either 13-*cis*-retinoic acid or palmitic acid (final concentration, 100 μM) were incubated for 3 h at 37°C in the presence of various concentrations of fatty-acid-poor human serum albumin (concentration range 0−10 g/l) in a final volume of 50 μl. At the end of the incubation period, samples were subjected to ultracentrifugation to a density of 1.068 g/ml. The rate of transfer was expressed as the percentage of total radioactivity recovered in the <1.068-g/ml fraction. Each point represents mean ± SD of four determinations. a, significantly different from incubated control containing only lipoproteins and CETP ($P < 0.01$); b, significantly different from homologous mixture supplemented with palmitic acid ($P < 0.005$).

increased from 1 to 4. In both cases, 13-*cis*-retinoic could induce a significant and concentration-dependent increase in cholesteryl ester transfer (Fig. 2).

Comparative effect of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid on cholesteryl ester transfer activity in total human plasma. Total normolipidemic plasma was incubated for 3 h at 37°C in the presence of various concentrations of either 13-*cis*-retinoic acid or palmitic acid (concentration range 0−700 μM). As shown in Fig. 3, 13-*cis*-retinoic acid induced a significant concentration-dependent stimulation of the transfer of [^{3}H]cholesteryl esters from HDL$_3$ towards the VLDL+LDL plasma fraction. In contrast, under identical experimental conditions, the plasma cholesteryl ester transfer rate was not significantly altered in the presence of palmitic acid (Fig. 3).

Effect of fatty-acid-poor albumin on the transfer of [^{3}H]CE from HDL$_3$ to LDL as induced by either 13-*cis*-retinoic acid or palmitic acid. In order to determine whether albumin could account, at least in part, for differences in the ability of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid to activate the cholesteryl ester transfer reaction in total human plasma, the transfer of cholesteryl esters from [^{3}H]CE-HDL$_3$ (cholesterol concentration, 50 μM) towards isolated LDL (cholesterol concentration, 200 μM) was measured in the presence of either 13-*cis*-retinoic acid or palmitic acid (final concentration, 100 μM), and in the presence of increasing concentrations of fatty-acid-poor albumin (HSA; concentration range 0−10 g/l). As shown in Fig. 4, in the absence of HSA, the cholesteryl ester transfer rate was significantly higher in the presence of 13-*cis*-retinoic acid (41.6 ± 1.6%), and palmitic acid (38.6 ± 1.5%) than in control mixture containing only CETP (13.9 ± 0.7%; $P < 0.01$ in both cases). Addition of HSA induced a concentration-dependent reduction in the ability of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid to upregulate cholesteryl ester transfer activity. When HSA was added to palmitic-acid-containing mixtures at a final concentration of 4 g/l, the cholesteryl ester transfer rate was brought back to a basic value not significantly different from that measured in control samples (16.1 ± 1.0 versus 13.9 ± 0.7%). Interestingly, HSA was much less efficient in reducing the ability of 13-*cis*-retinoic acid to upregulate CETP activity. Indeed, whereas HSA at a concentration of 2 g/l reduced significantly the cholesteryl ester transfer rate from 38.6 ± 1.5% to 17.9 ± 2.0% in a palmitic-acid-containing mixture, it did not reduce significantly the cholesteryl ester transfer rate in mixtures containing 13-*cis*-retinoic acid (41.6 ± 1.6% without HSA versus 36.3 ± 2.5% with 2 g/l of HSA). Furthermore, with the maximal HSA concentration studied (10 g/l), the stimulating effect of 13-*cis*-retinoic acid was not completely suppressed, and the cholesteryl ester transfer rate in mixtures containing it remained significantly higher than that measured in control mixtures (20.0 ± 1.4% versus 13.9 ± 0.7%, $P < 0.01$). Finally, all over the HSA concentration range studied, the cholesteryl ester transfer rate measured in mixtures containing 13-*cis*-retinoic acid was significantly higher than those measured in palmitic-acid-containing counterparts ($P < 0.005$ for all the incubation mixtures supplemented with HSA in the 1−10 g/l concentration range; Fig. 4).

