

Caractérisation des rôles du transporteur ATP-Binding cassette G1 (ABCG1) au sein du macrophage humain

Sandra Larrède

▶ **To cite this version:**

Sandra Larrède. Caractérisation des rôles du transporteur ATP-Binding cassette G1 (ABCG1) au sein du macrophage humain. Médecine humaine et pathologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : 2008PA066465 . tel-00812087

HAL Id: tel-00812087

https://theses.hal.science/tel-00812087

Submitted on 11 Apr 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PARIS VI - PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité de Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

Mlle. Sandra LARRÈDE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Caractérisation des rôles du Transporteur ATP-Binding Cassette G1 (ABCG1) au sein du macrophage humain

Soutenue le vendredi 19 décembre 2008

Devant le jury composé de :

Pr Philippe CARDOT	**Président**
Dr Giulia CHINETTI-GBAGUIDI	**Rapporteur**
Dr Xavier COLLET	**Rapporteur**
Dr Isabelle DUGAIL	**Examinateur**
Dr Natalie FOURNIER	**Examinateur**
Dr Maryse GUÉRIN	**Directeur de thèse**
Dr Wilfried LE GOFF	**Directeur de thèse**

Université Pierre et Marie Curie - Paris VI
4 place Jussieu
75005 Paris
France
Tél. +33 1 44 27 44 27

INSERM U551 Dyslipoprotéinémies et athérosclérose
Hôpital de la Pitié-Salpêtrière Bât. Delessert
83, boulevard de l'Hôpital
75651 PARIS Cedex 13
Tél. : +33 1 42 17 78 78

Je tiens en premier lieu à exprimer ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail :

Le Président, Monsieur le Professeur Philippe Cardot, les rapporteurs, Madame le Docteur Giulia Chinetti-Gbadigui et Monsieur le Docteur Xavier Collet et les examinateurs, Madame le Docteur Isabelle Dugail et Madame le Docteur Natalie Fournier.

C'est un véritable plaisir pour moi de pouvoir remercier ici toutes les personnes dont la présence m'a été si précieuse durant ces trois années de thèse, même si de simples mots ne pourront jamais retranscrire assez fidèlement mon immense reconnaissance.

Je tiens donc à remercier Monsieur le Docteur M John Chapman, pour m'avoir accueillie dans son unité avec bienveillance et m'avoir ainsi permis de bénéficier de conditions de travail on ne peut plus épanouissantes, mais aussi pour le réel intérêt qu'il a pu manifester pour mes travaux au cours de ces trois années.

J'adresse mes plus profonds remerciements à madame le Docteur Maryse Guérin pour m'avoir intégrée dans son équipe, et pour m'avoir apporté un soutien sans faille de l'obtention de la bourse du ministère jusqu'à la finalisation de cette thèse. La cohésion et l'environnement bienveillant et chaleureux qu'elle a su instaurer au sein de sa fameuse Team+ contribuent grandement au plaisir que l'on peut avoir à venir travailler chaque jour.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude et surtout toute mon estime au Docteur Wilfried Le Goff pour m'avoir accordé sa confiance dès le départ malgré mes piètres connaissances scientifique et technique dans le domaine de l'athérosclérose. Je tiens à souligner ses innombrables qualités scientifiques et humaines, son sens de la pédagogie, sa disponibilité et son optimisme constant. Il a su superviser mon travail avec beaucoup de compétence, me faire partager ses connaissances scientifiques, me prodiguer de précieux conseils et porter un regard avisé sur mes résultats ce qui a largement contribué au bon déroulement de mon projet. Je ne saurais exprimer à quel point je lui suis reconnaissante.

Je remercie aussi le Docteur Thierry Huby qui a su faire preuve de beaucoup de patience malgré mes venues incessantes dans son bureau toujours en quête de renseignements divers…Il a su me faire profiter de ses connaissances et de sa rigueur scientifique par sa vision critique et par ses remarques toujours constructives et pertinentes et je l'en remercie chaleureusement.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Wendy Jessup. Ses connaissances extrêmement pointues dans le domaine, l'intérêt scientifique et l'enthousiasme qu'elle a toujours manifesté envers mon projet de thèse ont fait que ce fut toujours un réel plaisir de pouvoir partager mes projets et mes résultats avec elle.

Merci également aux Docteurs Philippe Lesnik, Alain Carrié, Philippe Couvert et Anatol Kontush avec qui mes échanges ont été beaucoup plus extra-scientifiques mais qui n'en sont pas moins marquants (de l'inoubliable vatrouchka russe, aux petites anecdotes hospitalières, en passant par l'énigmatique décorporation…sans oublier le muxu quotidien qui à coup sûr me manquera…!). Ce sont aussi ce genre de moments qui font que mes trois ans de thèse resteront pour moi absolument mémorables.

Je souhaite également adresser mes plus sincères remerciements à Eric Frisdal. Malgré toutes les galères techniques qu'on aura partagé pendant ces trois ans ton expérience, tes conseils et ton soutien constant m'auront été extrêmement précieux, sans parler de toute l'énergie que tu as pu employer pour notre sécurité et oui je reconnais que tout tes contrôles radioactivités, tout tes sécurisations de coin de meuble mine de rien c'est du boulot ! Et merci aussi pour tous les fous rires que j'ai pu avoir à te voir démarrer au quart de tour lorsque quelque chose clochait...! J'ai vraiment beaucoup apprecié de travailler avec toi.

Martine, mille mercis pour ton aide, tous tes petits conseils techniques entrecoupés des derniers potins people (ou du labo...). Ton franc-parler et ton naturel sont un vrai bonheur !

Un grand merci aussi à Françoise, toujours présente pour nous aider à résoudre nos soucis administratifs et rayonnante en toutes circonstances. Je n'oublie non plus l'accueil matinal souriant de Roberte et Rosa.

Tout plein de mercis aussi aux clan des filles du labo avec qui j'ai passé de très bons moments: Betty (probablement la plus bavarde des cinq....c'est dire !!!), Flora (la reine des pâtisseries, toujours de bonne humeur), Milie, (l'italienne "d'adoption" toujours à l'écoute) Sandrine (hyperdynamique et fonceuse) et Zélie (la gourmande et pétillante globe-trotter de la Team+).

Grazie mille alla mia bella giovanna !!! Quel plaisir de partager ces trois années de thèse avec toi ! Toujours dynamique et de bonne humeur, je me suis vraiment bien éclatée avec toi, merci pour ton amitié, je te souhaite tout le meilleur possible pour la suite...!

Maryline, "la petite soeur de la famille Team+"...je n'ai aucun doute sur le fait que tu vas mener ta thèse avec brio. Merci pour ta sympathie, ta gentillesse et ta complicité. Je te souhaite une très bonne continuation pour ta thèse.

Un petit clin d'oeil à tous mes "collègues thésards" avec qui j'ai passé de très bons moments et à qui je souhaite une très bonne continuation : Alexina (notre espionne californienne grâce à qui un trafic ultra secret de Converses & de Big Red a pu être mis en place), Amal, Andrew (ou celui qui a réussit à détruire l'image du gentleman britannique auprès de tout ceux qui l'ont côtoyé...), Hala, Majda (dont je n'oublierai pas la version revue de No Stress) et Sophie...sans oublier les "ainés" : Mo & Manu.

Et une petite pensée pour ceux qui ont fait un petit passage à l'U551 que j'ai eu grand plaisir à côtoyer et qui ont contribué à la bonne ambiance générale : Gaëlle, Dorothée, Jean-Camille & Francesco.

Et enfin je tiens à exprimer tout mon amour à mes parents et mes deux frères qui ces trois dernières années ont du subir jour après jour mon humeur fluctuant au gré de mes manips et dont le soutien constant m'a été absolument essentiel.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude à tous les membres du jury

Le Président,

Monsieur le Professeur Philippe Cardot

Les Rapporteurs,

Madame le Docteur Guilia Chinetti-Gbadigui
Monsieur le Docteur Xavier Collet

Les Examinateurs,

Madame le Docteur Isabelle Dugail
Madame le Docteur Natalie Fournier

Les Directeurs de Thèse

Madame le Docteur Maryse Guérin
Monsieur le Docteur Wilfried Le Goff

Je remercie très vivement Monsieur le Docteur M John Chapman, qui m'a accueillie dans son unité avec bienveillance en m'accordant sa confiance

Je tiens à remercier Madame le Docteur Maryse Guérin, qui m'a accueillie dans son équipe et qui m'a accordée sa confiance et son soutien constant.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Wilfried Le Goff, qui a supervisé ce travail de thèse avec beaucoup de compétence.

Un grand merci enfin, aux membres de l'Unité Inserm 551 pour leur soutien et leur amitié.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

RÉSUMÉ / ABSTRACT

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'athérosclérose p1

1.1. Définition

1.2. Evolution des lésions

1.3. Physiopathologie : la phase précoce d'athérogenèse

2. Rôles du macrophage dans l'athérosclérose p7

2.1. Le rôle du macrophage dans le stress oxydant **p8**

2.1.1. L'anion superoxyde

2.1.2. Le complexe NADPH

2.1.3. La myéloperoxydase

2.1.4. La céruloplasmine

2.1.5. La 15-lipoxygénase

2.1.6. Macrophage et stress oxydant, le rôle du NADPH

2.2. Rôle inflammatoire du macrophage dans l'athérosclérose **p11**

2.3. Macrophage et l'apoptose dans l'athérosclérose **p13**

2.3.1. Les caspases

2.3.2. La voie mitochondriale

2.3.3. La voie des "death-receptors"

2.3.4. Régulations de l'apoptose

2.3.5. Conséquences de l'apoptose

2.3.6. L'apoptose du macrophage, des conséquences multiples

2.4. Phagocytose et athérosclérose **p18**

2.4.1. Les signaux de reconnaissance "eat-me"

2.4.1.1. La phosphatidylsérine

2.4.1.2. Les autres signaux

2.4.2. Les molécules de liaison

2.4.3. L'implication controversée d'ABCA1

2.4.4. Les molécules de reconnaissance du phagocyte
2.4.4.1. Les récepteurs scavengers de classe A
2.4.4.2. Les récepteurs scavengers de classe B
2.4.4.3. Le récepteur CD14
2.4.4.4. Le récepteur LOX-1
2.4.4.5. Le récepteur à la phosphatidylsérine
2.4.4.6. Les autres récepteurs
2.4.5. L'importance du processus de phagocytose
3. Homéostasie du cholestérol au sein du macrophage p24
3.1. Captation du cholestérol au sein du macrophage **p25**
3.1.1. La voie du LDL-R
3.1.2. La voie des récepteurs scavengers
3.1.2.1. Les récepteurs scavengers de classe A
3.1.2.2. Les récepteurs scavengers de classe B
3.1.2.3. Les récepteurs scavengers de classe D
3.1.2.4. Les récepteurs scavengers de classe E
3.1.3. Bilan
3.2. Métabolisme intracellulaire **p32**
3.2.1. De l'internalisation au stockage sous forme de gouttelette lipidique
3.2.2. La ré-hydrolyse des esters de cholestérol
3.2.3. Le double aspect de la captation du cholestérol
3.3. Efflux de cholestérol hors du macrophage **p36**
3.3.1. La diffusion passive
3.3.2. La voie de sécrétion de l'apoE
3.3.3. Le récepteur scavenger classe B type I (SR-BI)
4. Rôle des ATP binding-cassette transporters dans le macrophage p40
4.1. Caractéristiques
4.2. Les principaux ABC transporteurs impliqués dans le métabolisme lipidique
4.2.1. Le transporteur ABCA12
4.2.2. Le transporteur ABCA7
4.2.3. Le transporteur ABCB4
4.2.4. Le transporteur ABCG4
4.2.5. Les transporteurs ABCG5 / ABCG8
4.3. ATP-binding Cassette A1 : ABCA1 ..... **p44**
4.3.1. Gène et sa régulation
4.3.2. La protéine ABCA1

4.3.3. Rôle d'ABCA1 dans l'efflux et la formation de cellules spumeuses
4.3.4. Rôle d'ABCA1 dans la genèse des particules HDL
4.3.5. Mécanisme de fonctionnement d'ABCA1
4.4. ATP-binding Cassette G1 : ABCG1 ..... **p53**
4.4.1. Gène et sa régulation
4.4.2. La protéine ABCG1
4.4.3. Le rôle d'ABCG1 dans l'athérogenèse
4.4.4. Rôle d'ABCG1 dans l'efflux de cholestérol au sein du macrophage
4.4.5. Les autres rôles d'ABCG1

OBJECTIF DES TRAVAUX DE RECHERCHE **p63**

PRÉSENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE **p64**

- **PREMIERE PARTIE :** **p64**
- **Implication d'ABCG1 et de Cla-1 dans les mécanismes d'efflux de cholestérol au sein du macrophage humain : implication de l'ATP et de la stimulation par les agonistes LXR**

- **SECONDE PARTIE :** **p107**
- **Evaluation de l'implication d'ABCG1 dans la phagocytose**

CONCLUSION GÉNÉRALE **p139**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **p141**

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

- **STIMULATION OF CHOLESTEROL EFFLUX BY LXR AGONISTS IN CHOLESTEROL-LOADED PRIMARY HUMAN MACROPHAGES IS AN ATP-DEPENDENT TRANSPORT MECHANISM MEDIATED BY ABCA1 INDEPENDENT OF ABCG1**

  Sandra LARREDE, Wendy JESSUP, Eric FRISDAL, Maryline OLIVIER, Philippe COUVERT, Alain CARRIE, Philippe GIRAL, M. John CHAPMAN, Maryse GUERIN and Wilfried LE GOFF

  Soumis à Circulation Research

Communications orales

ABCG1 AND CLA-1 PARTICIPATE TO CELLULAR CHOLESTEROL EFFLUX TO HDL IN HUMAN MACROPHAGES.

Larrède S, Frisdal E, Olivier M, Chapman MJ, Guérin M and Le Goff W.

5ème Congrès Annuel de la Société Française d'Athérosclérose. Biarritz 12-14 Juin 2008- France

Communications affichées

Rôle d'ABCG1 dans la formation des cellules spumeuses et le développement de l'athérosclérose.

Larrède S, Le Goff W, Guérin M.

7ème Journées de l'Ecole Doctorale de Physiologie et Physiopathologie. 27-28 Juin 2006. Paris- France

Role of macrophage ABCG1 in foam cells formation and atherosclerosis progression.

Larrède S, Le Goff W, Guérin M.

8ème Journées de l'Ecole Doctorale de Physiologie et Physiopathologie. 20-21 Juin 2007. Paris- France

Differential regulation of ABCG1 in mouse and human macrophage: impact on cholesterol homeostasis

Larrède S, Frisdal E, Olivier M, Chapman MJ, Guérin M and Le Goff W.

ATP Binding Cassette transporter proteins : from multidrug resistance to genetic diseases 2nd FEBS Special Meeting 1-8 Mars 2008 Innsbruck- Autriche

Differential regulation of ABCG1 in mouse and human macrophages: impact on cholesterol homeostasis.

Larrède S, Frisdal E, Olivier M, Chapman MJ, Guérin M and Le Goff W.

9ème Journées de l'Ecole Doctorale de Physiologie et Physiopathologie. 14-15 Mai 2008. Paris- France

ABCG1 and Cla-1 participate to cellular cholesterol efflux to HDL in human macrophages

Larrède S, Frisdal E, Olivier M, Chapman MJ, Guérin M and Le Goff W.

5ème Congrès Annuel de la Société Française d'Athérosclérose. Biarritz 12-14 Juin 2008 - France

RÉSUMÉ / ABSTRACT

RÉSUMÉ / ABSTRACT

Caractérisation des rôles du Transporteur ATP-Binding Cassette G1 (ABCG1) au sein du macrophage humain

Le macrophage joue un rôle clé dans l'athérogenèse, intervenant notamment, dans la captation de cholestérol à l'origine de la formation des stries lipidiques. Sa capacité à éliminer le cholestérol en excès est donc critique pour l'évolution de la pathologie. Il intervient aussi dans la captation des cellules apoptotiques présentes au sein de la lésion, processus déterminant en termes d'inflammation et de stabilité de la plaque.

Mes travaux ont consisté à évaluer le rôle du transporteur ATP-Binding-Cassette G1 (ABCG1), dans ces mécanismes clés de l'athérogenèse.

Ainsi, nous avons donc montré qu'ABCG1 est à la fois impliqué dans les processus d'efflux au sein des cellules spumeuses chargées en cholestérol libre mais aussi qu'il participe au mécanisme de phagocytose des corps apoptotiques. Ainsi, grâce à ces travaux ABCG1 pourrait être envisagé comme une nouvelle cible thérapeutique de l'athérosclérose.

Characterization of the roles of the ATP-Binding Cassette Transporter G1 (ABCG1) within human macrophage

The macrophage plays a key role in atherogenesis, including in the uptake of cholesterol which lead to the formation of fatty streaks. So its ability to eliminate cholesterol in excess is critical for the development of pathology. Macrophage is also involved in the uptake of apoptotic cells present in lesions, which is a determining process in terms of inflammation and stability of the atherosclerotic plaque.

My work was to evaluate the role of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1), in these key mechanisms of atherogenesis.

Thus, we have demonstrated that ABCG1 is both involved in the process of efflux in foam cells loaded with cholesterol free but it also participates in the mechanism of phagocytosis of apoptotic bodies. Thus, through this work ABCG1 could be considered as a new therapeutic target of atherosclerosis.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC	ATP Binding Cassette
ATP	Adenosine TriPhosphate
Bak	Bcl2 antagonist Killer
Bax	Bcl2 Associated X
Bcl2	B CellLymphoma 2
β2GPI	Beta-2 glycoprotéine
Bid	BH3-Interacting Domain death agonist
CAD	Caspase Activated Dnase
CASPASES	Cystéine Aspartate Specific ProteASE
DISC	Death Inducing Signaling Complex
FasL	Fas Ligand
GPIV	GlycoProtéine IV
LAL	Lipase Acide Lysosomale
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-COenzyme A
HSP60	Heat Shock Protein 60
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule 1
ICAM-3	InterCellular Adhesion Molecule 3
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
kb	kilobases
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	Low Density Lipoprotein Receptor
LOX-1	Lectin-like oxLDL Receptor 1
LPS	LipoPolySaccharide
LXR	Liver X Receptor
MARCO	MAcrophage Receptor with COllagenous structure
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MFG-E8	Milk Fat Globule-EGF-factor 8
NAPDH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
NBD	Nucleotide Binding Domain (Domaine de liaison aux nucleotides)

nCEH	neutral Cholesteryl Ester Hydrolase
NF-KB	Nuclear Factor Kappa B
NO	Oxyde Nitrique
NPC	Niemann-Pick C
oxLDL	LDL oxydées
pb	paire de bases
PKC	Protéine Kinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
RXR	Retinoid X Receptor
SCAP	SREBP-Cleavage Activating Protein
SR-A	Scavenger Receptor class A
SR-BI	Scavenger Receptor class BI type I
SRE	Sterol Regulatory Element
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
TMD	TransMembrane Domain (domaine transmembranaire)
TNFα	Tumor Necrosis Factor Alpha
TNFα-R	Tumor Necrosis Factor Alpha Receptor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAIL	TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand
TRAIL-R	TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand Receptor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'athérosclérose

1.1. Définition

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité au monde, représentant, selon l'OMS, plus de 17 millions de décès par an. A l'origine de la majorité de ces décès se trouve un phénomène pathologique chronique silencieux : l'athérosclérose.

Ce terme d'athérosclérose, proposé en 1904 et tiré du grec (*athéré*, bouillie et *skléros*, dur), reflète parfaitement la double composante de cette pathologie, à savoir, l'obstruction des artères de gros et moyen calibre par une accumulation locale de dépôts majoritairement lipidiques, accompagnée d'une sclérose des vaisseaux.

Divers facteurs favorisent l'athérogenèse, des facteurs immuables tels que l'âge, le sexe ou le patrimoine génétique et des facteurs que l'on pourrait qualifier de "variables", liés au mode de vie, parmi lesquels on peut citer : les dyslipidémies, l'hypertension, le diabète, le syndrome métabolique, la surcharge pondérale et le tabagisme.

Il est intéressant de noter que cette pathologie n'est pas propre à notre société contemporaine. En effet, au début du siècle dernier des analyses histologiques réalisées sur des momies égyptiennes ont révélé chez celles-ci la présence de plaques d'athérome.

Le vieillissement de la population et l'amplification accrue des facteurs de risques observés ces dernières décennies ont provoqué une explosion de la prévalence de l'athérosclérose ce qui a entrainé un véritable déploiement de la prévention et de la prise en charge primaire des patients. Toutefois la morbi-mortalité de l'athérosclérose reste encore très importante, il est ainsi capital de poursuivre les études visant à clarifier les mécanismes de cette maladie.

1.2. Evolution des lésions

L'athérosclérose est une affection particulièrement insidieuse, puisqu'elle commence à se développer dès la vie fœtale, et évolue, ainsi, tout au long de la vie de l'individu de manière quasi silencieuse, jusqu'à l'arrivée d'un événement vasculaire consécutif à une rupture de la plaque ou à l'obstruction vasculaire par formation d'un thrombus. Une classification extrêmement détaillée de l'évolution de la pathologie a été établie par Stary dans les années 90 [1][2][3]

Celle-ci se base sur des observations anatomopathologiques et divise le processus d'athérogenèse en huit stades mais on retient le plus souvent trois grandes étapes au cours de cette évolution : la strie lipidique, la lésion fibro-lipidique et la lésion complexe.

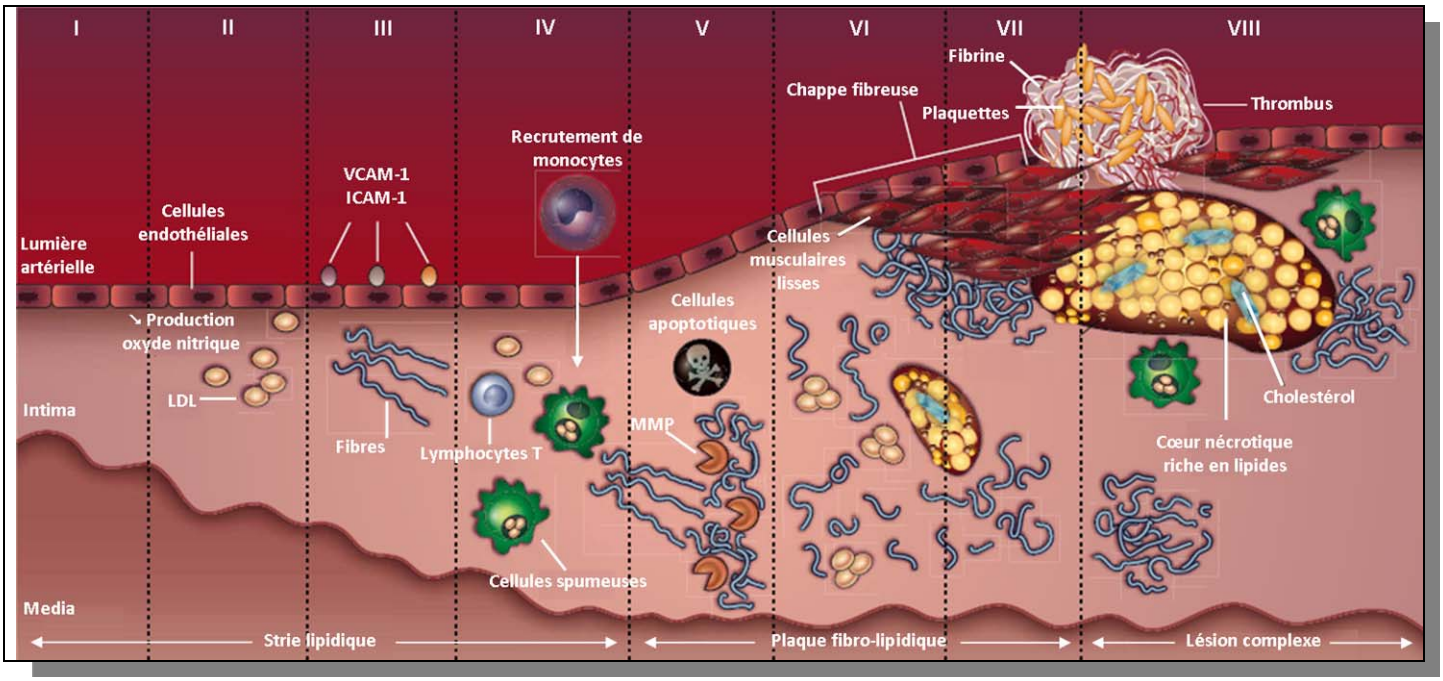


Fig.1 Développement d'une lésion athérosclérotique (D'après Sanz, Nature 2008 [4])

La strie lipidique constitue la lésion initiale de l'athérosclérose. On la trouve principalement chez les jeunes individus de moins de dix ans. Visible à l'œil nu, elle est réversible et forme une strie jaunâtre mais ne fait aucune proéminence pouvant gêner le flux sanguin. Elle est constituée majoritairement de cellules spumeuses dérivées de macrophages et de cellules musculaires lisses, ainsi que de lymphocytes T, infiltrés sous l'endothélium artériel.
La lésion fibro-lipidique, plus évoluée, est enrichie en lipides extracellulaires. Les cellules spumeuses préexistantes dans la lésion deviennent apoptotiques tandis que les cellules musculaires lisses peuvent soit devenir apoptotiques soit continuer à proliférer. Celles-ci perdent alors leur capacité contractile pour adopter un phénotype plus sécrétoire à l'origine d'une expansion de la matrice extracellulaire [5]. Ainsi, grâce à ces cellules musculaires lisses un amas de fibres constitué de fibres de collagène, de fibres élastiques, de glycoprotéines et de protéoglycannes s'accumule au niveau de la lésion ceci menant à la formation d'une chape fibreuse entourant le cœur nécrotique. Majoritairement observée chez des individus d'une quarantaine d'années cette lésion peut parfois présenter des marques de calcification. A ce stade, l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium est primordiale pour éviter d'éventuelles complications. Toutefois, le volume de la lésion peut déjà devenir assez important, et influer ainsi sur le diamètre de la lumière artérielle et donc sur l'adaptation du débit artériel lors d'efforts notamment.

Le stade ultime d'évolution de la plaque, appelé lésion complexe, est associé à de graves complications cliniques. Les contraintes mécaniques du flux sanguin et les facteurs secrétés vont ainsi influencer la stabilité de la plaque. La rupture du revêtement endothélial de la plaque entraîne la formation d'un thrombus. Celui-ci peut alors être à l'origine d'une occlusion partielle ou totale de la lumière artérielle provoquant ainsi une ischémie ou une embolie.
La stabilité de la plaque est fonction de divers facteurs extrinsèques et intrinsèques. En effet, il a été montré que les contraintes mécaniques que

peuvent exercer les flux hémodynamiques ou la composition de la plaque sont largement impliquées dans cette stabilité. Ainsi, une plaque riche en macrophages spumeux et en lipides extracellulaires se révèle être beaucoup plus fragile qu'une plaque majoritairement fibreuse. De même, comme nous le verrons ultérieurement le contexte inflammatoire et la phagocytose qui ont lieu au niveau de la plaque jouent également un rôle dans la stabilité de la plaque.

1.3. Physiopathologie : la phase précoce d'athérogenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, le vieillissement des populations, associé à une augmentation des facteurs de risques, mènera immanquablement vers une augmentation de la prévalence de l'athérosclérose.
Les mesures de recommandation en matière de prévention de l'athérosclérose, diffusées auprès de la population, ne se révélant pas complètement efficaces, il est par conséquent essentiel de continuer de développer la prise en charge de la pathologie. Il se révèle donc absolument nécessaire de mieux comprendre les processus impliqués au cours de l'athérogenèse pour en diminuer les conséquences en termes de morbi-mortalité. Ainsi, sur le plan thérapeutique, se focaliser sur la phase initiale de l'athérogenèse, en particulier, permettrait d'intervenir précocement, avant la manifestation de signes cliniques, et lorsque les lésions sont encore réversibles.

Dans l'organisme le transport des lipides est assuré par des assemblages plurimoléculaires hydrosolubles : les lipoprotéines. Elles sont constituées d'un cœur lipidique hydrophobe (esters de cholestérol et triglycérides), recouvert d'une enveloppe de lipides polaires (phospholipides et cholestérol libre) dans laquelle sont ancrées diverses apolipoprotéines. Elles sont subdivisées en plusieurs classes qui différent notamment par leur taille et leur composition lipidique. Ainsi les lipoprotéines les plus légères (VLDL et IDL) sont riches en

triglycérides tandis que les particules plus denses (LDL et HDL) sont plus riches en esters de cholestérol.

A l'origine du déclenchement du processus d'athérogenèse se trouve la pénétration de lipoprotéines dites pro-athérogènes dans l'intima artériel, majoritairement représentées par les LDL (Low Density Lipoprotein). Divers phénomènes peuvent influer sur ce processus de pénétration des lipoprotéines. Une forte concentration plasmatique en LDL, des dysfonctions endothéliales responsables d'une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées de l'endothélium ou encore des lésions endothéliales dues aux forces de cisaillement hémodynamiques ("shear stress") peuvent ainsi y contribuer.
Après pénétration, l'une des apolipoprotéines composant les LDL, l'apoB100 entre alors en contact avec les protéoglycannes de la matrice extracellulaire de l'espace sous-endothélial et forme une interaction électrostatique provoquant ainsi la rétention de ces LDL au niveau de l'intima artériel [6]. Ces LDL vont alors subir diverses transformations telles que des glycations, des oxydations, des lipolyses ou des agrégations qui seront à l'origine de la cascade inflammatoire, élément clé de l'athérogenèse [7].
Ces modifications sont courantes dans le cadre pathologique de l'athérogenèse. En effet, l'athérosclérose est souvent accompagnée, dans le cadre du syndrome métabolique par une glycémie élevée. Cette forte glycémie induit bien évidemment une glycation des protéines plasmatiques mais également des lipoprotéines. De même, l'oxydation des lipoprotéines découle du contexte oxydatif que l'on peut retrouver au sein de la plaque.

Les LDL oxydées vont notamment activer les cellules endothéliales de l'artère. Ces cellules vont alors, d'une part sécréter du M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et du MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) et exprimer à leur surface les protéines d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1). Les deux premières molécules M-CSF et MCP-1 vont entraîner un recrutement des

monocytes circulants au niveau de l'espace sous-endothélial et activer leur différenciation en macrophage tandis que VCAM-1 et ICAM-1 vont eux faciliter l'attachement et la diapédèse de ces monocytes à travers la couche endothéliale artérielle. Une fois les monocytes infiltrés au niveau de l'espace sous-endothélial et différenciés en macrophages ils vont se mettre à sécréter eux-mêmes du M-CSF et MCP-1 amplifiant ainsi leur propre recrutement ainsi que leur différenciation en macrophage [8].
Ces macrophages, exprimant des récepteurs scavengers vont alors internaliser de grandes quantités de LDL modifiées et ceci, sans rétrocontrôle négatif comme il en existe pour les récepteurs aux LDL natifs [9].
Ainsi, les macrophages vont se gorger d'esters de cholestérol et devenir des cellules spumeuses. Ces cellules, sujettes à l'apoptose peuvent alors enrichir le cœur nécrotique des stries lipidiques. Etant incapables de cataboliser ce cholestérol en excès, la capacité des cellules spumeuses à excréter ce cholestérol en excès via le processus d'efflux de cholestérol va se révéler tout à fait primordiale pour la formation de la lésion et donc pour l'évolution de la pathologie.

Plusieurs études permettent de mettre en relief le rôle capital que joue le macrophage dans l'athérogenèse. L'une des études, menée par JD Smith utilise comme modèle animal des souris issues d'un croisement entre des souris dites ostéopétrotiques, mutées au niveau du gène codant pour la protéine M-CSF et des souris prédisposées à développer spontanément l'athérosclérose (souris apoE KO). Le phénotype de ces souris est particulièrement intéressant puisque celles-ci, malgré un taux de cholestérol plasmatique 3 fois supérieur à la normale développent moins de lésions au niveau de l'aorte que des souris contrôle. En effet, l'absence d'activité M-CSF entraîne la quasi absence de monocytes et de macrophages circulants et résidants, empêchant ainsi l'accumulation de cellules spumeuses nécrotiques dérivées des macrophages à l'origine des lésions lipidiques [10].
Une autre étude porte sur une lignée de souris transgéniques pour le récepteur à la toxine diphtérique chez lesquelles on peut obtenir une

ablation conditionnelle des monocytes / macrophages via l'utilisation de toxine diphtérique. L'administration de cette toxine diphtérique aux souris transgéniques confirme les données précédentes montrant qu'une réduction de moitié du nombre de monocytes, entraine une division par deux de l'étendue des lésions chez ces souris [11].
De même, la délétion du récepteur CCR2 de la protéine MCP-1, nécessaire à l'infiltration des monocytes dans l'intima, entraine une diminution robuste de la taille des lésions par rapport à des souris contrôle apoE KO [12].
Et enfin, d'autres études ont ciblé le couple fractalkine / CXR3CR1. La fractalkine est une molécule soluble qui peut se fixer à son récepteur CX3CR1 pour devenir elle-même un récepteur permettant l'adhésion des leucocytes au niveau de la paroi artérielle. Ces études ont démontré que les souris doublement mutées CX3CR1 et apoE présentent une forte réduction du taux de monocytes recrutés entrainant une réduction de la formation des lésions athérosclérotiques par rapport aux souris simplement mutées pour apoE. [13]

Par conséquent, il apparaît très clairement que le macrophage joue un rôle absolument crucial dans la pathogenèse et il semble donc tout à fait pertinent de se focaliser sur ce type cellulaire comme nous l'avons fait pour nos études.

2. Rôles du macrophage dans l'athérosclérose

Les cellules souches hématopoïétiques sont issues de la moelle osseuse, elles se différencient en plusieurs étapes sous l'influence de divers facteurs et cytokines pour ensuite atteindre la circulation sanguine sous la forme de monocytes. A ce stade ils peuvent rester circulants ou bien atteindre certains tissus et se différencier en macrophages résidents (cellules de Kupffer du foie, ostéoclastes du tissu conjonctif etc.). Le terme de macrophage employé dès le début du 19ème siècle trouve son origine des termes grecs *macro* (grand) et *phagein* (manger) qui se basent sur la remarquable capacité

phagocytique du macrophage. Toutefois le rôle du macrophage dans l'athérogenèse est loin de se limiter à cette seule propriété.

2.1. Le rôle du macrophage dans le stress oxydant

Les cellules spumeuses gorgées de cholestérol dérivant des macrophages jouent un rôle essentiel dans l'athérogenèse. Leur formation est en partie due à la captation de lipoprotéines modifiées et surtout de lipoprotéines oxydées. Ainsi le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose.
D'autre part, le stress oxydant se répercute également dans les phénomènes d'apoptose et de prolifération cellulaire, d'agrégation plaquettaire et de transduction du signal. Ce stress oxydant résultant de la production de facteurs pro-oxydants est surtout dû aux cellules endothéliales et les macrophages y ont un rôle limité mais tout de même non négligeable.

2.1.1. L'anion superoxyde

L'un des principaux rôles du macrophage dans le stress oxydant réside dans sa capacité à produire l'anion superoxyde ($O_2^{-\cdot}$). Il a été démontré que cet anion est impliqué dans l'oxydation des lipides et plus particulièrement l'oxydation des LDL, dont on connaît l'implication dans l'athérogenèse [14].
Il faut aussi noter que cet anion est également largement impliqué dans des réactions d'oxydations pouvant être catalysées par diverses enzymes telles que la myéloperoxydase, la ceruloplasmine ou les lipoxygénases et qu'il peut également réagir avec l'oxyde nitrique.

2.1.2. Le complexe NAPDH

La production de l'anion superoxyde est largement dépendante du complexe NADPH oxydase. A l'état basal, les molécules de ce complexe sont localisées dans le cytosol (p47, p67 et Rac1) et au niveau de la membrane plasmique (gp91 et p22). Lors de l'activation du complexe par un signal

intracellulaire tel que celui de la protéine kinase C (PKC) les éléments cytosoliques sont transloqués à la membrane et forment alors le complexe de la NADPH oxydase (nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase) [15]. Ce complexe va alors pouvoir synthétiser l'anion superoxyde à partir du dioxygène extracellulaire.

Outre son action directe d'oxydation des lipoprotéines, l'anion superoxyde, comme toutes les espèces réactives de l'oxygène va être à l'origine d'un stress oxydant cellulaire connu pour moduler l'expression de divers gènes et ainsi altérer diverses fonctions cellulaires telles que les capacités d'adhésion ou de prolifération ce qui contribue à l'évolution de la pathologie.

2.1.3. La myéloperoxydase

Comme nous l'avons évoqué précédemment l'anion superoxyde est à l'origine de la formation du substrat de la myéloperoxydase (MPO). Cette enzyme hémique, la MPO est par ailleurs également secrétée par le macrophage. [16]

L'anion superoxyde, dismuté par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) va former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) nécessaire à la MPO. Cette MPO, va alors amplifier le potentiel oxydant de l'H_2O_2 en le combinant avec du Cl^- plasmatique pour former de l'acide hypochlorique $HOCl^-$, qui va oxyder les LDL de la plaque de manière très efficace [17].

On peut également noter que la myéloperoxydase, secrétée par le macrophage notamment altère aussi la particule d'apoAI en catalysant sa chloration et sa nitration au niveau des résidus tyrosines [18]. Cette réaction diminue les capacités d'efflux de l'apolipoprotéine et se répercute sur la voie de retour inverse du cholestérol médiée par ABCA1 [18].

2.1.4. La céruloplasmine

La céruloplasmine est une glycoprotéine plasmatique riche en cuivre produite par le macrophage [19], notamment en conditions inflammatoires, en présence de TNF-a [20]. L'anion superoxyde est essentiel à la réaction d'oxydation des lipoprotéines par la céruloplasmine puisqu'il permet de réduire ses atomes de cuivre [21]. Ce mécanisme reste encore assez méconnu mais il pourrait faire intervenir une liaison directe entre la céruloplasmine et les LDL, puisqu'il a déjà été démontré l'existence d'une liaison entre la céruloplasmine et les HDL [22].

2.1.5. La 15-lipoxygénase

D'autre part il a également été démontré que la 15-lipoxygénase pouvait être impliquée dans les processus d'oxydation et plus précisément d'oxydation des LDL. Il a ainsi été montré la capacité de cette enzyme à catalyser l'oxydation des LDL in vitro [23] et in vivo [24] mais aucun mécanisme n'a encore été mis en avant à ce jour.

2.1.6. Macrophage et stress oxydant, le rôle du NADPH

Ainsi, il est intéressant de noter que la myéloperoxydase requiert le NAPDH comme co-substrat pour ses réactions de chloration [25]. Or on sait le rôle clé que joue ce complexe NADPH dans la formation initiale de l'anion superoxyde mais également en tant que cofacteur indispensable de la NO synthase.

Il existe ainsi une sorte de limitation des réactions pro-oxydantes via la disponibilité en NADPH.

Enfin, des études ont été menées chez des souris doublement mutées p47 et apoE, pour lesquelles le complexe NADPH est devenu inactif et ont ainsi révélé une forte diminution de la taille des lésions aortiques par rapport à des souris contrôle apoE KO [26] soulignant ainsi le rôle vraiment majeur du NAPDH dans la pathologie d'athérosclérose. Toutefois afin de discriminer

l'implication du NAPDH d'origine macrophagique et du NAPDH provenant d'autres types cellulaires il pourrait être intéressant d'établir des lignées murines mutées pour le complexe NAPDH au niveau du macrophage plus spécifiquement.

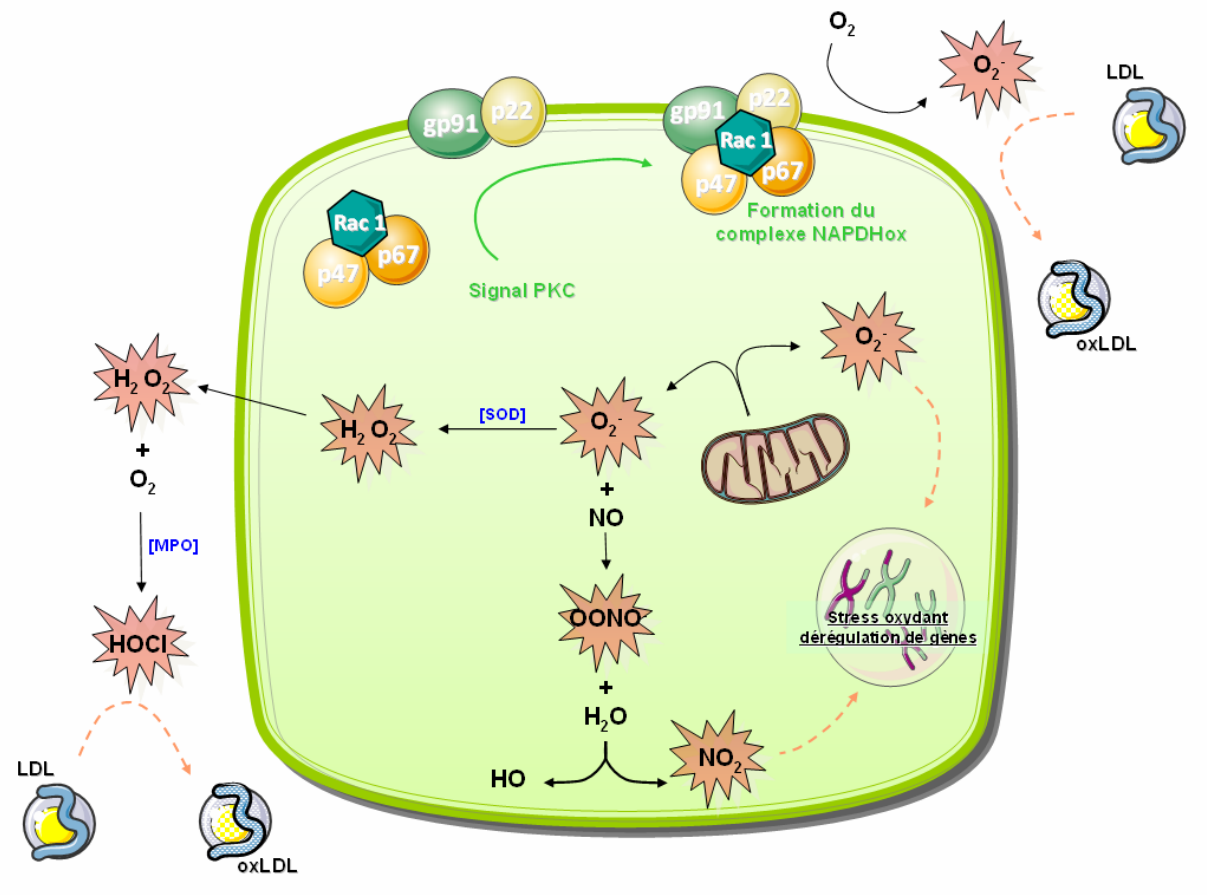


Fig.2 Le stress oxydant au sein du macrophage

2.2. Rôle inflammatoire du macrophage dans l'athérosclérose

Dès 1860, Rudolf Virchow émet l'hypothèse que l'athérosclérose est initiée par un phénomène inflammatoire, les traumatismes de l'endothélium, étant, selon lui la cause directe de l'infiltration lipidique observée lors de l'athérogenèse. C'est ainsi le premier à supporter cette hypothèse qui ne sera vraiment poursuivie que dans les années 70 par Russel Ross, véritable partisan de cette théorie inflammatoire qui fut alors vivement discutée par les partisans de la théorie lipidique [27].

Et, en effet, l'artère subit, notamment, des agressions mécaniques (hypertension), métaboliques (cholestérol et diabète) ou encore toxiques (tabagisme) qui entretiennent un état inflammatoire localisé se traduisant par des phénomènes typiques de l'inflammation tels que le recrutement lympho-monocytaires et la production de cytokines.

Le macrophage joue un rôle clé dans ce processus inflammatoire. Son activation passe notamment par l'activation de ses récepteurs Toll-Like grâce aux LDL oxydées et à la protéine HSP60 (Heat Shock Protein 60) que l'on retrouve au sein de la plaque [28]. La production de TNFa est alors induite. Les lymphocytes T qui jouent également un rôle important dans ce processus inflammatoire vont alors, en concomitance avec la charge lipidique du macrophage activer l'expression de nombreux gènes au niveau du macrophage dont des cytokines, des métalloprotéinases et des facteurs tissulaires qui sont tous impliqués dans l'évolution et la stabilité de la plaque [29].