Comparative effect of palmitic acid and 13-*cis*-retinoic acid on electrophoretic mobility of LDL and HDL$_3$. Complementary experiments were set up in order to determine whether palmitic acid and 13-*cis*-retinoic acid could influence the electronegativity of lipoprotein substrates under the various experimental conditions used in the present study. To this end, total human plasma was incubated for 3 h at 37°C in the presence of increasing concentrations of either palmitic acid or 13-*cis*-retinoic acid (concentration range 0−700 μM) and their effect on the electrophoretic mobility of plasma LDL and HDL fractions was determined on agarose gels (see Materials and Methods). As shown in Fig. 5A, the addition of 13-*cis*-retinoic acid to total normoli-

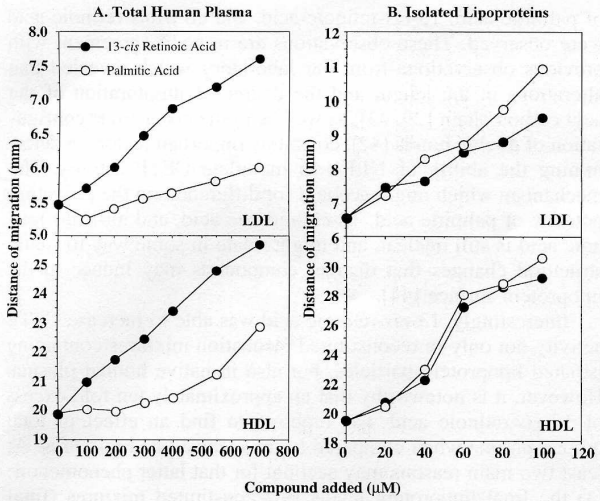


Fig. 5. Comparative effects of 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid on the electrophoretic mobility of LDL and HDL. Incubation mixtures contained either total normolipidemic human plasma (A) or isolated lipoproteins (LDL, 10 nmol cholesterol; HDL_3, 2.5 nmol cholesterol) and purified CETP (4.5 μg) (B), in a final volume of 50 μl (see Materials and Methods). Incubation mixtures containing total human plasma (A) were supplemented with increasing concentrations (0−700 μM) of either 13-*cis*-retinoic acid (●) or palmitic acid (○). Incubations mixtures containing isolated lipoproteins and purified CETP (B) were supplemented with increasing concentrations (0−100 μM) of either 13-*cis*-retinoic acid (●) or palmitic acid (○). At the end of a 3-h, incubation period at 37 °C, samples were subjected to electrophoresis on agarose gel and the distance of migration of LDL and HDL fractions was determined by image analysis as described under Materials and Methods.

pidemic plasma increased the electrophoretic migration of both plasma LDL and HDL with a concentration-dependent manner. In contrast to 13-*cis*-retinoic acid, the supplementation of total plasma with various concentrations of palmitic acid did not alter markedly the electrophoretic mobility of LDL and HDL, with the exception of the highest concentration studied (700 μM) which tended to raise the migration distance of plasma HDL (Fig. 5A).

When isolated LDL and HDL_3 fractions were incubated in the presence of increasing concentrations of either 13-*cis*-retinoic acid or palmitic acid (concentration range 0−100 μM), progressive shifts of LDL and HDL towards the anodic end of the gel were observed with either compound (Fig. 5B), indicating that both compounds can induce a progressive increase in the number of electronegative charges at the lipoprotein surface. Since the increase in the migration distance of isolated lipoproteins in the presence of palmitic acid was at least as high as that observed with 13-*cis*-retinoic acid (Fig. 5B), the markedly lower ability of palmitic acid to increase electrophoretic mobility of lipoprotein fractions in total plasma is likely to reflect differences in the plasma distribution of these two compounds rather than differences in the electrostatic charge of either compound.