Il faut noter que les macrophages présentent la particularité d'adapter leur profil selon le contexte inflammatoire institué par les lymphocytes environnants. Ainsi, la présence de cytokines dites pro-inflammatoires telles que INFγ, IL-1β, IL10, TNFa ou TGFβ induit une réponse dite classique entrainant la différenciation du macrophage en macrophage de type M1. A l'inverse, la présence de cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-13) induit la différenciation "alternative" menant à la différenciation des macrophages en macrophages de type M2 [30]. Il existe également une possibilité pour ces macrophages de basculer d'un état M1 à M2 ou vice-versa [31]. Les macrophages de type M1 vont alors sécréter des cytokines pro-inflammatoires (TNFa, IL6 et IL12) tandis qu'à contrario les macrophages de type M2 vont sécréter des cytokines anti-inflammatoires (IL10, TGFβ). Les rôles antiathérogènes des cytokines anti-inflammatoires et proathérogènes des cytokines pro-inflammatoires ont déjà été largement démontré, notamment au niveau de l'activation des cellules endothéliales ou du recrutement des

monocytes et ces résultats soulignent l'implication des macrophages dans l'aspect inflammatoire du processus d'athérogenèse.

D'autre part, il a notamment été démontré que ces cytokines régulaient l'expression des métalloprotéinases également produites par le macrophage et donc sur le remodelage de la matrice extracellulaire. Les cytokines pro-inflammatoires ont notamment, la propriété d'augmenter la sécrétion par le macrophage de certaines métalloprotéinases notamment MMP-1, MMP-8, MMP-9 et MMP-12 [32], augmentant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire et fragilisant inévitablement la plaque [33]. La fragilisation de la plaque est par ailleurs amplifiée par la sécrétion d'INFγ qui inhibe la production de collagène par les cellules musculaires lisses de la plaque. L'activité de ces métalloprotéinases peut être inhibée par les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases de type 1,2 et 3 (TIMP 1,2 et 3) que produisent les macrophages [34].

Enfin, le TNF-a que sécrètent les macrophages pro-inflammatoires entraine une induction de la PAI-1. Cette PAI-1 est un inhibiteur du facteur tissulaire du plasminogène (tPA) connu pour s'associer à la fibrine et favoriser la formation de caillot. Ainsi le TNF-a déstabilise également la plaque par ce mécanisme.

2.3. Macrophages et apoptose dans l'athérosclérose

Comme nous l'avons vu précédemment la plaque d'athérome est constituée de différents types cellulaires parmi lesquels certains peuvent devenir apoptotiques tels les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les macrophages.
Parmi l'ensemble des cellules de la plaque, le macrophage constitue à la fois le type cellulaire prédominant [35] mais également le type cellulaire le plus sensible à l'apoptose que peuvent induire le NO (Oxyde Nitrique) ou les oxystérols [36].

2.3.1. Les caspases

Le phénomène d'apoptose est régi par l'action d'une famille de protéases: les caspases (Cystéine Aspartate Specific ProteASE). Celles-ci, présentes dans le cytoplasme sous forme inactive et alors nommées pro-caspases sont activées par clivage protéolytique. On distingue les caspases initiatrices (2,8,9 et 10) et les caspases effectrices (3,6 et 7) qui diffèrent par leur rôle et par la taille de leur prodomaine. Les caspases initiatrices sont activées par divers signaux pro-apoptotiques que nous allons détailler et les caspases effectrices, sont, elles, responsables du clivage des protéines cellulaires.
Il existe deux grandes voies menant à l'activation de cette voie des caspases: la voie intrinsèque, dite mitochondriale et la voie extrinsèque impliquant les "death-receptors".

2.3.2. La voie mitochondriale

La voie mitochondriale implique un relargage de cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. Ce relargage dont les mécanismes sont encore flous pourrait avoir lieu suite à la formation de mégapores sur la membrane mitochondriale.
Une fois relargué le cytochrome c interagit alors avec la protéine Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) et la pro-caspase 9 cytosolique en présence d'ATP (Adénosine TriPhosphate) pour former un complexe nommé apoptosome. Au sein de ce complexe a alors lieu le clivage de la pro-caspase 9 qui ainsi activée va pouvoir à son tour cliver et activer la caspase 3 appartenant à la catégorie des caspases dites effectrices [37].

2.3.3. La voie des "death receptors"

La voie des "death-receptors" est déclenchée par le signal extrinsèque de la liaison d'un ligand à un récepteur de la superfamille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) tel que la liaison des ligands FAS-L, TNFa (Tumor Necrosis Factor Alpha) ou TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) à leurs

récepteurs FAS, TNF-R et TRAIL-R. Il s'ensuit l'activation d'une cascade de signalisation dépendante du couple ligand-récepteur impliqué qui aboutit à la formation d'un complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) responsable du clivage et de l'activation de la procaspase 8. Celle-ci va alors cliver la procaspase 3 effectrice. Les deux voies d'activation de l'apoptose, extrinsèque et intrinsèque se rejoignent à cette étape où la caspase 3 active la nucléase CAD (Caspase Activated Dnase) chargée de dégrader la chromatine [38].

2.3.4. Régulations de l'apoptose

Il existe un ensemble de protéines régulatrices qui interviennent tout au long de la voie d'activation des caspases. Les protéines clés de cette régulation sont les protéines de la famille Bcl2 (B Cell Lymphoma 2).
Certaines jouent un rôle anti-apoptotiques. C'est le cas des protéines Bcl-2, Bcl-X…Elles agissent notamment en inhibant la formation de pores de transition au niveau de la membrane cytoplasmique et en inhibant certaines caspases activatrices.
D'autres ont une fonction pro-apoptotiques tels que Bax (Bcl2 Associated X), Bak (Bcl2 antagonist Killer), Bid (BH3-Interacting Domain death agonist)…elles agissent notamment en inhibant les facteurs anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et en activant la perméabilisation membranaire de la mitochondrie [39].

Au sein de la plaque, divers phénomènes peuvent être à l'origine de cette apoptose.
Il a ainsi été démontré que les radicaux libres sont nettement impliqués dans les phénomènes apoptotiques. En effet, de par leur effet délétère sur l'intégrité membranaire de la mitochondrie, ils déclenchent un relargage du cytochrome c dans le cytosol événement clé, déclencheur de l'apoptose [40].

Les oxystérols ont eux la propriété de diminuer partiellement l'expression du gène bcl-2 dans des cellules monocytaires de la lignée U937 surexprimant ce gène entraînant ainsi une diminution notable de l'effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose que peut conférer la protéine bcl-2 [41]. Ils ont également la propriété de diminuer le contenu cellulaire en glutathion, peptide connu pour son effet anti-oxydant et donc protecteur vis-à-vis de l'apoptose [42].

D'autre part, a été spécifiquement démontré que le macrophage pouvait devenir apoptotique lors d'une charge en cholestérol libre [43], en présence de LDL oxydées [44] en cas de déprivation de facteurs de croissance [45] ou lors d'une stimulation de la production d'oxyde nitrique soit par activation de la NO synthase soit par action des cytokines [46].

2.3.5. Conséquences de l'apoptose

Suite à ces événements, différentes modifications morphologiques de la cellule vont alors avoir lieu: la formation de protubérances membranaires, une diminution brutale du volume cellulaire, une inversion des feuillets membranaires entraînant une exposition des phosphatidylsérines en surface puis la condensation du noyau et la fragmentation menant immanquablement à la mort cellulaire.

Les conséquences de l'apoptose du macrophage au sein de la plaque sont actuellement très discutées.
En 1995, Ball ne considérait l'apoptose du macrophage que comme une simple étape de la formation du cœur lipidique de la plaque [47]. Mais au cours du temps d'autres notions concernant le caractère protecteur ou délétère de cette apoptose ont vu le jour.

2.3.6. L'apoptose du macrophage, des conséquences multiples

Ainsi comme le résument Kockx et Herman dans leur revue [48], le macrophage assumant des fonctions très diverses au sein de la plaque, son apoptose se répercute à plusieurs niveaux.

Le macrophage est notamment connu pour sécréter des métalloprotéinases qui ont pour fonction principale de dégrader le collagène de la plaque ce qui mène ainsi à une déstabilisation de la plaque. De ce fait, l'apoptose du macrophage mène à une production moindre de métalloprotéinase et ainsi à une réduction significative de la dégradation du collagène. Ainsi l'apoptose du macrophage pourrait stabiliser la plaque et réduire le taux d'accidents vasculaires.

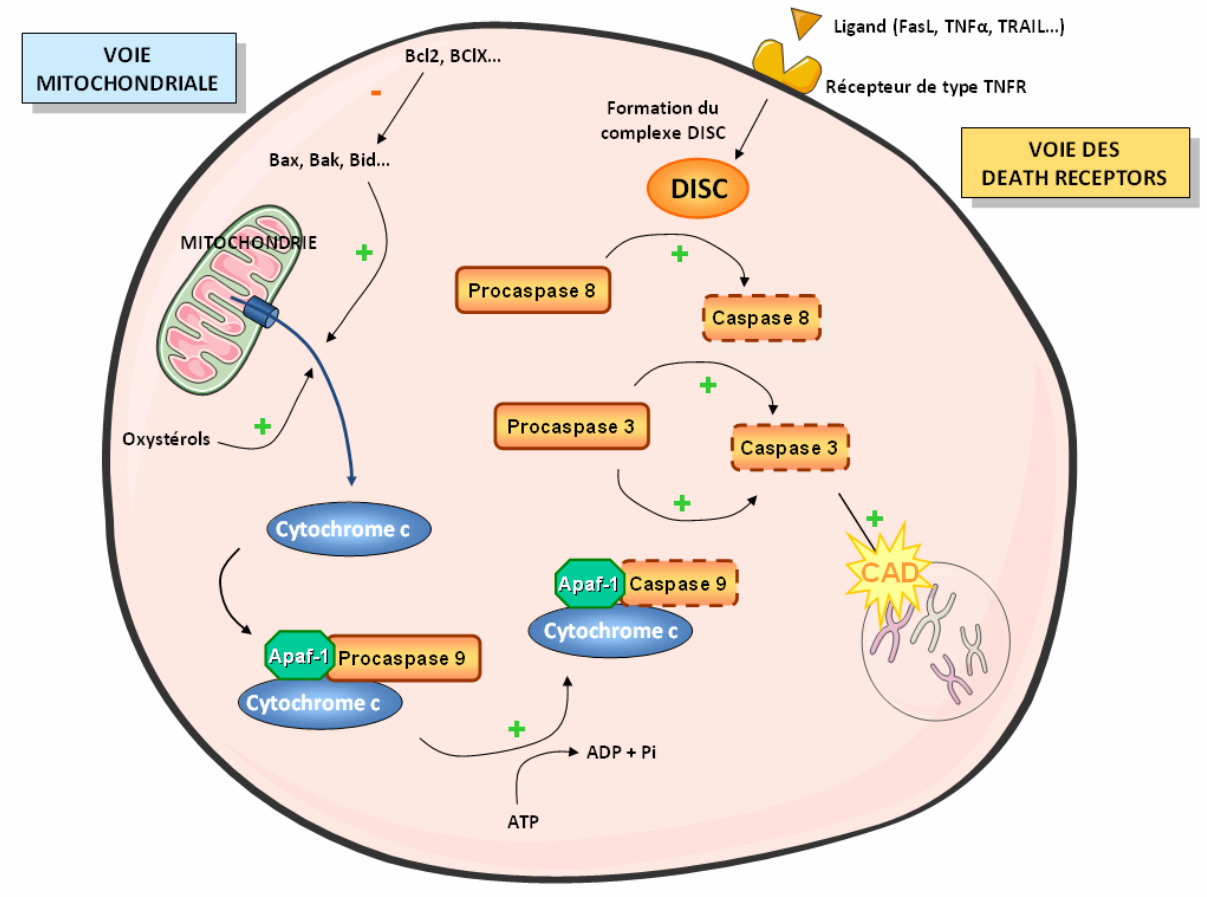


Fig.3 Les deux voies d'apoptose au sein du macrophage

D'autre part, l'apoptose du macrophage mène à une diminution de l'élimination des composés toxiques (oxLDL) et des corps apoptotiques divers de la plaque ce qui serait donc un effet plutôt délétère. En effet, nous verrons dans le prochain paragraphe à quel point ce phénomène de phagocytose est important notamment pour la stabilité de la plaque.

2.4. Phagocytose et athérosclérose

Diverses cellules sont capables de réaliser la phagocytose (les cellules dendritiques, les fibroblastes, les macrophages…). Toutefois les macrophages sont les cellules les plus spécialisées dans cette fonction ce qui leur vaut le nom de phagocytes professionnels. La phagocytose au sein de l'athérosclérose joue un rôle central puisqu'elle permet l'élimination des cellules apoptotiques, limitant ainsi les phénomènes inflammatoires et influant sur la stabilité de la plaque. Ainsi, encore une fois le macrophage joue un rôle majeur dans l'évolution de l'athérogenèse.

L'apoptose en masse qui a lieu au sein de la plaque entraîne une accumulation rapide de macrophages au niveau du site qui permet l'élimination des corps apoptotiques présents au sein de la plaque. Ce chimiotactisme a pu être attribué à la lysophosphatidylcholine que relarguent les cellules apoptotiques [49].

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules devenues apoptotiques subissent divers changements morphologiques. L'expression de diverses molécules au sein de la membrane notamment, va pouvoir servir de signaux de reconnaissance (appelés aussi signaux "eat-me") aux cellules phagocytaires.

2.4.1. Les signaux de reconnaissance "eat-me"

2.4.1.1. La phosphatidylsérine

Le mécanisme le mieux caractérisé actuellement est le signal de reconnaissance de la phosphatidylsérine qui se retrouve exposé lorsque la cellule devient apoptotique. La présence de phosphatidylsérine sur la membrane externe est permanente et résulte de l'action de flippases et de floppases mais elle est toutefois limitée dans le temps et l'espace grâce à l'action d'une translocase chargée du retour des phosphatidylsérines sur la membrane interne chez les cellules viables. Il a été démontré qu'en cas d'apoptose l'activité de cette translocase chutait de manière drastique d'où l'accroissement de la quantité de phosphatidylsérines exposées [50]. Cette phosphatidylsérine peut alors se lier à diverses molécules "intermédiaires" qui permettront sa liaison avec des récepteurs de la cellule phagocytaire.

2.4.1.2. Les autres signaux

Outre la phosphatidylsérine d'autres molécules peuvent servir de signal de reconnaissance. Notamment, ICAM-3, membre de la famille des immunoglobulines que l'on trouve plus spécifiquement sur les lymphocytes B [51], certains sucres tels que le galactose ou le mannose, spécifiques des thymocytes apoptotiques [52].

2.4.2. Les molécules de liaison

Une des premières molécules intermédiaires identifiées fut la beta-2 glycoprotéine (β2GPI). Si la liaison entre cette glycoprotéine plasmatique et la phosphatidylsérine a été clairement démontrée [53], il reste encore à déterminer quel récepteur de la cellule phagocytaire la détecte. Actuellement il a seulement été montré qu'elle n'était pas reconnue par les récepteurs scavengers CD36, CD68 et CD14 de la cellule [54].

Milk Fat Globule-EGF-factor 8 (MFG-E8), secrété par les macrophages activés eux-mêmes, va se fixer sur la phosphatidylsérine de la cellule apoptotique et permettre sa reconnaissance par les intégrines avβ3 du phagocyte [55].
Enfin, s'il avait été envisagé grâce à des tests in vitro que la protéine Gas-6 (Growth Arrest-Specific gene 6) pourrait être impliquée dans la liaison entre le phagocyte et la phosphatidylsérine [56], son mode de fonctionnement n'a été que très peu approfondi.

2.4.3. L'implication controversée d'ABCA1

Ainsi la phosphatidylsérine joue un rôle prépondérant dans ce processus de reconnaissance cellule apoptotique-phagocyte. C'est pourquoi une modification de son expression à la surface de la cellule apoptotique peut avoir de lourdes conséquences sur la phagocytose des cellules apoptotiques. Ainsi, il a été démontré qu'une inhibition partielle ou totale de l'expression de la protéine ABCA1 (ATP-Binding Cassette transporter A1), largement impliquée dans l'efflux cellulaire de cholestérol et de phospholipides, entraîne une forte diminution de la phagocytose des cellules apoptotiques via une réduction de la quantité de phosphatidylsérines exposées soulignant le rôle de translocase que peut jouer abca1 [57]. Toutefois, ces données sont contredites par les études de Williamson qui indiquent que l'absence d'ABCA1 n'influe pas sur la quantité de phosphatidylsérines exposées lors de l'apoptose [58]. On peut par ailleurs noter que les études menées par Tall réfutent également l'implication d'ABCA1 dans les processus de phagocytose, suggérant plutôt un rôle potentiel d'ABCA7 [59].

2.4.4. Les molécules de reconnaissance du phagocyte

2.4.4.1. Les récepteurs scavengers de classe A

Ainsi, les récepteurs scavengers sont largement impliqués dans ce processus. La classe A (SR-A) joue même un rôle majeur puisque son inhibition par un

anticorps anti-SR-A diminue de moitié la phagocytose des thymocytes apoptotiques [60].

2.4.4.2. Les récepteurs scavengers de classe B

Parmi la classe B CD36 et SR-BI jouent tous les deux un rôle dans la liaison à la cellule apoptotique mais actuellement seule l'action de CD36 au sein du macrophage a été démontrée [61][62].
Dès 1995, Ramprasad décrit au sein de macrophages péritonéaux de souris une protéine identique à la macrosialine (et à son homologue humain CD68) pouvant médier la reconnaissance entre le phagocyte et la cellule apoptotique [63]. Cette protéine assure le lien entre le phagocyte et la cellule apoptotique par reconnaissance de la phosphatidylsérine [64]. Toutefois cette hypothèse est réfutée par certains, notamment Fadok dont les études d'inhibition de CD68 n'ont révélé absolument aucun impact sur la reconnaissance des cellules apoptotiques [65].

2.4.4.3. Le récepteur CD14

Le récepteur CD14 a aussi la propriété de lier les cellules apoptotiques. Ce récepteur, initialement connu pour lier en coordination avec TLR4 aux lipolysaccharides (LPS) entraine des réponses distinctes selon le ligand qui s'y lie. En effet, alors que la liaison du LPS va entrainer le relargage de TNFa de la part du macrophage ce n'est pas le cas lors de la liaison de la cellule apoptotique malgré le fait que cette liaison se fasse dans la même région [66].

2.4.4.4. Le récepteur LOX-1

Le récepteur LOX-1 a été initialement identifié comme étant un récepteur permettant la reconnaissance des LDL oxydés au niveau des cellules endothéliales. Toutefois il a été démontré ultérieurement que ce récepteur, également exprimé au sein du macrophage ou des cellules musculaires lisses

peut également médier la reconnaissance des cellules apoptotiques via la reconnaissance des phosphatidylsérines qu'expose la cellule apoptotique [67]. Ainsi il est très intéressant de noter que certaines voies de reconnaissance entre le phagocyte et la cellule apoptotique peuvent entrer en compétition avec la liaison des lipoprotéines environnantes.

2.4.4.5. Les récepteurs à la phosphatidylsérine

Enfin, il existe différents récepteurs à la phosphatidylsérine, le premier fut identifié en 2000 [68] et récemment deux autres ont encore été découverts : Tim4, découvert par Miyanishi et BAI1, découvert par Park [69][70]. La multiplicité de ces récepteurs soulève la question du rôle et de l'implication de chacun qui restent encore à déterminer.

2.4.4.6. Les autres récepteurs

Enfin les récepteurs intégrine avβ3 et Mer se lient également à la phosphatidylsérine mais indirectement en se liant, respectivement, aux molécules intermédiaires MFG-E8 et Gas6. [71].

On notera également l'existence d'une voie plus impliquée dans le processus immunitaire mais que l'on peut retrouver aussi lors de la captation des cellules apoptotique. Il s'agit du phénomène d'opsonisation par lequel les cellules dites présentatrices d'antigènes (lymphocytes, macrophages, cellules dendritique…) vont recouvrir une particule destinée à être phagocytée. Ainsi les cellules apoptotiques peuvent se retrouvées recouvertes par des molécules appelés facteurs du complément (C1q, C3…) et par des anticorps. Ces derniers seront reconnus et phagocyté via la voie de captation par le récepteur Fc.

2.4.5. L'importance du processus de phagocytose

Au niveau des plaques avancées la phagocytose concerne principalement les cellules apoptotiques même s'il est d'ailleurs intéressant de noter qu'au niveau des plaques avancées un net défaut de clairance des cellules apoptotiques a pu être observé. Ainsi, Schrijvers démontre que la majorité des macrophages ne phagocytent qu'une seule cellule apoptotique. Une des causes identifiées de cette diminution de phagocytose est l'existence d'une compétition entre les LDL modifiés et les corps apoptotiques que nous avons déjà évoqué précédemment [72].

Enfin, il faut souligner à quel point ce processus de phagocytose est important dans l'athérogenèse, notamment pour la stabilité de la plaque.

D'une part une diminution de l'élimination des LDL oxydées mène inévitablement à une accumulation de ces LDL, nocive de par leurs effets cytotoxiques notamment sur le recrutement des monocytes ou la vasodilatation des cellules endothéliales.

D'autre part, une insuffisance dans la clairance des cellules apoptotiques peut mener à une nécrose post-apoptotique qui serait à l'origine du relargage de composés toxiques et donc de phénomènes inflammatoires néfastes pouvant déstabiliser la plaque et mener à la formation de thrombus.

Enfin il ne faut pas non plus négliger le fait que les macrophages sont également responsables de la phagocytose de plaquettes et d'érythrocytes qui mènent à une activation pro-inflammatoire du macrophage et donc à une déstabilisation de la plaque.

Ainsi, la phagocytose du macrophage joue un rôle à double facette, à la fois pro-athérogène et antiathérogène qui rend complexe toute interprétation sur ses propriétés.