As shown in Fig. 6A, significant positive correlations were observed between plasma CETP activity and the migration distance of both LDL ($r = 0.98$, $P = 0.0002$) and HDL ($r = 0.98$, $P = 0.0008$) in plasma containing 13-*cis*-retinoic acid, but not within plasma supplemented with palmitic acid. In contrast to observations made with total plasma incubations, both 13-*cis*-retinoic acid and palmitic acid induce a significant positive correlation between CETP activity and the migration distance of both LDL and HDL in reconstituted mixtures (Fig. 6B).

DISCUSSION

The CETP-mediated exchange of neutral lipids between lipoprotein substrates is a complex process which integrates a sequence of events [4]. Although the different steps of the lipid transfer reaction have not yet been clearly identified, it is now generally assumed that the binding of CETP to lipoproteins constitutes the preliminary, and rate-limiting step of the transfer process [4]. In fact, the CETP-lipoprotein binding is electrostatic in nature, and it is mediated through the interaction of positively charged groups of CETP with negatively charged groups which are localized at the lipoprotein surface [5, 8, 38]. In particular, Nishida and coworkers [8] demonstrated that an optimal electronegative charge at the lipoprotein surface is required to obtain

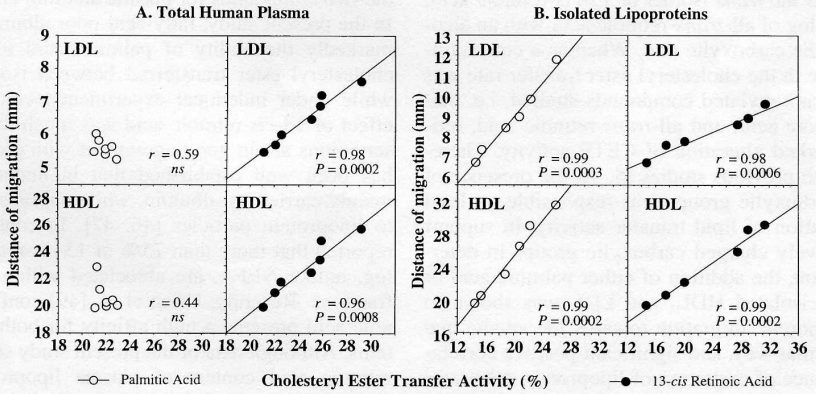


Fig. 6. Correlations between cholesteryl ester transfer activity and the electrophoretic migration of LDL and HDL. Incubation mixtures contained either total normolipidemic human plasma, iodoacetate (1.5 mM), and a tracer dose of [^{3}H]CE-HDL_3 (2.5 nmol cholesterol) (A), or isolated lipoproteins (LDL, 10 nmol cholesterol; [^{3}H]CE-HDL_3, 2.5 nmol cholesterol) and purified CETP (4.5 μg) (B), in a final volume of 50 μl (see Materials and Methods). Incubation mixtures containing total human plasma (A) were supplemented with increasing concentrations (0−700 μM) of either 13-*cis*-retinoic acid (●) or palmitic acid (○). Incubations mixtures containing isolated lipoproteins and purified CETP (B) were supplemented with increasing concentrations (0−100 μM) of either 13-*cis*-retinoic acid (●) or palmitic acid (○). At the end of a 3-h, incubation at 37 °C, the percentage of [^{3}H]cholesteryl esters transferred from [^{3}H]CE-HDL_3 towards the < 1.068-g/ml fractions, as well as the migration distance of LDL and HDL fractions in agarose gel were determined as described under Materials and Methods.

both an optimal interaction of CETP with lipoprotein substrates and a maximal cholesteryl ester transfer activity, and they indicated that changes in electrostatic charge at the lipoprotein surface can influence the CETP−lipoprotein interactions. In support of the physiological relevance af the latter observations, we recently demonstrated that the electronegativity of plasma HDL constitutes one major determinant of human CETP activity [39]. Several surface lipid components, among them phospholipids and NEFA, arose as possible candidates in constituting CETP binding sites. In particular, the role of NEFA in modulating CETP activity has been well documented during the last decade; NEFA exert a concentration-dependent effect on both the exchange [7, 29] and the net mass transfer [40] of cholesteryl esters and triacylglycerols; the modulating potency of NEFA is dependent on both the ionization of their carboxylic group [7], and the structure of their acyl carbon chain [29, 41]; NEFA can increase the ability of CETP to promote the formation of LDL-HDL complexes [42]; NEFA may modulate CETP activity not only between isolated lipopotein substrates but also in native human plasma [25, 26], indicating that the NEFA-mediated regulation of CETP activity may be of physiological relevance. In particular, we recently demonstrated that increased NEFA content of lipoprotein particles in analbuminemic patients is associated both with increased lipoprotein electronegativity, and with markedly increased neutral lipid exchanges between plasma lipoproteins with a high electronegative charge [26]. Based on previous observations with NEFA, we made the hypothesis that related molecules, constituted of one carboxylic head group and one hydrophobic carbon chain, may also act as putative modulators of the CETP-mediated lipid transfer reaction. That hypothesis led us to demonstrate in the present study that retinoic acid, a carboxylated compound used in the treatment of acne and other forms of dermatosis [9−11], constitutes a new, potent activator of the neutral lipid transfer process.

In the present study, the abilities of palmitic acid (one of the most potent activator of CETP among NEFA) [29], 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, and retinol to modulate the CETP-mediated exchange of [^{3}H]cholesteryl esters between HDL and apoB-containing lipoproteins were compared. The various compounds present some structural similarities: retinoic acid and palmitic acid derivatives are constituted of one hydrophobic carbon chain surmounted by one carboxylic group, all-*trans*-retinoic acid is the *trans* isomer of 13-*cis*-retinoic acid, and retinol is the homolog of all-*trans*-retinoic acid with an alcohol group in place of the carboxylic one. Whereas a concentration-dependent increase in the cholesteryl ester transfer rate was observed with all the carboxylated compounds studied, i.e. palmitic acid, 13-*cis*-retinoic acid, and all-*trans*-retinoic acid, retinol did not induce marked alteration of CETP activity. Therefore, in accordance with previous studies [5, 7], the presence of negatively charged, carboxylic groups was responsible, at least in part, for the modulation of lipid transfer activity. In support of a role of the negatively charged carboxylic groups in determining CETP interaction, the addition of either palmitic acid or 13-*cis*-retinoic acid to isolated HDL_3 and LDL was shown to increase their electrophoretic migration towards the anodic end of agarose gels in a similar way, and significant positive correlations between the distance of migration of lipoprotein substrates and CETP activity were observed in the presence of both palmitic acid and 13-*cis*-retinoic acid. In contrast, in total plasma, significant positive correlations between the distance of migration of lipoprotein substrates and plasma CETP activity arose only with retinoic acid but not with palmitic acid. Another determinant of the ability of various carboxylated compounds to act as CETP modulators is the structure of their hydrophobic carbon chain. Indeed, significant differences in the modulating potency of palmitic acid, 13-*cis*-retinoic acid, and all-*trans*-retinoic acid were observed. These observations are in good agreement with previous observations from our laboratory which revealed that alterations in the length and the degree of unsaturation of the acyl carbon chain [29, 43], as well as in the *cis* or *trans* configuration of double bonds [42], constitute important factors in determining the ability of NEFA to modulate CETP activity. The mechanism which might account for differences in the activating potency of palmitic acid, 13-*cis*-retinoic acid, and all-*trans*-retinoic acid is still unclear, and might relate in some way to subtle structural changes that distinct compounds may induce in the lipoprotein surface [44].