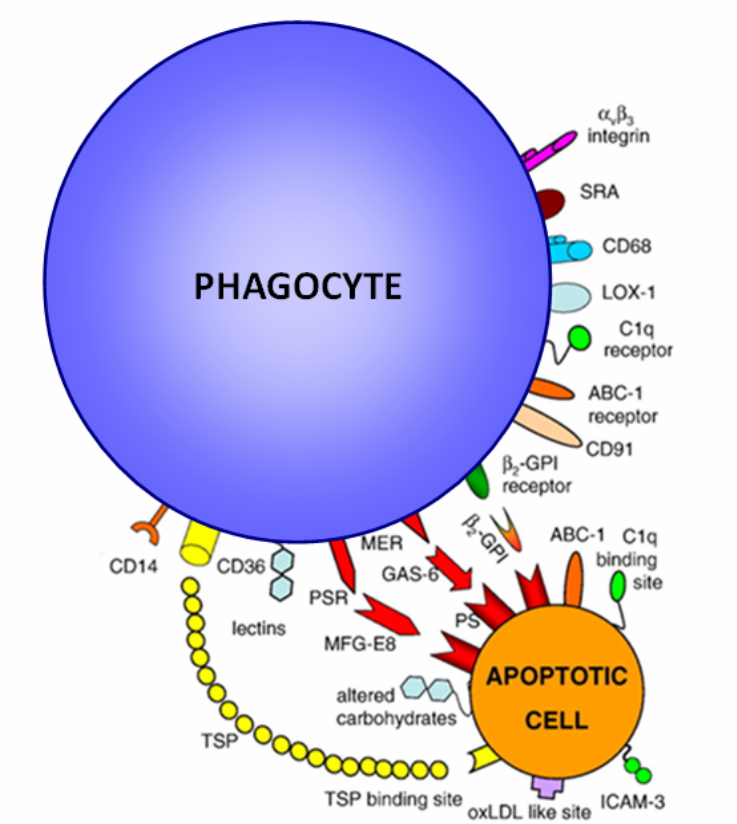


Fig. 4 Récapitulatif des voies impliquées dans la phagocytose des cellules apoptotiques

3. Homéostasie du cholestérol au sein du macrophage

L'homéostasie du cholestérol est absolument cruciale chez l'homme comme le montre l'existence de diverses pathologies liées à un déséquilibre de cet homéostasie (maladie de Tangier, sitostérolémie, xanthomatose…).

En effet, le cholestérol joue un rôle majeur au sein de la cellule, à la fois structural et métabolique. Il existe ainsi, un pool de cholestérol membranaire surtout localisé au niveau de microdomaines nommés rafts où se concentrent lipides et acteurs de transduction de signaux. Ceux-ci peuvent aussi s'invaginer menant alors à la formation de cavéoles impliqués dans la transcytose de diverses molécules. Et on trouve également un pool de cholestérol intracellulaire, jouant un rôle de précurseur de divers composés selon le type cellulaire où il se trouve (acides biliaires dans les hépatocytes,

vitamine D dans les cellules de la peau, synthèse d'hormones stéroïdes dans les tissus stéroidogènes).

Les taux de cholestérol intracellulaire doivent donc être très finement régulés et c'est pour cela que nous avons décidé de nous focaliser sur cette homéostasie et plus particulièrement sur la phase d'efflux de cholestérol qui va se révéler déterminante dans la formation des cellules spumeuses.

Le pool de cholestérol cellulaire a deux origines. La première consiste en la synthèse de novo de cholestérol à partir d'acides gras dégradés en acétyl-CoA par la β-oxydation. Cette réaction est catalysée par l'enzyme HMG-CoA (Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-COenzyme A), dont la synthèse est limitante pour la production finale de cholestérol. Le cholestérol peut également provenir de la captation de lipoprotéines natives ou modifiées par divers récepteurs cellulaires.

3.1. Captation du cholestérol au sein du macrophage

3.1.1. La voie du LDL-R

Pour se transformer en cellule spumeuse le macrophage doit internaliser de très grandes quantités de LDL. Si la captation de cholestérol a pu être constatée visuellement par microscopie dès 1966 [73] il a fallu quelques décennies avant que ces processus ne soient totalement élucidés. La première voie découverte fut celle de la captation de lipoprotéines natives par le récepteur aux LDL (LDL-R). Ce récepteur fixe à la fois l'apolipoprotéine B, présente sur les IDL, les VLDL et surtout les LDL mais également l'apolipoprotéine E que l'on retrouve sur les chylomicrons, les VLDL et les HDL. Ce récepteur, synthétisé dans le réticulum endoplasmique puis maturé dans le Golgi est exprimé en surface. Une fois la lipoprotéine liée au récepteur, le complexe formé est internalisé via un puits à clathrine et forme une endosome. Cet endosome fusionne alors avec un lysosome, ce qui mène d'une part au recyclage du récepteur et d'autre part à l'internalisation du cholestérol. La mutation de ce récepteur entraine l'hypercholestérolémie

familiale, une pathologie particulièrement grave puisqu'elle entraine des complications cardiovasculaires chez les jeunes adultes atteints due à une accumulation accrue de cholestérol plasmatique. Dès 1975, Brown et Goldstein démontrent déjà l'existence d'une régulation négative de l'ARN messager de ce récepteur par le cholestérol lui-même, entraînant une diminution de son expression et donc une diminution de l'internalisation de lipoprotéines [73].

La protéine SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) est ancrée à la membrane de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Elle est associée à la protéine SCAP (SREBP-Cleavage Activating Protein) qui est sensible à la concentration intracellulaire de cholestérol libre. Lorsque la concentration en cholestérol libre de la cellule devient trop faible SREBP est transloqué dans le Golgi où il subit une maturation protéique. Une fois sous sa forme active SREBP quitte l'appareil de Golgi et joue le rôle d'un facteur de transcription en se liant à des SRE (SRE-binding proteins) de divers gènes dont celui du LDL-R et celui de l'HMG-CoA. [74][75]. Ces mécanismes ont pour but de réguler les taux de cholestérol intracellulaire. Ainsi en cas de faible concentration, l'expression de LDL-R est induite menant à une plus grande captation de LDL natives et l'expression d'HMG-CoA est également stimulée, ce qui provoque une augmentation de la synthèse de novo de cholestérol. En cas d'excès de cholestérol ces deux mécanismes sont réprimés. Cette rétrorégulation négative vise à fournir à la cellule la quantité de cholestérol nécessaire à son métabolisme, sans entrainer d'accumulation inutile. Cette régulation fine et contrôlée que l'on retrouve dans les cellules périphériques ne peut donc pas être à l'origine de la formation des cellules spumeuses.

3.1.2. La voie des récepteurs scavengers

Les macrophages eux, captent le cholestérol des lipoprotéines modifiées qui sont très présentes au sein des plaques via les voies des récepteurs scavengers. Ces voies ne sont pas régulées et constituent un phénomène

d'élimination de ces lipoprotéines indispensable. Toutefois, lorsque cette captation devient trop importante, on entre alors dans un contexte pathologique où le macrophage dérivant en cellule spumeuse pourra initier la formation de la strie lipidique.

Ainsi, plusieurs récepteurs permettant la liaison et l'internalisation de lipoprotéines modifiées ont pu être mis en évidence au cours du temps.

3.1.2.1. Les récepteurs scavengers de classe A

Les récepteurs scavengers de classe A type I et II (SR-AI et SR-AII) sont des glycoprotéines transmembranaires homotrimèriques [77]. Le gène, situé sur le chromosome 8 chez l'homme, peut subir un épissage alternatif des exons 10 et 11 ou 8 et 9 menant respectivement à la formation de deux isoformes : SRA-I et SRA-II [78]. Il a même été démontré qu'il existait un troisième isoforme : SRA-III, issu de l'épissage alternatif des exons 8 à 11, toutefois, assez étonnamment, l'expression de cette isoforme réduit l'expression des deux autres, laissant penser que ce rôle de gène dominant négatif pourrait intervenir dans la régulation des récepteurs SRA [79].

Ces récepteurs ont une large spécificité de ligands puisqu'ils peuvent lier des protéines, des polysaccharides, des lipoprotéines et des polynucléotides par des liaisons électrostatiques au niveau d'un cluster de cystéines de la zone carboxy-terminale du récepteur [80].

Les SR-A, comme nous l'avons vu précédemment sont impliqués dans la captation de cellules apoptotiques. Ils interviennent également dans les phénomènes d'adhésion cellulaire puisque la transfection de leur gène dans la lignée HEK293 confère aux cellules un phénotype de cellules adhérentes sur des surfaces auxquelles elle adhère très peu normalement [81].

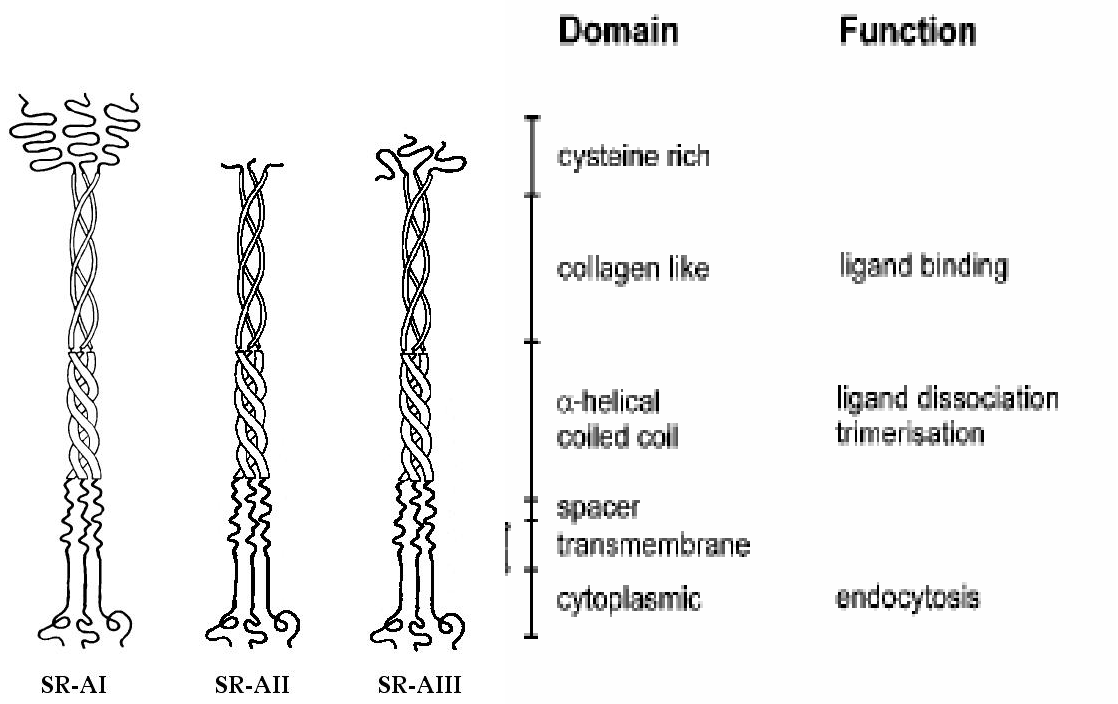


Fig. 5 : Structure et fonctions des différents domaines des récepteurs scavengers de classe A

L'établissement d'une lignée murine mutée pour les récepteurs SR-A a ainsi pu confirmer ce rôle dans l'adhésion cellulaire mais ont aussi révélé une implication de ces récepteurs dans la défense contre les pathogènes. La lignée murine doublement mutée (apoE -/- SRA -/-) développe des lésions athérosclérotique environ deux fois plus petites que la lignée contrôle (apoE -/-) ce qui confirme clairement l'implication de ces récepteurs dans la formation des cellules spumeuses [82] comme l'avaient suggéré les expériences in vitro préalables [83]. Néanmoins, on peut noter que la subsistance de l'accumulation de cellules spumeuses chez les souris doublement mutées soulève l'hypothèse de l'existence d'autres voies potentielles permettant la captation de lipoprotéines modifiées.

En ce qui concerne la régulation des récepteurs SR-A celle-ci semble dépendre en partie de l'état de différentiation du macrophage. En effet, l'utilisation d'esters de phorbol dans la lignée THP-1 et l'utilisation de M-CSF sur

des macrophages humains dérivés de monocytes entraine tous deux une forte induction de l'expression des SR-A [84] [85].
Enfin, les mécanismes de régulation des récepteurs SR-A restent encore assez flous. Toutefois il apparaît assez clairement que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans la régulation de l'expression de SR-AI/II. Ainsi, l'interféron gamma (INF-γ), le TNF-α, et le TGF-β [86] [87] [88] induisent une forte réduction de l'expression. Par conséquent, les conditions pro-inflammatoires présentes au sein de la plaque sembleraient jouer ici un rôle anti-athérogène en diminuant la captation des lipoprotéines et donc la formation de cellules spumeuses.

Les agonistes PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) diminuent également l'expression des récepteurs SR-A. Les dérivés lipidiques issus des lipoprotéines captées vont se lier aux récepteurs PPARγ et ensuite inhiber l'expression du récepteur [89]. Il existe donc un rétrocontrôle négatif qui limite l'accumulation de cholestérol dans les cellules spumeuses d'origine humaine.

Un autre récepteur de la classe A pourrait potentiellement être impliqué dans la captation de lipoprotéines : le récepteur MARCO (MAcrophage Receptor with COllagenous structure). Toutefois son rôle potentiel dans l'athérogenèse a été suggéré de par sa similitude de structure avec les récepteurs SR-A mais il a surtout été étudié pour son rôle dans l'immunité mais et très peu pour son potentiel rôle dans la captation de lipoprotéines.

3.1.2.2. Les scavengers récepteurs de classe B

Le récepteur CD36 aussi appelé GPIV (pour glycoprotéine IV) est un récepteur spécifique des LDL oxydées. Localisé sur le chromosome 7, son gène peut subir l'épissage alternatif et 13 transcrits ont notamment été décrits dans les monocytes circulants [90]. Cette glycoprotéine membranaire, majoritairement localisée au niveau des cavéoles [91] possède une zone

riche en proline avec de nombreuses cystéines impliquées dans la capacité de liaison du récepteur.

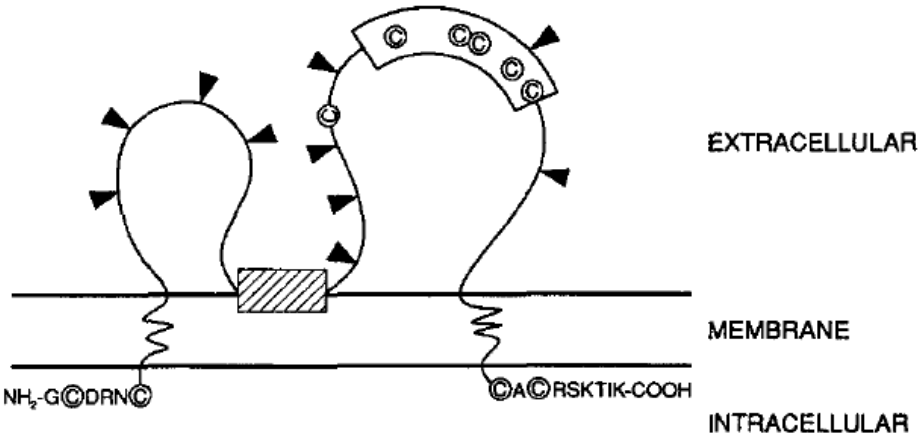


Fig.6 : Structure du récepteur CD36 (Greenwalt Blood 1992)

Outre son implication dans la phagocytose des corps apoptotiques que nous avons déjà mentionné le récepteur CD36 joue d'autres rôles, il est notamment impliqué dans les phénomènes d'agrégation plaquettaire puisqu'il permet l'adhésion au collagène et à la thrombospondine [92][93].
Son rôle dans la captation des LDL oxydées a été découvert en 1993 [94]. Des études complémentaires de transfection cellulaire ont permis de déterminer que le récepteur CD36 est le récepteur ayant le plus d'affinité pour la captation des LDL oxydées contrairement aux récepteurs SRA-I/II qui capte plus facilement les LDL acétylées [95]. Enfin, des études menées sur des souris doublement mutées pour l'apoE et CD36 ont développé des lésions 45 à 75% plus petites que les souris contrôles démontrant le rôle majeur que joue CD36 dans ce phénomène de captation des lipoprotéines modifiées [96]. Toutefois, alors que des études menées in vivo semblent clairement démontrer le rôle majeur de SR-A et CD36 dans les processus de captation [96][97] une étude semble s'opposer complètement à ces données. Ainsi, des travaux menés sur des souris mutées pour apoE, CD36 et SR-A démontrent une augmentation du cholestérol plasmatique et des lésions plus importantes au niveau du sinus

aortique pouvant même étonnamment suggérer un rôle athéroprotecteur des récepteurs scavengers... [98]

La régulation de CD36 suit le même schéma que celui des récepteurs SR-A avec une induction de l'expression lors de la maturation du macrophage et une réduction de l'expression en conditions inflammatoires [99][100].
En revanche, plus étonnamment il a été observé que les agonistes PPARγ induisent l'expression de CD36 contrairement à ce que l'on avait observé pour les récepteurs SR-A [101]. Les études de Moore [102] ont pu mettre en évidence un système de compensation : l'induction de l'expression de CD36 par les agonistes PPARγ s'accompagne d'une diminution compensatoire de SR-A qui pourrait avoir pour but de maintenir les flux de cholestérol. Les récepteurs PPAR sont très exprimés au sein du macrophage, on sait également que de nombreux facteurs peuvent moduler leur expression. Ainsi grâce à ce système le bon fonctionnement du système de captation de cholestérol n'est pas altéré par les divers agonistes des récepteurs PPARs.

3.1.2.3. Les récepteurs scavengers de classe D

CD68 (et son homologue murin macrosialine) sont des protéines transmembranaires qui sont surtout exprimés au niveau du macrophage [103] et que l'on retrouve largement au niveau de la plaque [104].
Malgré l'observation de la liaison entre le récepteur CD68 et les LDL oxydées [105], la faible expression en surface du récepteur laissait un doute sur la pertinence du rôle de CD68. Ainsi, les travaux de Ramprasad ont été déterminants puisqu'ils ont permis de démontrer à la fois la forte induction de la translocation de CD68 en surface lorsque le macrophage est activé mais aussi que l'utilisation d'un anticorps bloquant CD68 pouvait diminuer de 30 à 50% la captation de LDL oxydées, mettant en avant le rôle clé que semble en fait jouer CD68 [105]. La création de lignées murines mutées notamment permettrait vraiment de mieux comprendre le rôle exact de CD68 dans un contexte in vivo. D'autre part, une étude menée en 1997 a pu identifier un

homologue humain de CD68 pouvant également lier les oxLDL mais ces études n'ont jamais été approfondies [106].

3.1.2.4. Les récepteurs scavengers de classe E

Le récepteur LOX-1 a été identifié en 1998. Comme les autres récepteurs scavengers son expression est fortement induite par l'activation du macrophage [106]. Malheureusement sa très forte expression dans les cellules endothéliales fait que la majorité des études ciblent ce type cellulaire délaissant la piste d'un rôle potentiel de LOX-1 dans le macrophage. Quelques études ont tout de même pu démontrer que l'inhibition de l'expression de LOX-1 par la technique des siRNA entraine une forte réduction de l'accumulation de cholestérol dans le macrophage [107]. D'autre part il est intéressant de noter, que contrairement aux précédents récepteurs scavengers, l'expression de LOX-1 est activée par TGF-β [108].

3.1.3. Bilan

Ainsi, les récepteurs permettant la captation des lipoprotéines présentent la particularité d'être multiligands. Pourtant malgré cette polyvalence apparente leur rôle dans la clearance des lipoprotéines n'en est pas moins crucial. On peut aussi souligner le rôle majeur que jouent les différentes cytokines sur leur expression démontrant encore une fois l'importance de l'aspect inflammatoire que l'on trouve dans l'athérosclérose.

3.2. Métabolisme intracellulaire

Une fois internalisées les lipoprotéines vont être dégradées et leur contenu lipidique va transiter via divers compartiments cellulaires avant de rejoindre le pool intracellulaire de cholestérol où il pourra s'engager dans une voie de métabolisation ou de stockage.

3.2.1. De l'internalisation au stockage sous forme de gouttelette lipidique

Juste après internalisation de la lipoprotéine et fusion avec l'endosome précoce le faible pH des endosomes favorise la dissociation des lipoprotéines et de leurs récepteurs.

Au sein du lysosome deux enzymes sont notamment responsables de la dégradation des lipoprotéines: la cathepsin D et la Lipase Acide Lysosomale (LAL). La première d'entre elle va initier et prendre en charge la dégradation de l'apoB100 en synergie avec la cathepsine B [109]. La seconde, la lipase LAL, est responsable de l'hydrolyse des esters de cholestérol et des triglycérides contenus dans la lipoprotéine [110]. On peut par ailleurs noter que les déficits en lipase acide lysosomale sont associés à un phénotype regroupant une surcharge lipidique hépatique et un risque élevé d'athérosclérose notamment.
Par ailleurs, il a été démontré que ces enzymes pourraient être secrétées par le macrophage et ainsi participer à la dégradation in situ des lipoprotéines, menant à la formation des gouttelettes lipidiques extracellulaires que l'on peut observer au niveau des plaques [111].

Une fois sous forme libre une grande partie du cholestérol va rejoindre la membrane plasmique pour y enrichir le pool de cholestérol déjà présent et une petite portion est délivrée au réticulum endoplasmique [112]. Le transport peut se faire par voie vésiculaire ou non vésiculaire mais il est extrêmement complexe et est encore partiellement flou [113].

De même les mécanismes permettant le transfert du cholestérol des lysosomes au réticulum endoplasmique sont encore partiellement inconnus. Toutefois l'implication de la protéine Niemann-Pick a été clairement démontrée notamment grâce aux études menées par Xie sur souris KO pour NPC1 [114]. D'autre part on peut noter l'existence de la maladie de Niemann-

Pick qui se caractérise notamment par l'accumulation de cholestérol libre dans les lysosomes et endosomes tardifs et une synthèse endogène forte pour compenser l'absence de disponibilité du cholestérol.
L'Acyl-CoenzymeA:cholesterol AcylTransférase (ACAT) est l'enzyme clé du stockage du cholestérol intracellulaire. Son action consiste à estérifier le cholestérol en lui transférant un acyl-CoA [115]. Elle se localise dans le réticulum endoplasmique par lequel transite le cholestérol libre issu de la captation des lipoprotéines. Toutefois une étude mentionne tout de même sa présence au sein du réseau trans-golgien dont on sait qu'il est l'un des sites de transition du cholestérol [116]. Son importance dans la formation des cellules spumeuses et l'athérogenèse [117] en a fait une cible thérapeutique, en effet l'utilisation d'inhibiteurs de l'ACAT permet de stimuler l'efflux de cholestérol [118] et permettent de diminuer l'athérogenèse.
L'induction de l'expression de l'ACAT a pu être observée dans certaines conditions, notamment lors de l'activation du macrophage [119] et en présence d'INF-γ [120]. Cela est en corrélation avec l'induction de l'expression des récepteurs scavengers responsables de l'augmentation de la captation de cholestérol au niveau du macrophage qui va entrainer une augmentation du taux de cholestérol à estérifier pour l'ACAT. Au vu des effets toxiques du cholestérol libre on peut en déduire que l'ACAT joue un rôle déterminant dans la protection de la cellule, empêchant son apoptose ou sa nécrose [121].

Cette étape d'estérification est réversible: les esters de cholestérols peuvent être ré-hydrolysés si nécessaire pour être incorporés à la membrane ou efflués.

3.2.2. La ré-hydrolyse des esters de cholestérol

Il faut noter qu'il existe également, une hydrolase : la nCEH (neutral Cholesteryl Ester Hydrolase) qui va ré-hydrolyser les esters de cholestérol directement au niveau des gouttelettes lipidiques. Cette étape est importante puisqu'elle va permettre l'efflux du cholestérol stocké. La nCEH

présente au sein du macrophage a été spécifiquement étudiée puisqu'elle peut jouer un rôle central dans les processus d'athérogenèse. Il a pu ainsi être démontré que la surexpression de la nCEH au sein du macrophage entraine, de par son activité hydrolase, une diminution significative du taux d'esters de cholestérols au sein de la cellule corrélée à une augmentation de l'efflux de cholestérol [122]. D'autre part, il a également été montré qu'en absence d'accepteurs le cholestérol libre est immédiatement ré-estérifié par l'ACAT [123] Enfin, des études ont été menées chez des souris LDL-R KO susceptibles à l'athérogenèse, surexprimant la nCEH spécifiquement au sein du macrophage. Ces études confirment le rôle anti-athérogène de la nCEH puisque ces souris développent des lésions beaucoup moins importantes que les souris contrôle grâce à une stimulation de la voie de retour inverse du cholestérol [124]. Cette enzyme est donc une cible potentielle intéressante dans le cadre pharmacologique.

3.2.3. Le double aspect de la captation du cholestérol

Ainsi, nous venons de voir que le macrophage capte et accumule du cholestérol issu majoritairement de lipoprotéines modifiées. Ce processus est bénéfique dans le sens où il évite que les ces lipoprotéines n'exercent trop longtemps leur effets délétères au sein de la plaque. Ce cholestérol est ensuite stocké au sein de la cellule spumeuse sous forme d'esters de cholestérol permettant ainsi de ne pas subir les effets toxiques que peut jouer le cholestérol libre dans une cellule.

Toutefois il faut garder à l'esprit que cette cellule spumeuse risque fortement de devenir apoptotique, entraînant ainsi un accroissement du cœur nécrotique et de la taille des lésions athérosclérotiques, ce qui dommageable.

Par conséquent, pour que les effets bénéfiques de ce système puissent être optimaux le processus d'efflux du cholestérol en excès des cellules spumeuses vers un accepteur est absolument déterminant. En effet la prise en charge du cholestérol par un accepteur qui le ramène vers le foie où il est éliminé ou

recyclé respectivement sous forme de cholestérol et d'acides biliaires permet de désengorger le site du cholestérol en excès qui joue un rôle absolument néfaste.

3.3. Efflux du cholestérol hors du macrophage

L'efflux de cholestérol constitue la première étape de la voie du transport inverse du cholestérol. Cette voie, qui a été évoquée dès 1968 [125] permet une élimination efficace du cholestérol en excès.
Les HDL naissantes constituent les accepteurs initiaux de cette voie. Leurs propriétés anti-athérogèniques [126] sont maintenant communément admises et cette capacité à promouvoir la voie du transport inverse du cholestérol a suscité un vif intérêt sur le plan thérapeutique.

3.3.1. La diffusion passive

C'est le mécanisme le plus basique qui ait été proposé. Les flux de cholestérol peuvent résulter d'une simple diffusion passive à travers la membrane, selon un gradient de concentration du cholestérol [127]. Cette voie extrêmement minoritaire est sujette à controverse.
Il a tout de même été démontré que l'incubation de cellules en présence de particules HDL entraine un flux net de cholestérol de la cellule vers les HDL via un mouvement de désorption [128]. Selon certaines études la forme de l'accepteur joue un rôle important dans la cinétique du transfert de cholestérol [129].

3.3.2. La voie de sécrétion de l'apoE

L'implication de cette voie dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol est clairement établie puisque les souris KO apoE constituent actuellement le modèle animal le plus utilisé en tant que modèle d'athérosclérose [130].
Cette apolipoprotéine secrétée par le macrophage notamment joue un rôle anti-athérogène de par sa capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol [131]

mais également par ses propriétés anti-inflammatoires, puisqu'elle est capable de moduler l'activité de l'IL-2, diminuant ainsi la prolifération des lymphocytes T et d'inhiber la réponse inflammatoire de type 1 via une modulation de la sécrétion d'IL-12.

L'expression de l'apoE est largement induite lorsque le macrophage est activé [132], en présence de TNF-α [133], ou en présence d'agonistes du récepteur LXR (Liver X Receptor) [134], situation fréquente lors de l'athérogenèse. Plus récemment il a été mis en évidence que la régulation de la sécrétion de l'apoE est dépendante de l'expression du récepteur LDL et donc de l'état de charge de la cellule [135] soulignant la propension de ce système à maintenir l'homéostasie du cholestérol. Les agonistes PPARγ induisent également l'expression de l'apoE [136].

L'apoE se localise majoritairement dans l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les vésicules de sécrétion parmi lesquels il transite pour sa maturation où il est notamment glycosylé [137]. Ces modifications post-transcriptionnelles ne semblent pas affecter la liaison des lipoprotéines à l'apoE même si une étude montre que la sialylation de l'apoE peut favoriser sa liaison aux HDL [138]. Elle est par la suite secrétée via les vésicules de sécrétion sous forme de particules discoïdales [139]. Il faut noter qu'il existe un phénomène de régulation entre les transporteurs ABC et l'apoE. Ainsi, ABCA1 semble contribuer à favoriser la sécrétion de l'apoE. Les patients Tangier atteints d'une mutation d'ABCA1 ont ainsi également un défaut de sécrétion d'apoE [140]. En ce qui concerne la régulation de l'apoE par ABCG1 elle est plus controversée. La délétion d'ABCG1 au niveau du macrophage spécifiquement entraîne une induction de l'expression et de la sécrétion d'apoE [141] alors qu'aucune modification de la sécrétion d'apoE n'est observée dans un modèle de souris KO ABCG1 [142].

3.3.3. Le récepteur scavenger classe B type I (SR-BI)

L'implication de SR-BI (homologue du gène Cla-1 humain) dans les processus d'efflux de cholestérol a notamment pu être démontrée par des expériences

de transfection in vitro [143]. Ce récepteur se localise majoritairement au niveau des cavéoles et des rafts [144], réputés pour leur implication dans les processus d'efflux de cholestérol. SR-BI est également connu pour pouvoir capter le cholestérol, il a ainsi été démontré qu'il existe un flux bidirectionnel et que le ratio influx / efflux dépend en fait du gradient de cholestérol entre le milieu intracellulaire et l'accepteur / donneur [145]. Ainsi, les sous-fractions de LDL n'ont pas la même capacité d'efflux [146].

D'autre part, il a été déterminé que SR-BI requiert la présence de phospholipides pour interagir avec son ligand. Ainsi il est intéressant de voir que malgré le fait que la liaison entre SR-BI et l'apolipoprotéine AI (apoAI) ait été constaté, aucun flux de cholestérol vers cette apolipoprotéine n'est réalisable [143].

Enfin, il a été démontré récemment que SR-BI pourrait jouer un rôle d'inhibiteur de l'efflux de cholestérol médié par ABCA1 [147] et par ABCG1 [148]. Il y aurait ainsi formation d'un cycle futile avec recaptation du cholestérol relargué via les ABC transporteurs par le récepteur SR-BI. L'activation des récepteurs LXR pourrait être une voie qui pourrait "court-circuiter" ce cycle, ABCA1 et ABCG1 étant fortement induit par les agonistes LXR contrairement au récepteur SR-BI. Toutefois ces études ont toutes deux été menées dans des cellules HEK293 surexprimant les transporteurs/récepteurs en question ce qui n'est pas forcément le modèle le plus pertinent au niveau physiologique.

Le rôle de SR-BI a ainsi été largement décrit surtout au niveau des cellules hépatiques toutefois certaines études clés menées sur des modèles murins ont permis d'approfondir les connaissances sur le rôle de SR-BI dans le macrophage.
Ainsi, une étude de transport inverse du cholestérol *in vivo* consistant à suivre le devenir de cholestérol tritié de macrophages de souris contrôle ou SR-BI KO injectés chez des souris contrôles n'a révélé aucune différence au niveau de

la répartition du cholestérol dans les fecès ou le plasma contrairement aux souris ABCA1 KO et ABCG1 KO, suggérant que SR-BI ne jouerait donc aucun rôle dans l'efflux de cholestérol du macrophage *in vivo* [149].
Toutefois, ces résultats peuvent être pondérés par les résultats obtenus en 2004 par Van Eck *et al*. Ces études de transplantation de moelle osseuse ont démontré que l'efflux de cholestérol *in vivo* des macrophages vers les particules HDL est diminué de près de 20% chez les souris transplantées avec de la moelle osseuse de souris SR-BI KO tandis que celui vers l'apoAI n'est pas modulé. Toutefois, les mesures de la taille des lésions au cours du temps révèlent clairement qu'en phase précoce (souris jusqu'à 5 semaines d'âge) la délétion de SR-BI est bénéfique puisque la taille des lésions est inférieure à celles observées chez les souris contrôles. Au-delà, en revanche, la délétion de SR-BI est délétère, la taille des lésions étant beaucoup plus importante chez les souris SR-BI KO que chez les souris contrôles.
Ainsi, SR-BI semblerait jouer un double rôle. De par sa capacité à promouvoir les flux de cholestérol de manière bidirectionnelle selon les gradients de concentration, SR-BI pourrait, en effet, initialement faciliter la formation de lésions en captant le cholestérol environnant, facilitant ainsi la formation de cellules spumeuses. Puis, une fois la cellule gorgée de cholestérol, son expression est réduite et sa fonction se résume principalement en l'efflux de cholestérol vers les particules HDL, jouant alors un rôle clairement anti-athérogène.

Toutefois, si l'implication de SR-BI a été étudiée au sein du macrophage murin le rôle de Cla-1 dans les processus d'efflux dans le macrophage humain n'a jamais été réellement étudié.

Enfin l'efflux de cholestérol est surtout connu pour être médié par deux transporteurs de la famille des ABC transporteurs : ABCA1 et ABCG1 qui jouent un rôle majeur dans ce processus et qui suscitent ces dernières années un véritable engouement scientifique. Nous nous focaliserons sur ces deux transporteurs dans la prochaine partie.

4. Rôle des ATP binding-cassette transporters dans le macrophage

4.1. Caractéristiques

Les ABC transporteurs forment une superfamille de transporteurs subdivisée en sept familles classées de A à G que l'on retrouve chez tous les organismes du monde vivant. On retrouve ainsi près de 50 ABC transporteurs chez l'homme. [150]

Si chez les procaryotes les ABC transporteurs sont principalement impliqués dans l'import de composés essentiels tels que des sucres, des vitamines ou des ions, en revanche, chez les eucaryotes, ils contribuent surtout à l'élimination de divers composés, hors du cytoplasme ou hors des compartiments intracellulaires.

D'autre part, si chaque transporteur a sa spécificité il faut tout de même noter la très large spécificité de substrats de cette superfamille de transporteurs (ions, polysaccharides, acides aminés, lipides, xénobiotiques…).

Les ABC transporteurs présentent un réel intérêt pour la recherche médical et scientifique. En effet, de par leur capacité à éliminer les agents toxiques ils sont impliqués dans les phénomènes de résistance aux traitements médicamenteux et dans les phénomènes de résistances aux antibiotiques des bactéries. Ils sont également largement impliqués dans de nombreuses pathologies (mucoviscidose, maladie de Tangier, sitostérolémie, syndrome de Dubin-Johnson…).

La structure des ABC transporteurs est extrêmement conservée. Ils sont constitués de quatre domaines : deux domaines transmembranaires (TMD) et deux domaines cytoplasmiques (Nucleotide binding domain) ou NBD.

Chaque domaine transmembranaire TMD est constitué de six hélices alpha ancrées dans la membrane plasmique ce qui fait un total de douze hélices par transporteur. Ces domaines sont responsables de la spécificité du substrat.

Les domaines de liaison NBD possèdent trois séquences consensus formant la cassette ABC qui caractérise les transporteurs ABC.
Les domaines walker A et walker B, que l'on retrouve chez tous les transporteurs hydrolysant de l'ATP, espacés de 90 à 120 acides aminés et chargés de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP et le motif signature ABC (LSGGQ), spécifique des ABC transporteurs, situé est juste en amont du domaine walker B.
Il faut noter que cette structure correspond à un transporteur complet mais qu'il existe parmi les ABC transporteurs de nombreux hémitransporteurs, tels qu'ABCG1, qui doivent s'homodimériser ou s'hétérodimériser pour devenir fonctionnels.

En ce qui concerne le mode de fonctionnement des ABC transporteurs il est encore partiellement inconnu. En effet, pour obtenir ces données mécanistiques des analyses après cristallisation sont nécessaires or la cristallisation protéique est un procédé assez complexe et il l'est encore plus pour les ABC transporteurs dont le domaine TMD est très flexible.
Ainsi, les résultats obtenus pour certains ABC transporteurs semblent indiquer que l'interaction du domaine TMD avec le substrat induit un changement de conformation qui est communiqué aux NBD afin qu'ils lient de l'ATP. L'hydrolyse consécutive de l'ATP au niveau des NBD permet alors au transporteur de retrouver sa conformation initiale et de relarguer le substrat.

4.2. Les principaux ABC transporteurs impliqués dans le métabolisme lipidique

4.2.1. Le transporteur ABCA12

La fonction de ce gène n'a été découverte qu'en 2002 [151] et ce transporteur est donc encore relativement inconnu. Découvert de par son implication dans une pathologie létale: l'ichtyose arlequin, il semble impliqué

dans le transport de lipides de l'appareil de Golgi vers la périphérie des kératinocytes mais aucun mode de fonctionnement n'a été mis en avant. Il a tout de même été démontré que l'expression de ce gène pouvait être modulée par les agonistes PPAR et LXR [152].

4.2.2. Le transporteur ABCA7

ABCA7 est le transporteur ABC qui présente le plus d'homologies avec ABCA1 dont on connaît le rôle majeur dans l'homéostasie du cholestérol. Toutefois aucune pathologie n'a pu être reliée à ABCA7. L'établissement de lignées murines KO pour ABCA7 qui pourrait apporter beaucoup d'éléments est sujet à controverse : si selon certaines équipes cette construction s'est révélé létale, selon d'autres elle ne présente pas de phénotype particulier en dehors d'une diminution de 50% du tissu adipeux blanc [153]. D'autre part, il a pu être constaté que la régulation et la localisation d'ABCA7 et ABCA1 sont complètement différentes ce qui peut laisser penser qu'ABCA7 joue un rôle bien distinct d'ABCA1 mais qui reste encore à déterminer plus précisément [154]. Et s'il permet l'efflux de phospholipides vers l'apoAI, en revanche contrairement à ABCA1, ABCA7 ne peut réaliser l'efflux de cholestérol. Récemment il a été démontré qu'ABCA7 pourrait jouer un rôle dans la phagocytose de corps apoptotiques [155-156]. Il a toutefois été démontré qu'ABCA7 pourrait notamment être impliqué dans les processus de régulation de la sécrétion du précurseur amyloïde dans le cerveau [157].

4.2.3. Le transporteur ABCB4

ABCB4 est un transporteur important puisque son absence entraîne de graves pathologies telles que des choléstases ainsi des souris mutées pour ABCB4 ne peuvent plus du tout excréter de phosphatidlycholine dans la bile [158]. Son rôle consiste à transloquer du feuillet interne au feuillet externe les phosphatidlycholines au niveau de la membrane des canalicules biliaires de

l'hépatocyte afin de les transférer aux sels biliaires. ABCB4 est surtout régulé par les sels biliaires [159] mais aussi par les agonistes du récepteur FXR [160].

4.2.4. Le transporteur ABCG4

ABCG4 est très fortement exprimé au niveau cérébral. Il est capable de favoriser l'efflux de cholestérol vers les particules HDL et a donc été proposé comme candidat à l'hétérodimérisation avec ABCG1. De plus, ABCG4 est, tout comme ABCG1 très fortement régulé par les agonistes LXR / RXR. [161] Toutefois les différences d'expression de ces transporteurs au niveau de divers tissus [162] font que cet assemblage doit être relativement mineur. Il faut aussi noter que le fait que des souris ABCG1 KO sous traitement aux agonistes LXR / RXR ne récupère pas le profil d'efflux des cellules wild-type laisse penser qu'ABCG4 semble jouer un rôle tout à fait mineur dans l'efflux de cholestérol au niveau du macrophage [163].

4.2.5. Les transporteurs ABCG5 / ABCG8

La mutation homozygote d'ABCG5 ou ABCG8 entraîne une pathologie : la sitostérolémie caractérisée par une hyperabsorption de stérols (phytostérol et cholestérol) par l'intestin et un défaut d'excrétion de stérols biliaires dans l'hépatocyte menant à une hypercholestérolémie, la formation de xanthome et une athérosclérose précoce [164]. Leurs gènes présentent la grande particularité de se situer sur le même locus en tandem avec un promoteur bidirectionnel [165]. En 2004 l'établissement d'une lignée de souris KO pour ABCG5 et ABCG8 a permis de démontrer que l'administration d'ezetimibe bloquant l'absorption de phytostérol permet de restaurer un phénotype normal [166].

4.2.6. Tableau récapitulatif

Nom	Localisation chromosomique	Expression	Substrats	Pathologies associées
ABCA12 ICR2C	2q34	Peau, placenta, testicules, poumons, estomac, tissus fœtaux	Lipides	Ichtyose arlequin
ABCA7	19p13.3	Cerveau, poumons, macrophages, plaquettes	Phospholipides	
ABCB4 MDR3	7q21.1	Hépatocytes	Lipides	Cholestase
ABCG4	11q23	Cerveau, cœur, thymus, rate	Cholestérol	
ABCG5 / ABCG8	2p21	Intestin, foie	Stérols	Sitostérolémie

4.3. ATP-Binding Cassette A1 : ABCA1

4.3.1. Le gène et sa régulation

Anciennement appelé ABC1 le gène d'ABCA1 fut initialement cloné chez l'homme par une équipe française en 1994, ce gène se trouve sur le chromosome 9 au locus 9q31.1 [167]. En 2000, la séquence complète du gène fut obtenue. Ainsi, il a été déterminé que le gène d'ABCA1 murin est de 100kb tandis que le gène humain est de 149kb. Il est constitué de 50 exons de taille relativement petite et 49 introns dont la taille est beaucoup plus variable.

La comparaison entre les promoteurs humain et murin a révélé une très forte conservation de nombreux motifs suggérant qu'ils jouent un rôle important dans la régulation du gène (SP1, AP-1, SRY/SOX5, NFY et NF-κB). Ces motifs sont connus pour être impliqués dans la régulation de gènes majeurs du métabolisme lipidique tels que LDL-R, CD36, SR-BI [168].

D'autres analyses du promoteur ont également permis l'identification sur le promoteur de 7 domaines SP1, 4 SRE (Sterol Regulatory Elements), et un îlot CpG [169]. L'analyse des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) a aussi pu apporter certains renseignements : Notamment le SNPs R219K de la région codante d'ABCA1 a pu être associé à une modification des taux plasmatiques de lipides, à savoir une augmentation du taux de HDL et une diminution du taux de triglycérides, ceci étant corrélé à une diminution de l'athérosclérose [170] tandis que d'autres études montrent une corrélation avec de haut risques cardiovasculaires mais sans variation du profil lipidique plasmatique [171].

Les récepteurs LXR et RXR sont très largement impliqués dans la régulation du gène d'ABCA1 [172-173]. Ils peuvent être directement activés par leur ligands, des oxystérols tels que le 22(R)-hydroxycholestérol, le 24(S)-hydroxycholestérol ou encore le 24,25-epoxycholestérol [174] ou bien indirectement comme il l'a été observé dans des macrophages humains dérivés de monocytes via une activation des récepteurs PPARα et PPARγ qui vont à leur tour activer les récepteurs LXRα [175]. Il a par ailleurs été identifié dans le gène humain d'ABCA1 l'existence d'un promoteur interne d'ABCA1 contenant des éléments de réponse aux agonistes LXR fonctionnels in vivo [176]. D'autre part il est intéressant de noter que dans le macrophage murin les régulations par les agonistes PPARs diffèrent. Ainsi, les agonistes PPARs n'induisent pas l'expression d'ABCA1, et ce, malgré une induction de l'expression de LXRα via PPARα [177] Il faut donc souligner qu'il existe une très forte différence entre macrophage humain et murin en ce qui concerne la régulation par les agonistes PPARs. Cette différence se fait sur trois niveaux. Les taux d'expression de chacun de

ces récepteurs nucléaires au sein des macrophages mais aussi les taux d'expression de leur corépresseurs / coactivateurs et enfin il existe aussi une variation au niveau des promoteurs de ces gènes et donc de leur régulation [178].

Il a également été démontré que SREBP pouvait diminuer l'activité du promoteur ABCA1 diminuant ainsi par la même occasion l'efflux de cholestérol que gère ABCA1. Nous avons vu précédemment l'implication de SREBP à favoriser l'augmentation des taux intracellulaires de cholestérol, ce mécanisme va également dans le sens de l'augmentation des taux intracellulaires de cholestérol.

Il existe également une autre voie majeure d'activation de l'expression d'ABCA1 qui, n'existe que chez les modèles murins : l'activation par l'AMPc [179]. Il a été démontré que la stimulation de l'expression du gène ABCA1 murin par l'AMPc requiert la présence de deux éléments de réponse localisés dans l'intron 1 du gène : un élément de liaison pour le facteur de transcription CREB et un élément de liaison pour les facteurs de transcription STAT3/4. Ainsi l'absence de l'élément de réponse CREB dans le gène ABCA1 humain, alors que celui pour STAT3/4 est conservé, explique que l'AMPc ne soit pas en mesure d'induire l'expression du gène ABCA1 chez l'homme [180]. Il a également été démontré que l'expression d'ABCA1 pouvait être réprimée notamment par le répresseur transcriptionnel qu'est la protéine aux doigts de zinc ZNF202 [181] ou induit par le vérapamil qui bloque les canaux calcium [182].

Enfin, de nombreuses études ont pu mettre en avant l'impact de cytokines pro et anti-inflammatoires sur l'expression d'ABCA1. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires semblent diminuer nettement l'expression d'ABCA1 au sein du macrophage comme le montre les résultats obtenus avec INFγ [183], Il-1 [184-185] ou TNFα [186]. D'autre part les cytokines anti-inflammatoires, à l'inverse induisent l'expression d'ABCA1, que ce soit IL-10 [187] ou TGFβ [188].

4.3.2. La protéine ABCA1

La protéine codée par le gène ABCA1 porte aussi le nom de CERP (Cholesterol Efflux Regulatory Protein) de par son activité clé dans les processus d'efflux de cholestérol.