Interestingly, 13-*cis*-retinoic acid was able to increase CETP activity not only in reconstituted incubation mixtures containing isolated lipoprotein particles, but also in native human plasma. However, it is noteworthy that an approximately ten fold excess of 13-*cis*-retinoic acid was required to find an effect in total human plasma when compared to the reconstituted mixtures. At least two main reasons may account for that latter phenomenon: (a) the final lipoprotein levels in reconstituted mixtures (final concentration of total cholesterol, 0.25 mM) were clearly lower than the lipoprotein levels in experimental mixtures containing total human plasma (final concentration of total cholesterol, 2.15 mM); (b) unlike reconstituted mixtures containing isolated lipoproteins and purified CETP, total plasma contains large amounts of albumin which might affect the plasma distribution of 13-*cis*-retinoic acid. Unlike 13-*cis*-retinoic acid, palmitic acid did not alter significantly cholesteryl ester transfer activity when added to total human plasma, probably reflecting the ability of plasma albumin to displace NEFA from the lipoprotein surfaces [7, 29, 45]. Although palmitic acid and 13-*cis*-retinoic acid were able to increase the migration distance of isolated lipoproteins with a similar magnitude, palmitic acid had a markedly lower ability to increase the electrophoretic mobility of lipoprotein fractions in total plasma.

It has been well established that plasma albumin, by removing NEFA from the lipoprotein surface [46], can suppress their ability to increase the interaction of CETP with lipoprotein substrates [7, 29, 45]. Based on previous observations with NEFA [29, 42], the higher capacity of 13-*cis*-retinoic acid to increase plasma cholesteryl ester transfer activity as compared with palmitic acid might relate to differences in the relative affinity of the two compounds for plasma albumin and plasma lipoproteins. In the present study, fatty-acid-poor albumin was able to reduce markedly the ability of palmitic acid to increase the rate of cholesteryl ester transferred between isolated HDL and LDL, while under indentical experimental conditions, the activating effect of 13-*cis*-retinoic acid was much less affected. These observations are in good agreement with previous ones. Indeed, it has been well established that in human plasma, NEFA are mainly carried by albumin, while only a small fraction is bound to lipoprotein particles [46, 47]. In contrast, Zech et al. [48] reported that more than 75% of 13-*cis*-retinoic acid and its analog, unlike NEFA, are associated within the VLDL and LDL fractions. Recently, Urien et al. [49] confirmed that 13-*cis*-retinoic acid presents a high affinity for both albumin and lipoproteins. Although data of the present study suggest that an elevated retinoic acid content of plasma lipoproteins in isotretinoin-treated patients might secondarily induce alterations in the plasma CETP-mediated neutral lipid transfer reaction, the pathophysiological relevance of our *in vitro* observations is uncertain. Indeed, a significant effect of 13-*cis*-retinoic acid on the CETP-mediated cholesteryl ester transfer in total plasma was observed in the present study with concentrations of retinoic acid which were clearly higher than the 13-*cis*-retinoic acid concentrations found in total plasma from isotretinoin-treated patients [50]. The

hypothesis of a role of retinoic acid in modulating *in vivo* plasma CETP activity deserves further investigation.

The authors thank Serge Gueldry for statistical analysis. Dr M. Klaus (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel) is gratefully acknowledged for providing arotinoid ethylsulfone (Ro 15-1570). This investigation was supported by the *Université de Bourgogne*, the *Conseil Régional de Bourgogne*, and the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM).