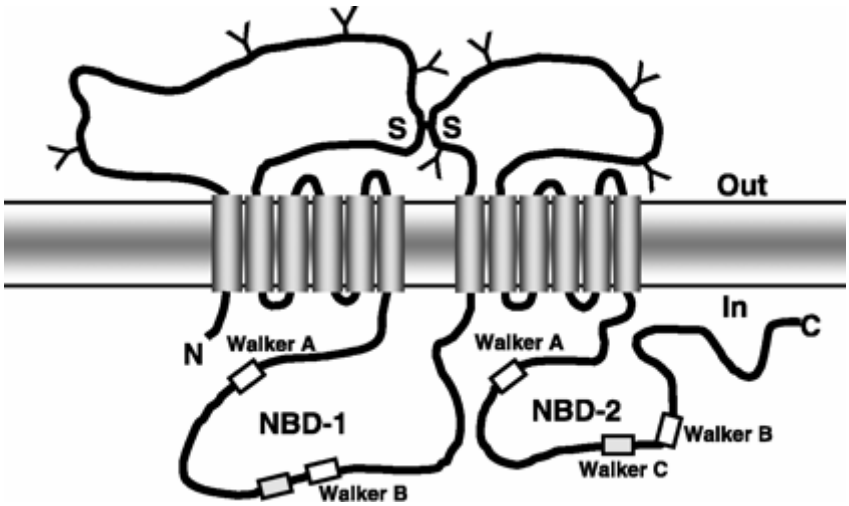


Fig. 7 Structure d'ABCA1 (d'après Oram)

ABCA1 est exprimé de manière ubiquitaire. Toutefois il est beaucoup plus exprimé dans certains tissus : le placenta, les poumons, les glandes surrénales, l'intestin, les tissus fœtaux et surtout le foie et les macrophages [167;189]. ABCA1 est une protéine qui a une demi-vie plutôt courte d'environ 2h [190], cette instabilité protéique est due à un motif PEST (Proline Glutamate Serine Thréonine) au niveau d'une boucle intracellulaire dont la phosphorylation entraîne la dégradation immédiate de la protéine par le protéasome. Toutefois, il a été démontré dans des macrophages péritonéaux que la liaison de l'apoAI avec ABCA1 permet de largement améliorer la stabilisation de la protéine. Cette stabilisation se fait via une dégradation de la calpaïne, protéase impliquée dans la dégradation d'ABCA1 par le protéasome [191].

ABCA1 peut également être stabilisé via une phosphorylation de sa protéine. Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment l'AMPc a la capacité d'induire

l'expression d'ABCA1 chez la souris mais pas chez l'homme, de par l'absence du site CREB dans le gène humain. Toutefois l'AMPc n'est pas sans effet chez l'homme. Il a en effet été démontré que dans des fibroblastes l'AMPc induit la phosphorylation d'ABCA1 permettant ainsi sa stabilisation. De plus, lorsque des fibroblastes issus de patients Tangier portant une mutation au niveau du gène ABCA1 qui affecte son interaction avec l'apoAI sont utilisés, l'AMPc ne peut pas induire la stabilisation de la protéine ABCA1; laissant ainsi penser que la présence d'apoAI pourrait être nécessaire à cette phosphorylation [192].

Il est également intéressant de noter qu'ABCA1 est fortement exprimé au niveau des membranes basolatérales de diverses cellules telles que des cellules intestinales [193], les hépatocytes [194] suggérant une possible existence de facteurs ciblant ABCA1 et l'adressant spécifiquement à certaines membranes de cellules polarisées.

Des études ont également pu mettre en avant que l'inhibition de la synthèse protéique, aussi bien que le blocage du transport protéique au niveau du réticulum-Golgi ou encore au niveau des endosomes tardifs se répercute sur l'efflux vers l'apoAI et souligne donc l'importance du transport d'ABCA1 au niveau vésiculaire [194].

En effet l'inhibition de toute synthèse protéique par le cycloheximide provoque une réduction notable de l'efflux ce qui permet de dire qu'au cours du temps ABCA1 membranaire est dégradé, et l'efflux de cholestérol requiert alors la synthèse *de novo* et l'apport à la membrane d'ABCA1. De même, la brefeldine, qui entraîne la fusion du Golgi et du réticulum bloquant ainsi la voie de sécrétion protéique, entraîne une diminution de l'efflux indiquant ainsi qu'ABCA1 doit être transloqué du Golgi au reticulum puis à la membrane pour médier l'efflux [194].

4.3.3. Rôle d'ABCA1 dans l'efflux et la formation de cellules spumeuses

La maladie de Tangier est très rare, découverte en 1961 elle touche une cinquantaine de patients à travers le monde et fut à l'origine découverte sur l'île de Tangier, en Virginie, dont elle tient le nom. Actuellement d'autres patients ont été découverts un peu partout à travers le monde. Ces patients développent une athérosclérose précoce, avec un taux de HDL plasmatique quasi nul, et une accumulation de cholestérol dans les tissus périphériques se traduisant notamment par des opacités cornéennes, des amygdales orangées, une hépatomégalie, une splénomégalie ou dans les cas plus avancés une neuropathie. [195-197]. La découverte de cette pathologie due à la mutation d'ABCA1 a initié de nombreuses études destinées à approfondir les connaissances sur ABCA1.

Ainsi, le rôle de ce transporteur dans l'efflux de cholestérol et de phospholipides a été largement étudié. Toutefois, avant la découverte de la maladie de Tangier il avait déjà été démontré qu'ABCA1 joue un rôle absolument crucial dans l'efflux de cholestérol et de phospholipides vers l'apolipoprotéine A1 [198].
Ainsi, Langmann a également démontré que dans des macrophages humains en présence de LDL acétylées l'expression d'ABCA1 est largement induite alors que la présence de particules HDL à l'origine d'une déplétion en cholestérol des cellules diminue son expression confirmant le rôle clé d'ABCA1 dans le métabolisme du cholestérol [199]. D'autre part Favari a montré que la charge en LDL oxydées dans le macrophage entraîne une diminution de l'expression d'ABCA1. Ainsi, si les différents stérols servent de substrats à ABCA1 ils sont également largement responsables de la régulation de son expression. Tous ces résultats ont été confortés par diverses études menées *in vivo*. Ainsi, la surexpression d'ABCA1 entraîne une nette protection dans le développement de l'athérosclérose chez des animaux sous régime hypercholestérolémique [200].

D'autre part, les études menées sur des souris KO ABCA1 démontrent une accumulation de cholestérol dans les tissus et un défaut au niveau du transport des lipides de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmatique démontrant ici le rôle intracellulaire d'ABCA1 [201].
Enfin la délétion spécifique d'ABCA1 au niveau du foie chez la souris s'accompagne d'un taux de HDL réduit de près de 80% rappelant le phénotype des patients de la maladie de Tangier et démontrant l'intérêt d'ABCA1 hépatique [202].

4.3.4. Rôle d'ABCA1 dans la genèse des particules HDL

La délétion tissu-spécifique d'ABCA1 chez la souris a permis de dégager des rôles importants d'ABCA1 pouvant éventuellement soulever de nouvelles pistes thérapeutiques. Ainsi en 2005 et 2006 deux études ont été publiées, visant à déterminer le rôle d'ABCA1 au sein de l'intestin et au sein du foie, connus pour être le siège de la synthèse d'apoAI. Ainsi le modèle murin invalidé pour ABCA1 au niveau de l'intestin a permis de démontrer qu'ABCA1 est largement impliqué dans l'efflux de cholestérol au niveau de la membrane basolatérale, étant responsable de la genèse de près de 30% du pool de HDL. Ainsi, l'absence d'ABCA1 résulte en une diminution indirecte de l'apport de cholestérol aux particules HDL et par conséquent en une forte réduction du taux de HDL plasmatique, parallèlement à cela, le cholestérol, non éliminé s'accumule alors au sein des cellules. Ainsi l'expression d'ABCA1 au niveau de l'intestin est cruciale pour le maintien des taux de HDL plasmatiques [203]. En ce qui concerne le rôle d'ABCA1 au niveau hépatique, sa délétion entraîne une réduction de près de 80% du pool de cholestérol plasmatique et une dégradation de l'apoAI non enrichie en cholestérol par ABCA1, révélant ainsi le rôle majeur d'ABCA1 hépatique. Ainsi, s'il était connu que le foie est la source majeure de HDL cette étude a permis de démontrer qu'ABCA1 est responsable du maintien de ce pool de HDL via sa capacité à lipider les particules d'apoAI menant ainsi à la formation des HDL naissantes [204].

D'autre part, il a été montré qu'au sein d'îlots bêta du pancréas humain, siège de la production de l'insuline, l'absence d'ABCA1 entraîne une accumulation de cholestérol qui se répercute sur la sécrétion d'insuline qui se trouve alors sévèrement diminuée.

Ceci pourrait suggérer que l'accumulation de cholestérol pourrait ainsi être un des facteurs responsables de la dysfonction cellulaire des îlots bêta. D'autre part, l'utilisation des thiazolidinediones dans le traitement du diabète a été démontré comme ayant des effets bénéfiques sur la masse des cellules bêta, leur fonctionnalité, mais aussi sur leur contenu lipidique. Ces molécules étant des agonistes des récepteurs PPARγ il est ainsi envisageable que leur effet se fasse notamment via l'activation d'ABCA1 [205].

En dehors de ce rôle de médiateur du transport de cholestérol et de phospholipides ABCA1 a été montré comme étant capable de médier le transport de α-tocophérol [206], d'interleukine [207] et d'anions [208] mais ces propriétés n'ont pas été réellement approfondies.

D'autres fonctions que celle de transporteur ont également été attribuées à ABCA1. Ainsi, il a été suggéré qu'ABCA1 pourrait jouer un rôle dans l'apoptose cellulaire puisqu'il a été montré qu'il est très souvent associé au "death receptor" FADD et que bloquer cette interaction diminue l'efflux de phospholipides vers l'apoAI. ABCA1 semblerait aussi être impliqué dans le processus de phagocytose. En effet il a été montré que les souris ABCA1 KO montrent deux fois moins de phagocytose de cellules apoptotiques que des souris contrôles [209], de même l'utilisation d'un anticorps anti-ABCA1 réduit très fortement la capacité phagocytaire des macrophages [210]. Et si notamment, l'hypothèse de l'implication d'ABCA1 dans un réarrangement lipidique membranaire a été avancée [211] le rôle même d'ABCA1 dans la phagocytose reste encore discuté. Ainsi, des études menées sur des fibroblastes de patients Tangier [212], ou dans des macrophages murins

péritonéaux transfectés par des siRNA ciblant ABCA1 [213] ne présentent étonnamment aucune réduction de leur capacité de phagocytose.

4.3.5. Mécanisme de fonctionnement d'ABCA1

ABCA1 permet donc le transport de cholestérol et de phospholipides vers l'apoAI. De part, son appartenance à la famille des ABC transporteurs ABCA1 pourrait former un canal dans la membrane permettant ainsi le transfert de lipides de la couche interne à la couche externe via l'hydrolyse d'ATP.
Actuellement deux mécanismes ont été proposés. D'une part, le cholestérol libre, notamment issu de l'hydrolyse des esters de cholestérol stockés dans la cellule pourrait être complexé avec des phospholipides au sein de l'appareil de Golgi pour former des vésicules qui seraient alors transloquées à ABCA1 au niveau de la membrane. Les lipides traverseraient alors la membrane pour interagir avec l'apolipoprotéine et former une particule HDL. L'autre hypothèse correspond plus à un mécanisme de rétroendocytose où dans ce cas l'apolipoprotéine interagit avec ABCA1, est internalisée et l'ensemble interagit alors avec des vésicules de lipides formés dans le cytoplasme. Le complexe apolipoprotéine / cholestérol ou phospholipides peut alors être relargué [214].

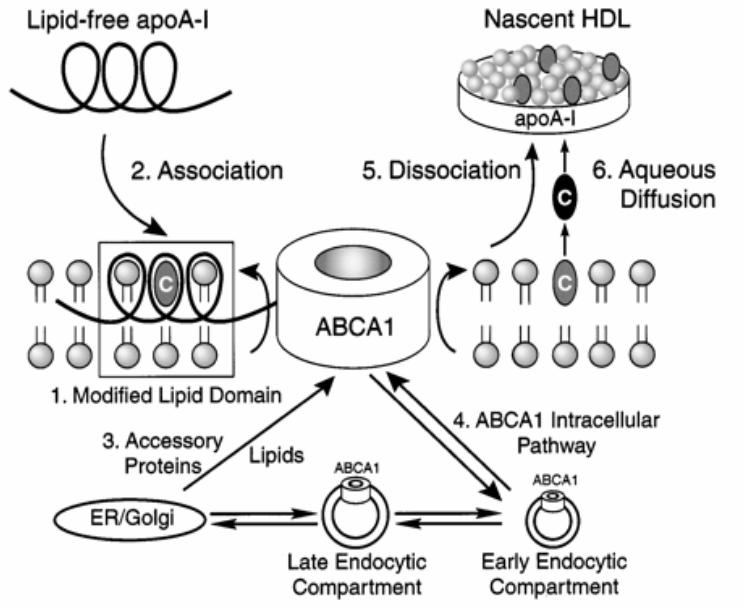


Fig. 8 Mécanismes d'efflux de cholestérol via ABCA1 (D'après Santamarina-Fojo)

Aucune analyse structurale d'ABCA1 n'ayant été menée on ne peut qu'extrapoler à ABCA1 les mécanismes découverts dans d'autres transporteurs ABC comme nous l'avons vu précédemment.

4.4. ATP-Binding Cassette G1 : ABCG1

En 1997, Croop isola dans des lignées cellulaires humaine et murine un homologue du gène white de drosophile. Les protéines codées par les gènes humains et murins montrent plus de 55% d'homologie avec celle codée par le gène white de drosophile et plus de 97% d'homologie entre elles. La protéine white, qui appartient à la superfamille des transporteurs ABC est connue pour son implication dans la coloration des yeux de drosophile. Après dimérisation avec un autre ABC transporteur tels que Brown ou Scarlet il permet la captation de précurseurs: la guanine et le tryptophane qui sont nécessaires à la synthèse des pigments de l'œil. Chez l'homme on sait que le tryptophane est un précurseur de la sérotonine et de la kynurénine, tous deux impliqués dans les troubles neurologiques (neurodégénérescence, dépressions…). Ces études préliminaires ont également permis de déterminer que cette protéine est fortement exprimée dans le cerveau et que son gène est localisé au niveau du chromosome 21 sur le locus 21q22.3, dans une région très impliquée dans les troubles neurologiques (surdité, troubles bipolaires…). Ainsi, à cette époque, l'homologue du gène white de la drosophile, qui n'est autre qu'ABCG1, représentait surtout un excellent gène candidat pour ces troubles neurologiques [215].

4.4.1. Le gène et sa régulation

Le gène humain d'ABCG1 de 98kb, est constitué de 23 exons et se localise sur le chromosome 21 (21q22.3). Différents transcrits, issus d'épissages alternatifs ont pu être obtenus dans différent types cellulaires. Chez l'homme les exons 11 à 23 sont communs à tous les transcrits qui diffèrent par conséquent au niveau de la zone amino-terminale, le transcrit majeur étant celui constitué

des exons 5 et 7. On retrouve le même type de configuration chez la souris avec la présence chez tous les transcrits des exons 3 à 15 et l'existence d'un transcrit majeur composé en partie amino-terminale des exons 1 et 2 [216-218].

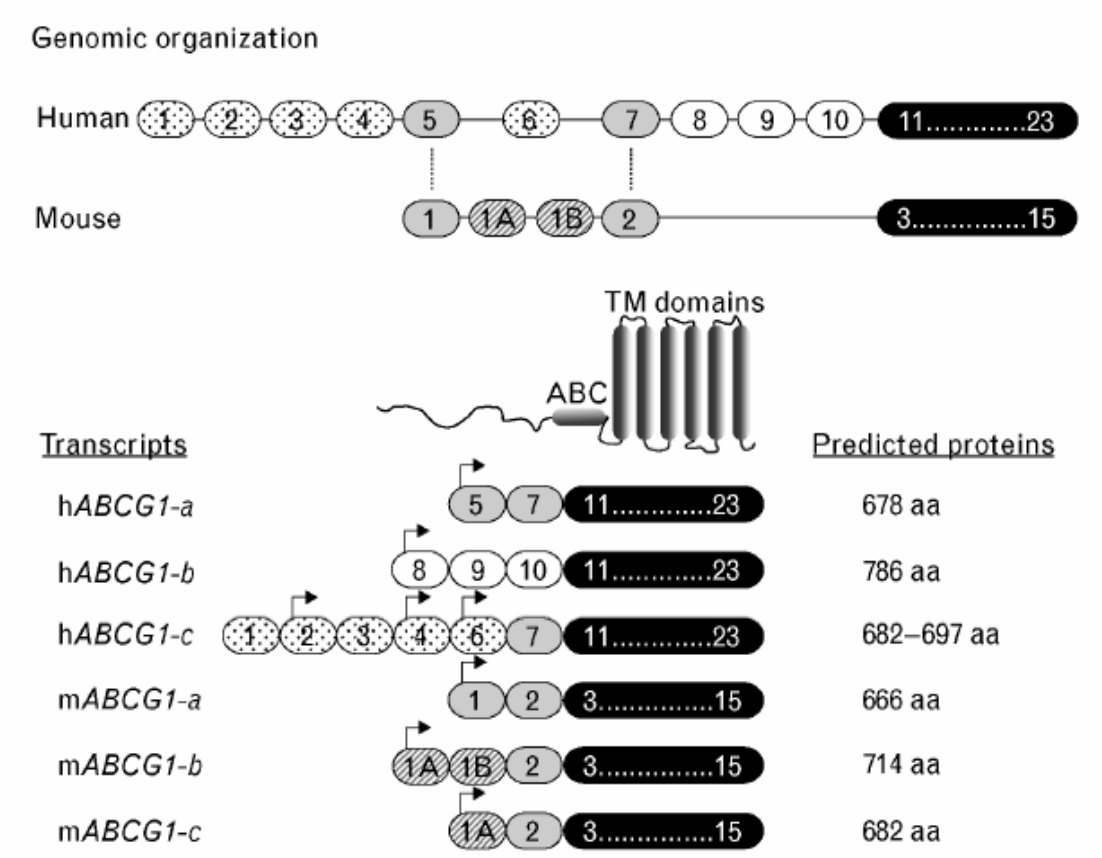


Fig. 9 Structure du gène d'ABCG1 (d'après Baldan)

Les analyses du gène ont permis l'identification de sites de liaison à NF-κB, à PPAR, à RXR et à LXR [219-220]. Il a effectivement pu être constaté que les oxystérols induisent fortement l'expression d'ABCG1 et cet effet a pu être attribué à un effet transcriptionnel des oxystérols sur ABCG1 via l'activation des récepteurs LXR/RXR. En effet, il est impossible d'activer ABCG1 par des oxystérols dans des macrophages mutés pour les récepteurs LXR [221]. En ce qui concerne les agonistes PPARγ il a été démontré chez la souris que leur capacité à induire l'expression d'ABCG1 se fait indirectement via l'activation des récepteurs LXR [222].

D'autre part, il a été plusieurs fois mis en évidence que l'expression d'ABCG1 est fortement induite lors de la différenciation du monocyte en macrophage [223-224] ou lors de la transformation du macrophage en cellule spumeuse, consécutive à une forte charge en cholestérol du macrophage [219;221;223]. Inversement, il a aussi été démontré que la diminution de la charge en cholestérol du macrophage entraîne une diminution de l'expression d'ABCG1 [223].

Ainsi, la régulation de l'expression d'ABCG1 dépend largement de la charge en cholestérol ou en oxystérols de la cellule ce qui vise en fait à favoriser l'efflux de cholestérol et donc à ralentir la formation des cellules spumeuses.
Toutefois contrairement à ABCA1 dont il avait été démontré qu'il était largement induit par le LPS, ABCG1 semble ne pas répondre pas au contexte inflammatoire qu'induit le LPS [225] ou alors très faiblement [226]. D'autre part, il apparaît clairement que les cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα [184;227] ou IL-1 [184] induisent une réduction de l'expression d'ABCG1 alors qu'à contrario, l'IL-10 anti-inflammatoire induit son expression [186].

4.4.2. La protéine ABCG1

La protéine ABCG1 étant un hémi-transporteur, elle doit se dimériser pour remplir ses fonctions. Il a ainsi été suggéré qu'elle pourrait notamment s'hétérodimériser avec ABCG4 [228] ou bien même s'homodimériser [229]. Ce phénomène serait manifestement largement dépendant du niveau d'expression du partenaire dans un tissu donné. Ainsi, il a été montré qu'ABCG1 s'hétérodimerise avec ABCG4 dans le cerveau ou ce dernier est largement exprimé tandis que dans le macrophage où ABCG1 est majoritaire il s'homodimèrise pour former un transporteur complet permettant ainsi l'efflux de cholestérol.

ABCG1 est majoritairement exprimé au niveau du cerveau, des poumons, des glandes surrénales et des macrophages [223]. Il a été démontré dès 2001

par microscopie qu'il y avait une très forte expression d'ABCG1 au niveau des cellules spumeuses et plus précisément au niveau de la surface cellulaire et des structures périnucléaires. Cette même étude a permis de constater que les macrophages issus de patients Tangier expriment plus fortement ABCG1, laissant penser à une possible compensation d'ABCA1 par ABCG1 toutefois inefficace aux vues des conséquences physiologiques de la mutation d'ABCA1 chez ces patients [217]. D'autre part il a été suggéré la possibilité que les agonistes LXR provoqueraient, en plus de l'activation transcriptionnelle que nous avons évoqué précédemment une mobilisation du transporteur ABCG1 intracellulaire pour qu'il soit transloqué à la membrane [230]. Toutefois ces résultats furent l'objet de vives controverses. Certains pensant notamment que cette observation de translocation à la membrane ne correspondait qu'à un simple processus de maturation protéique Ainsi, si ce procédé était confirmé l'induction de l'expression et l'induction de la translocation à la membrane permettrait de potentialiser l'effet d'ABCG1.

4.4.3. Le rôle d'ABCG1 dans athérogenèse

Ce n'est que trois ans après les travaux initiaux de Croop, en 2000, que l'équipe de Klucken mit en évidence qu'ABCG1 (homologue du gène ABC8 murin) est clairement impliqué dans la régulation du transport du cholestérol au sein du macrophage. Le gène fut initialement identifié par sa régulation étroitement liée à la charge en cholestérol du macrophage. Ainsi, le fait que la charge en cholestérol induise son expression et que l'efflux de cholestérol entraîne une diminution de son expression ont fait d'ABCG1 un candidat potentiel pour la régulation de l'efflux de cholestérol. Et en effet, les travaux d'inhibition de l'expression d'ABCG1 par des oligonucléotides antisens au sein du macrophage ont démontré une réduction partielle de l'efflux de cholestérol [223]. Ultérieurement les études de surexpression d'ABCG1 dans des cellules HEK ont clairement démontré une augmentation spécifique de l'efflux de cholestérol vers les particules HDL Cet efflux se fait plus

particulièrement vers les particules HDL2 et HDL3, et même étonnamment sur les LDL mais pas sur l'apoAI [231-232].

Une première étude in vivo menée par Kennedy sur une lignée de souris ABCG1 KO en 2005 montre que les jeunes souris mutées pour ABCG1 ont un phénotype comparable aux souris wild-type sous un régime alimentaire normal. En revanche, lorsque les souris deviennent plus vieilles (15 à 25 semaines) elles montrent une très forte accumulation de lipides neutres et de lymphocytes au niveau de leurs poumons. L'administration d'un régime gras amplifie ce phénomène. Cela est assez cohérent avec la forte expression d'ABCG1 qui avait pu être observé précédemment au niveau pulmonaire. D'autre part, l'observation d'accumulations massives de cholestérol dans les macrophages et dans les hépatocytes lorsque les souris ABCG1 KO sont soumises à un régime riche en cholestérol et en graisses renforce l'hypothèse du rôle crucial d'ABCG1 dans l'homéostasie du cholestérol dans ces tissus.

En 2005-2006 trois études ont été publiées sur des souris susceptibles à l'athérosclérose (apoE KO ou LDL-R KO) ayant été transplantées par des cellules de moelle osseuse de souris ABCG1 KO. Ces études présentent l'avantage de cibler plus spécifiquement le rôle d'ABCG1 dans les cellules hématopoïétiques uniquement et permet de s'affranchir des effets périphériques. Toutefois ces études qui visent à priori à étudier le rôle d'ABCG1 surtout au niveau du macrophage présentent alors le biais d'avoir les autres cellules issues de la moelle osseuse également invalidées pour l'expression d'ABCG1 (telles que les cellules dendritiques ou les granulocytes).

Les études de Baldàn menées en 2006 montrent clairement que ces souris transplantées, soumises à un régime gras ont une très forte augmentation de l'apoptose au sein de la plaque, une diminution significative de la taille des lésions et une forte accumulation de cholestérol libre dans les macrophages. On peut supposer que cette accumulation de cholestérol libre est à l'origine de la forte apoptose observée, en revanche l'induction de l'apoptose au sein

de la plaque peut paraître contradictoire avec la réduction de la taille des lésions. En effet, les cellules apoptotiques étant à l'origine de la formation de la lésion, une augmentation de l'apoptose devrait se traduire par une augmentation du volume de la plaque [233].

La même année la transplantation réalisée par Ranaletta mène aux mêmes conclusions. Les souris sous régime western âgées de sept semaines ne montrent aucune différence en ce qui concerne la taille des lésions alors qu'à 11 semaines toujours sous le même régime on peut observer une réduction de la taille des lésions chez les souris ABCG1 KO [234].

Ainsi, ces deux études montrent qu'une délétion d'ABCG1 entraîne une réduction de la taille des lésions, laissant suggérer, contrairement à ce que l'on aurait pu penser, à un rôle pro-athérogène d'ABCG1

La troisième étude démontre comme les précédentes que la délétion d'ABCG1 n'a aucune répercussion sur les taux de lipides et de lipoprotéines plasmatiques. En revanche cette étude permet l'observation d'une très forte augmentation de la taille des lésions en l'absence d'ABCG1, corrélée à une forte réduction de l'efflux vers les particules HDL suggérant ici un rôle antiathérogène d'ABCG1 sous régime riche en cholestérol [235].

Les résultats de ces études sont contradictoires toutefois si l'on regarde plus attentivement les protocoles utilisés on peut être amenés à penser qu'il pourrait s'agir d'un biais expérimental.
D'une part, les souris ne sont pas toutes soumises au même type de régime ce qui se répercute logiquement à terme sur la charge en cholestérol des cellules et donc forcément sur le phénotype final. D'autre part l'âge des souris lors de l'analyse de l'avancée de l'athérosclérose diffère également. Or, la progression de l'athérosclérose n'est pas rectiligne. Ainsi l'âge des souris sur lesquelles les études sont menées pourrait se répercuter sur les résultats obtenus. Ainsi, l'implication d'ABCG1 pourrait aussi être modulée selon l'état

d'avancement de la lésion. En l'occurrence alors que les études de Baldan et Ranalletta ont été menées respectivement après 4 et 5 semaines suivant la transplantation celle de Out a eu lieu après 8 semaines ce qui pourrait expliquer le différentiel observé au niveau des résultats de ces études. Il faut donc rester très prudent avant toute comparaison d'études.
D'autre part on peut noter que l'étude de Ranaletta permet de constater que l'absence d'expression d'ABCG1 est associée à une augmentation de l'expression d'ABCA1 et de la sécrétion d'apoE, qui toutefois n'arrivent pas à compenser la diminution de l'efflux due à la délétion d'ABCG1. Ainsi, les études menées sur des lignées mutées pour un seul des transporteurs pourraient présenter l'inconvénient d'entraîner une légère surexpression de l'autre transporteur si l'on se réfère aux résultats de Ranaletta. En effet, cela pourrait s'expliquer par le fait que l'absence d'un des transporteurs entraîne une accumulation de stérols dans la cellule et donc une activation des récepteurs LXR connus pour induire l'expression d'ABCA1 et ABCG1. Ainsi, les résultats ne permettraient pas de déterminer de manière pertinente le rôle de l'un ou de l'autre transporteur.

Récemment deux études ont donc visé à étudier l'impact de la double délétion ABCA1-ABCG1 chez des souris susceptibles à l'athérosclérose LDL-R KO.
Il est ainsi intéressant de noter qu'il subsiste un efflux vers les particules HDL en absence des deux transporteurs suggérant l'implication d'un ou plusieurs autres acteurs dans ce processus d'efflux parmi lesquels peuvent se trouver SR-BI ou l'apoE. Ces souris montrent un très fort développement des lésions d'athérome, corrélé à un effondrement de l'efflux vers les particules apoAI et HDL. D'autre part il est aussi observé une diminution de la sécrétion d'apoE et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα, IL-6, IL-1 et IL-12. Les lésions montrent également dans cette étude une très forte accumulation de cellules apoptotiques pouvant être due à un défaut d'efflux de cholestérol libre toxique dans la cellule. Les effets observés au niveau pulmonaire lors de la délétion d'ABCG1 ne sont pas amplifiés lors

d'un double KO suggérant une implication spécifique d'ABCG1 dans la régulation de l'homéostasie lipidique pulmonaire toutefois ces résultats n'ont pas été observés dans une seconde étude menée par ce groupe [236].
Les études menées par Out montrent que les lésions des souris doublement mutées ne sont pas plus importantes que lors d'un simple KO ABCA1 ou ABCG1. En revanche il est intéressant de noter que ces souris montrent à la fois une hypoplasie sévère du thymus et une très forte diminution du taux de lymphocytes sanguins suggérant qu'ABCA1 et ABCG1 pourraient jouer un rôle important dans la dimension immunologique de l'athérogenèse, un aspect qu'il serait intéressant d'approfondir [237].

La stratégie inverse de surexpression d'ABCG1 dans un modèle murin a également été réalisée récemment. Ainsi, il a pu être démontré qu'il n'y avait absolument aucun impact de cette surexpression sur les taux plasmatiques lipidiques, l'efflux de cholestérol vers les particules HDL ou la taille des lésions malgré l'augmentation de 3 à 7 fois de l'expression d'ABCG1 au sein de tous les tissus. Toutefois il a tout de même été observé qu'il y avait une modification des taux des divers stérols impliqués dans la voie de synthèse du cholestérol (lathostérol, lanostérol et desmostérol) au niveau du foie pouvant suggérer qu'ABCG1 pourrait jouer un rôle spécifique dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au sein du foie.

4.4.4. Le rôle d'ABCG1 dans l'efflux de cholestérol au sein du macrophage

D'un point de vue mécanistique il a été démontré que la surexpression d'ABCG1 entraîne une redistribution du cholestérol libre au niveau de la membrane cellulaire laissant alors la possibilité que le cholestérol soit capté par les particules HDL environnantes [238]. Ainsi il avait déjà été démontré auparavant qu'ABCA1 fonctionnait sur le même mode, permettant une redistribution du cholestérol pouvant alors être capté par l'apoAI [239]. Il est intéressant de noter que le cholestérol rendu accessible par ABCG1 n'est pas

capté par l'apoAI soulignant clairement qu'ABCA1 et ABCG1 semblent intervenir au niveau de domaines membranaires distincts.
Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés. Ainsi, ABCG1 pourrait transloquer directement le cholestérol du feuillet interne vers le feuillet externe comme le fait la P-glycoprotéine (P-gp), un autre ABC transporteur ou bien ABCG1 pourrait participer à la formation de vésicules lipidiques circulant de compartiments intracellulaires en compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique ou encore ABCG1 pourrait simplement accélérer les taux de transfert du cholestérol à la membrane.

Enfin un mécanisme intéressant de coopération entre ABCA1 et ABCG1 a pu être mis en avant selon lequel ABCA1 serait à l'origine de la formation des accepteurs de cholestérol destinés à ABCG1. En effet, des accepteurs de cholestérol pour ABCG1 ont pu être générés suite à l'incubation de cellules de la lignée THP-1 en présence d'ApoAI pauvre en lipide. Le fait que ces deux transporteurs soient régulés de manière quasi similaire, notamment par les agonistes LXR/RXR, est tout à fait cohérent avec ce mécanisme.

4.4.5. Les autres rôles d'ABCG1

D'autre part, il a également été récemment démontré qu'ABCG1 permet l'efflux de 7bêta-hydroxycholestérol, jouant ainsi un rôle important dans la cytotoxicité des oxystérols et permettant ainsi de réduire l'apoptose des cellules. Il joue donc ici un rôle de détoxification [240]. Toutefois d'autres études suggèrent que ce relargage pourrait en revanche induire l'apoptose des cellules avoisinantes [241].
D'autre part, comme nous l'avons mentionné il a été suggéré une possible synergie de fonctionnement entre ABCA1 et ABCG1.

Enfin, des études récentes ont permis de faire un lien intéressant entre l'athérogenèse, le diabète de type 2 et ABCG1. Il est connu depuis longtemps que les patients atteints de diabète de type 2 sont plus enclins à développer

des plaques d'athérome. Cette étude démontre que ces patients ont une expression d'ABCG1 fortement réduite ce qui pourrait expliquer l'association diabète de type 2 / athérosclérose que l'on observe couramment chez les patients atteints de syndrome métabolique [242].

OBJECTIF DES TRAVAUX DE RECHERCHE

OBJECTIF DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Comme nous l'avons vu précédemment les maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose constituant la première cause de mortalité au monde il est absolument essentiel de poursuivre les investigations sur les mécanismes impliqués dans cette pathologie. En effet, malgré la découverte ces dernières années de molécules thérapeutiques de plus en plus efficaces, l'athérosclérose reste un problème majeur de santé publique.

Le macrophage, de par son rôle dans le stress oxydatif, l'inflammation, la captation de lipoprotéines modifiées ou encore la phagocytose de cellules apoptotiques présentes au sein de la lésion joue un rôle absolument majeur dans la pathologie et constitue ainsi une cible d'étude tout à fait pertinente.

Ainsi, d'une part, la formation de cellules spumeuses par captation de cholestérol issu des lipoprotéines modifiées représente une étape clé de l'athérogenèse. La capacité du macrophage à éliminer ce cholestérol en excès est par conséquent déterminant pour l'évolution de la pathologie. Alors que dans le macrophage murin les trois acteurs majeurs de cet efflux de cholestérol que sont ABCA1, ABCG1 et SR-B1/Cla1 ont été mis en évidence et ont été relativement bien caractérisés en revanche on dispose d'assez peu de données chez l'homme concernant les processus d'efflux de cholestérol et surtout ceux médiés par ABCG1. C'est pourquoi nous avons décidé de nous focaliser sur cette étude qui sera présentée en première partie.

D'autre part, ayant observé la forte implication d'ABCA1, proche partenaire d'ABCG1, dans le processus de captation de cellules apoptotiques et partant du constat qu'au sein de lésions athérosclérotiques de souris KO ABCG1 de nombreuses cellules apoptotiques s'accumulaient nous avons émis l'hypothèse qu'ABCG1 pourrait être impliqué dans la phagocytose de cellules apoptotiques et c'est ce que nous avons cherché à démontrer dans la seconde partie.

PRESENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

PREMIERE PARTIE

PRÉSENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

PREMIERE PARTIE

Implication d'ABCG1 et de Cla-1 dans les mécanismes d'efflux de cholestérol au sein du macrophage humain : implication de l'ATP et de la stimulation par les agonistes LXR

Présentation de l'étude:

Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment le macrophage joue un rôle central dans le processus d'athérogenèse. L'un de ses principaux rôles consiste en la captation de lipoprotéines environnantes, notamment les LDL modifiées menant à l'accumulation cellulaire de cholestérol. Lorsque cette accumulation de cholestérol devient excessive le macrophage se transforme en cellule spumeuse, à l'origine de la formation des stries lipidiques. Le macrophage ne pouvant cataboliser le cholestérol, l'étape d'efflux du cholestérol en excès vers des accepteurs va alors se révéler critique pour l'évolution de la pathologie.

Si ces mécanismes d'efflux ont été largement décrits dans des modèles de macrophages murins en revanche très peu de travaux ont à ce jour été menés dans des macrophages d'origine humaine. Ces travaux visent donc à clarifier ces processus d'efflux dans les macrophages humains, en évaluant l'implication d'ABCA1, ABCG1 et Cla-1 et en approfondissant les mécanismes mis en place au sein du macrophage humain pour y maintenir l'homéostasie du cholestérol.

Nos études ont donc été menées dans deux populations cellulaires macrophagiques: la lignée cellulaire monocytique THP-1 transformée en macrophage en présence de PMA, et des cultures de macrophages primaires dérivés de monocytes.

Nous nous sommes premièrement intéressés à la régulation de l'expression d'ABCA1, ABCG1 et Cla-1 par les agonistes LXR/RXR et à l'impact fonctionnel sur les processus d'efflux vers les différents accepteurs de cholestérol. Les récepteurs LXR/RXR sont en effet, largement impliqués dans les processus de maintien de l'homéostasie lipidique et sont notamment connus pour leur capacité à induire l'expression d'ABCA1 et ABCG1. Approfondir les connaissances concernant leur impact sur l'efflux de cholestérol permet ainsi de mieux envisager leur utilisation dans un contexte pharmacologique.

Puis nous avons analysé les expressions relatives des différents transporteurs / récepteurs dans le macrophage et la cellule spumeuse avec ou sans activation des récepteurs LXR/RXR afin de définir le poids respectif de chacun d'entre eux dans un contexte pathologique et/ ou pharmacologique.

Nous avons également évalué le besoin en ATP au cours de l'efflux de cholestérol, évaluant ainsi, indirectement, l'implication des transporteurs ABC pour les différentes voies d'efflux.

Et enfin nous nous sommes intéressés plus précisément à la voie ABCG1 et la voie Cla-1 via l'utilisation d'un siRNA ciblant ABCG1 et d'un anticorps bloquant anti-Cla1.

Conclusions de l'étude:

Ainsi nous cherchions avec cette étude à élucider les mécanismes fondamentaux impliquant ABCA1, ABCG1 et Cla-1 mis en jeu lors des processus d'efflux dans le macrophage humain et nous avons pu démontrer divers points essentiels:

- Les agonistes des récepteurs LXR/RXR induisent très fortement l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, ce qui se répercute au niveau fonctionnel sur

l'efflux de cholestérol vers l'apoAI et vers les HDL. Dans la cellule spumeuse, ABCG1 est le gène le plus exprimé surtout sous lors de l'activation des récepteurs LXR/RXR.

Ainsi, le désengorgement de la cellule spumeuse via le processus d'efflux de cholestérol vers des accepteurs étant clairement anti-athérogène, l'induction des gènes ABCA1 et surtout ABCG1 par des agonistes LXR/RXR représente une cible thérapeutique indéniable.

- L'efflux vers l'apoAI est clairement ATP-dépendant tandis que l'efflux vers les particules HDL ne l'est pas. En revanche, en cas d'induction par les agonistes LXR/RXR l'efflux vers les HDL est stimulé et une partie de cet efflux est alors ATP-dépendant.

  Ces données suggèrent que l'efflux vers les particules HDL est medié par une autre voie que celle d'ABCG1 et des ABC transporteurs. En revanche, en condition d'activation des récepteurs LXR/RXR l'efflux est stimulé et une partie de cet efflux est alors ATP-dépendant suggérant la réquisition d'ABC transporteurs dans ces conditions précises.

- L'invalidation d'ABCG1 par des siRNA ne mène pas à une diminution de l'efflux vers les HDL sauf lorsque le macrophage est stimulé par les agonistes LXR/RXR et non chargé en cholestérol. D'autre part, le blocage de Cla-1 par un anticorps bloquant réduit considérablement l'efflux vers les particules HDL.

  L'absence de diminution d'efflux vers les HDL, lors de l'invalidation d'ABCG1 en conditions basales, conforte nos précédentes conclusions sur l'existence d'un mécanisme autre qu'ABCG1 impliqué dans l'efflux vers les HDL. D'autre part les résultats obtenus avec l'anticorps bloquant Cla-1 mènent à la conclusion que cet efflux indépendant de l'ATP est en partie du à Cla-1.

- Chez le patient Tangier pour lequel ABCA1 est muté l'induction par les agonistes LXR / RXR n'a absolument plus aucun effet sur l'efflux de cholestérol.

Ainsi ABCG1, contrairement à ABCA1 ne serait pas impliqué dans l'efflux de cholestérol stimulé par les agonistes LXR / RXR dans le macrophage chargé en cholestérol.

Cette étude montre donc clairement le rôle clé d'ABCG1, ABCA1 et Cla-1 dans l'évolution de la formation des cellules spumeuses et donc dans l'athérogenèse. ABCA1 est en effet principalement responsable de l'efflux de cholestérol dans le macrophage chargé en cholestérol sous stimulation des récepteurs LXR / RXR. Et alors que Cla-1 est impliqué dans l'efflux de cholestérol vers les particules HDL dans la cellule spumeuse, ABCG1 est lui impliqué dans l'efflux lorsque le macrophage n'est pas chargé en cholestérol. La compréhension de ces mécanismes est essentielle est ouvre notamment la voie à des perspectives thérapeutiques.

STIMULATION OF CHOLESTEROL EFFLUX BY LXR AGONISTS IN CHOLESTEROL-LOADED PRIMARY HUMAN MACROPHAGES IS AN ATP-DEPENDENT TRANSPORT MECHANISM MEDIATED BY ABCA1 INDEPENDENT OF ABCG1

Sandra LARREDE [1,2], Wendy JESSUP [4], Eric FRISDAL [1,2], Maryline OLIVIER [1,2], Philippe COUVERT [1,2,3], Alain CARRIE [1,2,3], Philippe GIRAL [1,2,3], M. John CHAPMAN [1,2], Maryse GUERIN [1,2] and Wilfried LE GOFF[1,2]

[1]INSERM, UMRS551, Paris, 75013 France; [2]Université Pierre et Marie Curie–Paris6, UMR S551 Paris, 75013 France; AP-HP, Groupe hospitalier Pitié-Salpétrière, Service de Biochimie, Paris, 75013 France; [4]Centre for Vascular Research, School of Medical Sciences, University of New South Wales, Sydney, Australia.

*Address correspondence to:
Wilfried LE GOFF, PhD.
INSERM Unité 551
Hôpital de la Pitié
Pavillon Benjamin Delessert
83, boulevard de l'Hôpital
75651 Paris Cedex 13
France

Tel: +33 1 42 17 79 77
Fax: +33 1 45 82 81 98
email: wilfried.legoff@upmc.fr

Abstract:

Maintenance of cholesterol homeostasis in human macrophages is essential to prevent foam cell formation. We evaluated the relative contribution of the ABCA1 and ABCG1 transporters to cholesterol efflux in human macrophages, and of the effect of LXR agonists to reduce foam cell formation by stimulating export of cellular free cholesterol. ABCG1 mRNA levels predominated in acLDL-loaded THP-1 macrophages and in human monocyte-derived macrophages (HMDM) upon stimulation with LXR agonists. However, silencing of ABCG1 expression using ABCG1-specific siRNA indicated that ABCG1 was not essential for cholesterol efflux to HDL in cholesterol-loaded, primary human macrophages stimulated LXR agonists, but rather participated in the export of free cholesterol to HDL in non-cholesterol-loaded HMDM. ABCA1 was solely responsible for the stimulation of cholesterol efflux to HDL upon LXR activation as this effect was abolished in HMDM from Tangier patients. Furthermore, depletion of cellular ATP indicated that the LXR-induced export of free cholesterol was an ATP-dependent transport mechanism in human macrophages. Finally, the use of an anti-Cla-1 blocking antibody identified the Cla-1 receptor as a key component in cholesterol efflux to HDL from cholesterol-loaded human macrophages. Considered together, our data indicate that stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonists in human foam cells involves an ATP-dependent transport mechanism mediated by ABCA1; by contrast, LXR-mediated upregulation of ABCG1 expression contributes to cholesterol efflux homeostasis in non-cholesterol loaded human macrophages.

Introduction:

The mechanisms by which macrophages efflux cellular cholesterol to extracellular acceptors have been extensively investigated, and have led to the identification of members of the ABC transporter family as key actors in this process. Among them, ABCA1 mediates cholesterol efflux to lipid-poor apolipoprotein AI (apoAI); indeed, macrophage ABCA1 has been demonstrated to play a crucial role in foam cell formation and plaque progression [1, 2]. In addition, the ABCG1 transporter is a critical regulator of cholesterol homeostasis in the macrophage, and mediates cellular cholesterol efflux to mature spherical HDL particles [3, 4]. Interestingly, the combined action of the ABCA1 and ABCG1 transporters now appears essential for the maintenance of lipid homeostasis in mouse macrophages [5, 6]. In addition to ABCA1 and ABCG1, the SR-BI receptor pathway was initially reported to mediate cholesterol efflux to HDL particles; however the potential contribution of SR-BI to cholesterol efflux in mouse macrophages to mature HDL particle acceptors is controversial [7-9].