REFERENCES

1. Hesler, C. B., Tall, A. R., Swenson, T. L., Weech, P. K., Marcel, Y. L. & Milne, R. W. (1988) Monoclonal antibodies to the M_r 74000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma, *J. Biol. Chem. 263*, 5020–5023.
2. Anonymous (1991) Cholesteryl ester transfer protein, *Lancet 338*, 666–667.
3. Tall, A. R. (1993) Plasma cholesteryl ester transfer protein, *J. Lipid. Res. 34*, 1255–1274.
4. Lagrost, L. (1994) Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: Review of *in vitro* and *in vivo* studies, *Biochim. Biophys. Acta 1215*, 209–236.
5. Pattnaik, N. M. & Zilversmit, D. B. (1979) Interaction of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles, *J. Biol. Chem. 254*, 2782–2786.
6. Tall, A. R., Sammet, D., Vita, G. M., Deckelbaum, R. & Olivecrona, T. (1984) Lipoprotein lipase enhances the cholesteryl ester transfer protein-mediated transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to very low density lipoproteins, *J. Biol. Chem. 259*, 9587–9594.
7. Sammet, D. & Tall, A. R. (1985) Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis, *J. Biol. Chem. 260*, 6687–6697.
8. Nishida, H. I., Arai, H. & Nishida, T. (1993) Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins, *J. Biol. Chem. 268*, 16352–16360.
9. Peck, G. L., Olsen, T. G., Yoden, F. W., Straus, J. S, Downing, D. T., Pandya, M., Butkus, D. & Arnaud-Battardier, J. (1979) Prolonged remissions of cystic and conglobate acne with 13-*cis*-retinoic acid, *New Engl. J. Med. 300*, 329–333.
10. Jones, H., Blanc, D. J. & Cunliffe, W. J (1980) 13-*cis*-Retinoic acid and acne, *Lancet II*, 1048–1049.
11. Lyons, F., Marsden, J. R. & Shuster, S. (1982) Comparison of 13-*cis*-retinoic acid and cyproterone acetate on the clinical response, sebum secretion, dermal and epidermal lipogenesis in acne, *J. Invest. Dermatol. 78*, 327.
12. Vahlquist, C., Michäelsson, G., Vahlquist, A. & Vessby, B. (1985) A sequential comparison of etretinate (tigason) and isotretinoin (roaccutane) with special regard to their effects on serum lipoproteins, *Brit. J. Derm. 112*, 69–76.
13. Katz, R. A., Jorgensen, H. & Nigra, T. P. (1980) Elevation of serum triglyceride levels from oral isotretinoin in disorders of keratinization, *Arch. Dermatol. 116*, 1369–1372.
14. Dicken, C. H. & Connally, S. M. (1980) Eruptive xanthomas associated with isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid), *Arch. Dermatol. 116*, 951–952.
15. Gollnick, H., Tsambaos, D. & Orfanos, C. E. (1981) Risk factors promote elevations of serum lipids in acne patients under oral 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin), *Arch. Dermatol. Res. 271*, 189–196.
16. Lyons, F., Laker, M. F., Marsden, J. R., Manuel, R. & Shuster, S. (1982) Effect of oral 13-*cis*-retinoic acid on serum lipids, *Br. J. Dermatol. 107*, 591–595.
17. Zech, L. A., Gross, E. G., Peck, G. L. & Brewer, H. B. (1983) Changes in plasma cholesterol and triglyceride levels after treatment with oral isotretinoin. A prospective study, *Arch. Dermatol. 119*, 987–993.
18. Marsden, J. R., Trinnick, T. R., Laker, M. F. & Shuster, S. (1984) Effects of isotretinoin on serum lipids and lipoproteins, liver and thyroid function, *Clin. Chim. Acta 143*, 243–251.
19. Bershad, S., Rubinstein, A., Paterniti, J. R. Jr, Ngoc-Anh, L., Poliak, S. C., Heller, B., Ginsberg, H. N., Fleischmajer, R., & Brown, W. V. (1985) Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne, *New Engl. J. Med. 313*, 981–985.
20. Ha, Y. C., Chang, L. B. F. & Barter, P. J. (1985) Effects of injecting exogenous lipid transfer protein into rats, *Biochim. Biophys. Acta 833*, 203–210.
21. Quig, D. W. & Zilversmit, D. B. (1986) Disappearance and effects of exogenous lipid transfer activity in rats, *Biochim. Biophys. Acta 879*, 171–178.
22. Agellon, L. B., Walsh, A. M., Hayek, T., Moulin, P., Cheng-Jiang, X., Shelanski, S. A., Breslow, J. L. & Tall, A. R. (1991). Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice, *J. Biol. Chem. 266*, 10796–10801.
23. Mann, C. J., Yen, F. T., Grant, A. M. & Bihain, B. E. (1991) Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia, *J. Clin. Invest. 88*, 2059–2066.
24. Lagrost, L., Gandjini, H., Athias, A., Guyard-Dangremont, V., Lallemant, C. & Gambert, P. (1993) Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects, *Arterioscler. Thromb. 13*, 815–825.
25. Lagrost, L., Florentin, E., Guyard-Dangremont, V., Athias, A., Gandjini, H., Lallemant, C. & Gambert, P. (1995) Evidence for non esterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15*, 1388–1396.
26. Braschi, S., Lagrost, L., Florentin, E., Martin, C., Athias, A., Gambert, P., Krempf, M., Lallemant, C. & Jacotot, B. (1996) Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from analbuminemic patients, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16*, 441–449.
27. Rosa, F. W. (1983) Teratogenicity of isotretinoin, *Lancet II*, 513.
28. Rosa, F. (1987) Isotretinoin dose and teratogenicity, *Lancet II*, 1154.
29. Lagrost, L. & Barter, P. J. (1991) Effects of various non esterified fatty acids on the transfer of cholesteryl esters from HDL to LDL induced by the cholesteryl ester transfer protein, *Biochim. Biophys. Acta 1085*, 209–216.
30. Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J. Clin. Invest. 34*, 1345–1353.
31. Tollefson, J. H., Liu, A., & Albers, J. J. (1988) Regulation of plasma lipid transfer by the high-density lipoproteins, *Am. J. Physiol. 255*, E894-E902.
32. Lagrost, L., Perségol, L., Lallemant, C. & Gambert, P. (1994) Influence of apolipoprotein composition of high density lipoprotein particles on cholesteryl ester transfer protein activity. Particles containing various proportions of apolipoproteins AI and AII, *J. Biol. Chem. 269*, 3189–3197.
33. Lagrost, L., Athias, A., Gambert, P. & Lallemant, C. (1994) Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein, *J. Lipid. Res. 35*, 825–835.
34. McClean, S. W., Ruddell, M. E., Gross, E. G. DeGiovanna, J. J. & Peck, G. L. (1982) Liquid-chromatographic assay for retinol (vitamin A) and retinol analogs in therapeutic trials, *Clin. Chim. Acta 28*, 693–696.
35. Meyer, E., Lambert, W. E., & De Leenheer, A. (1994) Simultaneous determination of endogenous retinoic acid isomers and retinol in human plasma by isocratic normal-phase HPLC with ultraviolet detection, *Clin. Chem. 40*, 48–50.
36. Sparks, D. L. & Philips, M. C., (1992) Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis, *J. Lipid. Res. 33*, 123–130.
37. Kirk, R. E. (1982) *Experimental design: Procedures for the behavioral sciences*, 2nd edn, Brooks/Cole Publishing Co, Wadsworth Inc., Belmont CA.
38. Wang, S., Kussie, P., Deng, L. & Tall, A. (1995) Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid, *J. Biol. Chem. 170*, 612–618.
39. Masson, D., Athias, A. & Lagrost, L. (1996) Evidence for electronegativity of plasma high density lipoprotein-3 as one major de-

terminant of human cholesteryl ester transfer protein activity, *J. Lipid Res. 37*, 1579−1590.
40. Barter, P. J., Chang, L. B. F. & Rajaram, O. V (1990) Sodium oleate dissociates the heteroexchange of cholesteryl esters and triacylglycerol between HDL and triacylglycerol-rich lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta 1047*, 294−297.
41. Lagrost, L. (1992) Differential effects of *cis* and *trans* fatty acid isomers, oleic and elaidic acids, on the cholesteryl ester transfer protein activity, *Biochim. Biophys. Acta 1124*, 159−162.
42. Lagrost, L. & Barter, P. J. (1992) Cholesteryl ester transfer protein promotes the association of HDL apolipoproteins A-I and A-II with LDL: potentiation by oleic acid, *Biochim. Biophys. Acta 1127*, 255−262.
43. Lagrost, L. & Barter, P. J. (1991) Effects of various non esterified fatty acids on the particle size redistribution of high density lipoproteins induced by the cholesteryl ester transfer protein, *Biochim. Biophys. Acta 1082*, 204−210.
44. Foucher, C., Lagrost, L., Maupoil, V., Le Meste, M., Rochette, L. & Gambert, P. (1996) Alterations of lipoprotein fluidity by non-esterified fatty acids known to affect cholesteryl ester transfer protein activity, *Eur. J. Biochem. 236*, 436−442.
45. Barter, P. J., Chang, L. B. F. & Rajaram, O. V. (1990) Sodium oleate promotes a redistribution of cholesteryl esters from high to low density lipoproteins, *Atherosclerosis 84*, 13−24.
46. Shafrir, E. (1958) Partition of unesterified fatty acids in normal and nephrotic syndrome serum and its effect on serum electrophoretic pattern, *J. Clin. Invest.* 37, 1775−1782.
47. Spector, A. A. (1975) Fatty acid binding to plasma albumin, *J. Lipid. Res. 16*, 165−179.
48. Zech, L. A., Gross, E. G., McClean, S. W., Peck, G. L. & Brewer, H. B. (1981) Lipoprotein metabolism in patients receiving synthetic retinoids, isotretinoin and etretinate, *Arteriosclerosis 1*, 390a.
49. Urien, S., Claudepierre, P., Nguyen, P., Chassany, O., Meyer, J., Brandt, R. & Tillement, J.-P. (1994) Binding of retinoid analogues to albumin and lipoproteins of human plasma, *Int. J. Clin. Pharm. Res. 14*, 115−118.
50. Rollman, O. & Vahlquist, A. (1986) Oral isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid) therapy in severe acne: Drug and vitamin A concentrations in serum and skin, *J. Invest. Dermatol. 86*, 384−389.

RESUME

Dans le plasma, la protéine humaine de transfert des esters de cholestérol (CETP) joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques en catalysant le transfert net massique d'esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B, et de triglycérides des VLDL vers les HDL et LDL. Bien que le rôle de la CETP sur l'athérogénicité du profil lipoprotéique reste à l'heure actuelle encore ambigu, l'étude des mécanismes de régulation de cette protéine suscite un intérêt croissant d'un point de vue pharmacologique en particulier en ce qui concerne le développement d'inhibiteurs. Une approche *in vitro* nous a permis de montrer que des composés amphipathiques (acides gras non estérifiés et acides rétinoïques) constitués d'une chaîne carbonée hydrophobe et d'un groupement carboxylique ionisable induisaient une augmentation de l'activité de transfert des esters de cholestérol en augmentant l'électronégativité des particules lipoprotéiques. *In vivo*, nos études ont permis de mettre en évidence une corrélation significative entre la concentration en acides gras non estérifiés liés aux lipoprotéines et l'activité CETP plasmatique chez des sujets normolipidémiques. L'effet des acides gras non estérifiés en encore plus marqué dans des situations pathologiques associées à une redistribution des acides gras non estérifiés de l'albumine vers les lipoprotéines plasmatiques (analbuminémie ou syndrome néphrotique). La mise au point d'une méthode électrophorétique spécifique nous a permis de confirmer que, chez des sujets analbuminémiques, les échanges d'esters de cholestérol s'effectuent préférentiellement avec les lipoprotéines les plus électronégatives dont le contenu en acides gras non estérifiés est le plus élevé.

Globalement, les résultats de cette étude montrent que les acides gras non estérifiés constituent des modulateurs potentiels de l'activité de transfert des esters de cholestérol au niveau plasmatique et qu'ils pourraient ainsi influencer l'athérogénicité du profil lipoprotéique.

MOTS CLES:

- Acides gras non estérifiés
- Acides rétinoïques (acide 13-*cis* rétinoïque, acide tout *trans* rétinoïque)
- Analbuminémie
- Charge électrostatique
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de concentration
- Lipoprotéines
- Protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP)
- Syndrome néphrotique