A substantial body of evidence indicates that the regulation of expression of key genes involved in cholesterol homeostasis, as well as the signalling pathways controlling foam cell formation, differ in a species-specific manner between mouse and human [10-14]. Such distinctions highlight the need to further explore mechanisms implicated in cholesterol homeostasis in human macrophages. Although the role of ABCA1 in cholesterol homeostasis and in HDL metabolism has been extensively documented in man following the identification of ABCA1 mutations in Tangier Disease [15-17], no naturally-occurring mutations of ABCG1 and Cla-1 have been identified in human subjects. Consequently, our knowledge of the precise role(s) of Cla-1 and ABCG1 in cellular lipid and cholesterol is limited. Polymorphisms in the

Cla-1 gene are associated with plasma HDL-C and LDL-C levels and equally with incidence of coronary artery disease [18-20]. Furthermore, the Cla-1 receptor is highly expressed in atherosclerotic lesion macrophages [21], thereby suggesting a potential role of macrophage Cla-1 in foam cell formation. Despite the observation that the ABCG1 transporter regulates macrophage cholesterol and phospholipid transport in man [3], the impact of human ABCG1 on macrophage cholesterol homeostasis and foam cell formation remains to be established. Thus, human macrophages expressing low levels of ABCG1 preferentially accumulate in atherosclerotic lesions, whereas macrophage subpopulations present in healthy areas of the arterial wall display higher levels of ABCG1 expression [22]. More recently, ABCG1 expression and cholesterol efflux were found to be attenuated in macrophages from patients with type 2 diabetes mellitus, an observation consistent with impaired cholesterol homeostasis in diabetic macrophages [23]. Although these studies support a key role of macrophage ABCG1 in foam cell formation, they do not allow us to decipher mechanisms potentially implicated in ABCG1-mediated maintenance of human macrophage cholesterol homeostasis.

The liver X receptors, LXRs, are nuclear receptors that act as cholesterol sensors in controlling transcription of genes involved in cholesterol homeostasis and lipid metabolism. LXR agonists have been demonstrated to delay atherosclerosis in mice [24] by stimulating reverse cholesterol transport from macrophages. Additional studies have revealed that expression of LXR in macrophages is a prerequisite for the atheroprotective effect of LXR [25, 26]. Since ABCG1 and ABCA1 gene expression is stimulated by LXR agonists in human macrophages [27-31], upregulation of macrophage ABCG1 and ABCA1 by LXR agonists may constitute an effective pharmacological approach to attenuate foam cell formation and subsequently to

prevention of vascular lipid accumulation and lesion progression in dyslipidemic patients.

Our present objective was to evaluate the relative contribution of the ABCG1, ABCA1 and Cla-1 pathways to cholesterol efflux from human macrophages, and to determine their respective role in the anti-atherogenic effects of LXR agonists on cholesterol homeostasis in human macrophages.

We demonstrated that stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonists is ATP-dependent in cholesterol-loaded human macrophages and specifically requires the ABCA1 transporter, a process independent of ABCG1. By contrast, ABCG1 participates in the export of free cholesterol from non-cholesterol loaded human macrophages. Finally, Cla-1 contributes to cholesterol efflux to HDL in cholesterol-loaded human macrophages independently of stimulation by LXR agonists.

Materials & Methods.

Preparation and culture of human macrophages.

Human THP-1 monocytic cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine and 100 µg/mL penicillin / streptomycin at 37°C in 5% CO_2. THP-1 were differentiated into macrophage-like cells with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 3 days. Monocytes were isolated from the blood of individual healthy normolipidemic donors (Etablissement Français du Sang, EFS), or from a Tangier Disease (TD) patient by Ficoll gradients (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) and subsequently differentiated into human macrophages (HMDM) by adhesion on plastic Primaria plates (Falcon) over a period of 10 days of culture in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated human serum (HS), 2 mM glutamine, 100 µg/ml penicillin / streptomycin and 20 ng/mL human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF).

Radioisotopic cholesterol efflux assays.

Human THP-1 macrophages and HMDM were cholesterol loaded with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL), and subsequently labeled with 1 µCi/mL [^{3}H]-cholesterol for 24 h in serum-free RPMI 1640 supplemented with 50mM glucose, 2mM glutamine, 0.2% BSA (RGGB) and 100µg/ml penicillin / streptomycin. The labeling medium was removed and human macrophages were then equilibrated in RGGB for an additional 16-24 h period in the presence or in the absence of either 0.1 mM 8Br-cAMP (Sigma), 1 µM TO901317 (Sigma) or 4 µg/mL 22-hydroxy-cholesterol (22OH-C) and 1 mM 9-*cis* retinoic acid (9cRA) (Sigma). Cellular cholesterol efflux to 5 µg/mL lipid-free apoA-I (Biodesign), or 15 µg/ml HDL-PL (d=1.063-1.21) isolated from

normolipidemic plasma by preparative ultracentrifugation [32], or 5% (v/v) normolipidemic plasma, was assayed in serum-free medium for a 4-hour chase period in the presence or absence of 0.1 mM 8Br-cAMP, 1 µM TO901317 or 4 µg/mL 22OH-C and 1 µM 9cRA. The human Cla-1 receptor in each cell type was blocked in cholesterol efflux studies by incubation with 5 µg/mL of either a rabbit anti-Cla-1 blocking antibody [33], or a rabbit anti-Cla1 non-blocking antibody as a control, for 30 mn prior to the efflux period. When required, depletion of cellular ATP was achieved as previously described [34] by incubation with 10 mM sodium azide in glucose free-RPMI media (Invitrogen) for 30 mn prior to the efflux period. Cells were then washed and incubated in glucose free-RPMI media (Invitrogen) during the 4-hour chase period. Finally culture media were harvested and cleared of cellular debris by a brief centrifugation. Cell radioactivity was determined by extraction in hexane-isopropanol (3:2), evaporation of the solvent and liquid scintillation counting (Wallac Trilux 1450 Microbeta). The percentage of cholesterol efflux was calculated as 100 x (medium cpm) / (medium cpm + cell cpm). ApoA-I-specific cholesterol efflux was determined by subtracting non-specific cholesterol efflux occuring in apoA-I-free medium.

RNA interference (RNAi)-mediated ABCG1 silencing using small interference (si)RNA.

ABCG1 knock-down (KD) macrophages were obtained by application of siRNA oligonucleotides (Dharmacon) targeted to the cDNA sequence of the human ABCG1 gene (Genebank# AY048757). The sequences of the siRNA were 5'-UCAUUGGCCUGCUGUGUACUUUU-3' and 5'-P-AAGUACAGCAGGCCAAUGAUU-3', respectively. For cholesterol efflux experiments, THP-1 macrophages were grown in 24-well plates and transfected with 50 nM control siRNA (Dharmacon) or siRNA

targeting human ABCG1 using lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After a 24-h incubation at 37°C, ABCG1 KD and control macrophages were cholesterol loaded and labelled with [^{3}H]-cholesterol for cholesterol efflux experiments as described above.

RNA extraction, reverse-transcription and quantitative-PCR.

Human macrophages (THP-1 and HMDM) were cultured in 6-well plates and incubated in the presence or in the absence of 0.1 mM 8Br-cAMP, 1 µM TO901317 or 4 µg/mL 22OH-C and 1 µM 9cRA for 24 h at 37°C. Cells were then washed twice with cold PBS and total RNA was extracted using a NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Then, 1500 ng of RNA was reverse transcribed with 75 ng of random hexamer using 200 units of M-MLV reverse transcriptase. An initial denaturation step for 5 mn at 68°C was followed by an elongation phase of 1 h at 42°C; the reaction was completed by a 5-mn incubation at 68°C.

Real time quantitative PCR was performed using a LightCycler LC480 (Roche). The reaction contained 2.5 ng of reverse transcribed total RNA, 150 pmol of forward and reverse primers (Table I, available online at http://atvb.ahajournal.org) and 5µl of Master Mix SYBR-Green, in a final volume of 10µl. Samples underwent the standard PCR protocol. Crossing point (CP) values for genes of interest were normalized to housekeeping genes (human delta-aminolevulinate synthase and human alpha-tubulin). Expression data were based on the crossing points calculated with the software for LightCycler data analysis and corrected for PCR efficiencies of the target and the reference gene. When indicated, data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control values.

Statistical analyses.

Data are shown as mean ± SEM. Experiments were performed in triplicate and values correspond to the mean from at least three independent experiments. Comparisons of 2 groups were performed by a 2-tailed Student's *t* test and comparisons of 3 or more groups were performed by ANOVA with Newman–Keuls post-test. All statistical analyses were performed using Prism software from GraphPad (San Diego, CA, USA).

Results.

ABCG1 is highly expressed in acLDL-loaded human monocyte-derived macrophages upon stimulation by LXR agonists.

To explore the relative contribution of the ABCA1, ABCG1 and Cla-1 pathways to cholesterol efflux in human macrophages and foam cells, the expression of these transporters was examined in human THP-1 macrophages differentiated with PMA and in human monocyte-derived macrophages (HMDM) by quantification of mRNA levels. In macrophages, the metabolism of excess cholesterol leads to the formation of oxysterols, which are abundant in macrophages of the atherosclerotic plaque [35]. Hydroxycholesterol (HC) derivatives stimulate both ABCG1 and ABCA1 gene expression in both mouse and human macrophages [36] by activating the nuclear receptor liver-X-receptor (LXR).

We first analyzed and compared the capacity of natural LXR/RXR agonists (22OH-C/9cRA), and the synthetic LXR agonist TO901317 and 8Br-cAMP, (this latter has been demonstrated to strongly stimulate ABCA1 gene expression in the mouse [37, 38]), to stimulate the expression of ABCA1, ABCG1 and Cla-1 genes in human macrophages (THP-1 and HMDM, Figure 1). Incubation with 8Br-cAMP allowed a modest ~2-fold induction of ABCA1 (THP-1: 1.3-fold and HMDM: 2.6-fold, $p<0.0005$) and ABCG1 mRNA levels (THP-1: 1.5-fold, $p<0.05$ and HMDM: 3.9-fold, $p<0.0005$) but was without effect on those of Cla-1. ABCA1 gene expression was equally stimulated in both THP-1 macrophages and HMDM by either TO901317 (5.8-fold and 9.6-fold, $p<0.0005$, respectively) or 22OH-C/9cRA (15.6-fold and 18.1-fold, $p<0.0005$, respectively). More strikingly, ABCG1 mRNA levels were increased 3.2-fold by TO901317 ($p<0.0005$) and 6.8-fold by 22OH-C/9cRA ($p<0.0005$) in THP-1 macrophages, attaining 28.6-fold ($p<0.0005$) and 44.6-fold ($p<0.0005$) elevations,

respectively, in HMDM. Although LXR agonists exerted a profound effect on both ABCA1 and ABCG1 mRNA levels, 22OH-C/9cRA but not TO901317 was responsible for a modest ~2-fold elevation in Cla-1 mRNA levels (THP-1: 2.2-fold, $p<0.005$ and HMDM: 1.9-fold, $p<0.0005$). The overall effects of LXR agonists and 8Br-cAMP on ABCA1, ABCG1 and Cla-1 mRNA levels in THP-1 macrophages and HMDM was summarized in Figure 1C. Stimulation of ABCA1 and ABCG1 expression by LXR agonists detected by analysis of mRNA levels was then confirmed semi-quantitatively at the protein level by Western blots (data not shown).

We next determined the impact of such LXR agonists on the expression of ABCG1 relative to that of ABCA1 and to Cla-1 in human macrophages (THP-1 and HMDM) and thus on their potential contribution to cholesterol homeostasis in macrophages and foam cells. In the basal state, levels of both ABCG1 and ABCA1 mRNA were substantially lower than those of Cla-1 in both THP-1 macrophages and HMDM (Figure 2A and B, summarized in Figure 2C), thereby indicating that the Cla-1 receptor was consistently expressed at high levels in human macrophages (THP-1 and HMDM). However, cholesterol loading of human macrophages with acLDL led to a marked increase in mRNA levels of ABCA1 (THP-1: 6.4-fold and HMDM: 4-fold, $p<0.005$) and ABCG1 (THP-1: 4.6-fold, $p<.0.005$ and HMDM: 8.6-fold, $p<0.0005$), whereas those of Cla-1 were unchanged.

Stimulation of acLDL-loaded human macrophages with the natural LXR/RXR agonists (22OH-C/9cRA) or the synthetic LXR agonist TO901317 further enhanced the expression of both ABCA1 and ABCG1 genes, with the highest amounts of mRNA observed for the ABCG1 gene. Interestingly, the addition of either 22OH-C/9cRA or TO901317 induced a ~2-fold increase in Cla-1 mRNA levels in acLDL-loaded HMDM but was without effect on acLDL-loaded THP-1 macrophages. Taken

together, these results indicate that Cla-1 mRNA levels were more abundant than those of ABCA1 and ABCG1 in human macrophages in the basal, non-cholesterol loaded state. However ABCG1 mRNA levels predomined in acLDL-loaded macrophages stimulated with LXR agonists, thereby suggesting a role of ABCG1 in maintaining cholesterol homeostasis in cholesterol-laden human macrophages.

Elevated ABCG1 gene expression is associated with elevated cellular cholesterol efflux to HDL in human macrophages.

As shown in Figure 3B, the marked elevation in ABCG1 expression upon stimulation with LXR agonists was accompanied by an increase of cellular [^{3}H]cholesterol efflux to HDL (22OH-C/9cRA: 1.7-fold, $p<0.0005$ and 1.8-fold, $p<0.005$; TO901317: 1.4-fold, $p<0.0005$) in both acLDL-loaded THP-1 macrophages and HMDM, respectively. However, cellular cholesterol efflux to HDL was not modulated when human macrophages were treated with 8Br-cAMP, suggesting that signaling pathways requiring cAMP do no contribute to cholesterol efflux to HDL. Consistent with levels of ABCA1 expression observed in human macrophages (Figures 1 and 2), [^{3}H]cholesterol efflux to apoAI was robustly induced upon stimulation with 22OH-C/9cRA (2.4-fold and 2-fold, $p<0.0005$) or TO901317 (2.6-fold and 2.5-fold, $p<0.0005$) in THP-1 macrophages and HMDM, respectively (Fig. 3A). Although ABCA1 mRNA levels were either unchanged or poorly elevated in the presence of 8Br-cAMP, [^{3}H]cholesterol efflux to apoAI in HMDM was superior to that in THP-1 macrophages (1.4-fold, $p<0.0005$), in all likelihood as the consequence of the phosphorylation of ABCA1 by the cAMP/PKA pathway, which may directly promote cellular cholesterol efflux [39].

In agreement with results obtained from the analysis of cholesterol efflux to either lipid-free apoAI or HDL particles, the capacity of human macrophages to promote cellular cholesterol efflux to whole human plasma containing cholesterol acceptors (HDL, apoAI) at physiological levels was also greatly increased upon stimulation with 22OH-C/9cRA (+50% and +70%, $p<0.0005$) or TO901317 (+30%, $p<0.0005$) in both acLDL-loaded THP-1 macrophages and HMDM, respectively (Fig. 3C).

The ABCG1 transporter participates in cellular cholesterol efflux in non-cholesterol-loaded human macrophages.

In order to determine whether the induction of cholesterol efflux to HDL by LXR agonists results from stimulation of ABCG1 expression, and equally to determine the potential contribution of ABCG1 to mechanisms of cholesterol efflux in human macrophages, we silenced ABCG1 gene expression using siRNA specific for the human ABCG1 gene. As compared to control siRNA, siRNA targeting human ABCG1 led to a complete abolition of ABCG1 expression in non–stimulated HMDM as measured by quantification of protein levels (Fig. 4C). In addition, silencing of ABCG1 expression (ABCG1 KD) completely abolished the strong stimulation of ABCG1 expression by LXR/RXR agonists (22OH-C/9cRA). Surprisingly, specific ABCG1 KD did not impact cholesterol efflux to HDL induced or not by LXR/RXR agonists (22OH-C/9cRA), as assessed using both radioisotopic (Fig. 4A) and mass (Fig. 4B) cholesterol efflux assays, in acLDL-loaded HMDM enriched in CE (CE: 48.2±1.9% and FC: 51.8±1.9% of total mass cholesterol as measured by HPLC). Absence of such an effect was also observed in THP-1 macrophages (data not shown). However, suppression of ABCG1 was accompanied by a significant ~20%

reduction of cholesterol efflux to HDL in non-cholesterol loaded HMDM upon stimulation by LXR/RXR agonists (22OH-C/9cRA) (Fig. 4D, $p<0.05$). Taken together, our data suggest a significant role for ABCG1 in the export of cellular free cholesterol to HDL in non-cholesterol-loaded human macrophages while this latter does not appear to contribute to cholesterol efflux to HDL in cholesterol-loaded macrophages.

Stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonists requires the ABCA1 transporter in cholesterol-loaded human macrophages.

Since the LXR-mediated stimulation of cholesterol efflux to HDL in cholesterol-loaded human macrophages is independent of ABCG1 expression, we next tested the possibility that this latter results from the induction of ABCA1 expression by LXR agonists. To address this possibility, cholesterol efflux to HDL was evaluated in HMDM from a Tangier Disease (TD) patient displaying a functional homozygous mutation in the ABCA1 gene. As expected, cholesterol efflux to lipid-free apoAI was almost completely abolished in acLDL-loaded TD HMDM as compared to control HMDM (Figure 5A). In addition, cholesterol efflux to HDL was lower (-25%, Figure 5B) in TD HMDM than in control HMDM as previously observed in fibroblasts from TD patients [40]. More strikingly, incubation with LXR/RXR agonists (22OH-C/9cRA) led to a significant stimulation of cholesterol efflux to HDL in control HMDM ($p<0.05$) whereas no effect was observed in TD HMDM (Figure 5B). These findings clearly indicate that the induction of free cholesterol export to HDL by LXR agonists involves an ABCA1-dependent pathway in cholesterol loaded human macrophages.

Requirement of cellular ATP for cholesterol export in cholesterol-loaded human macrophages upon stimulation with LXR agonists.

Since ABC transporters utilize ATP to generate the energy needed to transport metabolites across membranes [41], ABC-mediated cholesterol efflux should normally require intracellular ATP in macrophages. Although a recent study has reported that ABCA1 itself displays functional ATPase activity [42], the role of its ATPase in mediating cholesterol efflux to apoAI is indeterminate. In order to determine whether the ABCA1-dependent and –independent mechanisms of cholesterol efflux necessitate energy in cholesterol-loaded human macrophages, THP-1 macrophages and HMDM were depleted in ATP by incubation with sodium azide for 30 mn [34]; this agent blocks ATP synthesis by the mitochondrial respiratory chain. Cholesterol efflux to apoAI and HDL were then measured in glucose-free media to prevent ATP synthesis via glycolysis.

Reduction of intracellular ATP by 80% upon sodium azide treatment (data not shown) caused a profound alteration in ABCA1-mediated cholesterol efflux to apoAI in acLDL-loaded human macrophages (Figure 6A, THP-1: -48%, $p<0.0005$ and Figure 4B, HMDM: -37%, $p<0.005$), clearly indicating that ABCA1 requires ATP for the export of free cholesterol from human macrophages to apoAI. By contrast, cellular cholesterol efflux to HDL particles was not affected by the depletion of cellular ATP in both THP-1 macrophages and HMDM. However, in human macrophages stimulated by LXR/RXR agonists (22OH-C/9cRA), free cholesterol efflux to HDL was diminished by 16% (THP-1, $p<0.0005$) and 28% (HMDM, $p<0.005$) in response to reduction in intracellular ATP levels.

These data provide evidence that stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages necessitates intracellular

ATP for generation of the necessary energy, whereas no energy is required under basal conditions. These observations support a role for ABC transporters such as ABCA1 in mediating free cholesterol efflux to HDL in LXR-stimulated cholesterol-loaded human macrophages.

Cellular cholesterol efflux to HDL in cholesterol-loaded human macrophages requires the Cla-1 receptor.

The robust expression of the Cla-1 receptor in THP-1 macrophages and HMDM (Figure 2) as well as data indicating that mechanisms of free cholesterol efflux to HDL do not require cellular ATP in those cells under basal conditions (Figure 6) support a role for this receptor in human macrophages. To test this possibility, we evaluated the capacity of the Cla-1 receptor to mediate free cholesterol efflux to HDL in cholesterol-loaded human macrophages using a specific anti-Cla-1 blocking antibody which has been demonstrated to suppress Cla-1 activity [33]. As compared to a non-blocking Cla-1 antibody, the incubation of acLDL-loaded human macrophages in the presence of the blocking Cla-1 antibody at a concentration that efficiently abrogates Cla-1 activity [33] was accompanied by a -20% reduction ($p<0.0001$) of [^{3}H]cholesterol efflux to HDL in both THP-1 macrophage and HMDM (Figure 7). This finding indicates that the Cla-1 receptor is implicated in human macrophage cholesterol homeostasis via its role in mediating free cholesterol efflux to HDL.

Discussion.

We presently demonstrate that the atheroprotective stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonists occurs via an ATP-dependent transport mechanism mediated by ABCA1 in cholesterol-loaded primary human macrophages. By contrast, stimulation of ABCG1 by LXR agonists appears to play a role in cholesterol efflux to HDL when macrophages are not CE-enriched.

The Cla-1 receptor is robustly expressed in fully differentiated human macrophages (THP-1 and HMDM), and this receptor participates in the elimination of free cholesterol from cholesterol-loaded human macrophages. This finding is consistent with our observation that depletion in cellular ATP did not alter cholesterol efflux to HDL, and favours a transport mechanism for which energy is not required. The generation of cell lines stably transfected with SR-BI/Cla-1 identified this receptor as being able to promote cholesterol efflux to large cholesteryl ester-rich HDL particles [43-45]. However its role in mediating cholesterol efflux from mouse macrophages is controversial [7-9], and studies of its role in HMDM are lacking. A role for macrophage Cla-1 in cholesterol efflux to HDL is consistent with previous studies indicating that Cla-1 is expressed in human atherosclerotic lesion macrophages [21, 46] and with epidemiological studies demonstrating that single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Cla-1 gene are associated with circulating HDL-C levels in humans [18, 19]. We therefore proposed that cholesterol efflux to HDL from cholesterol-loaded macrophages is mediated by a transport mechanism that does not necessitate energy, thus excluding the implication of ATP-dependent transporters of the ABC family. Although we presently demonstrate that the Cla-1 receptor is implicated in this mechanism, our findings strongly suggest that cholesterol efflux to HDL in human

macrophages equally involves receptors / transporters which have not been identified to date.

In mice, LXR activation by synthetic LXR agonists inhibits atherosclerosis development [24], likely via enhanced macrophage cholesterol efflux with subsequent activation of RCT from macrophages [47] leading to a reduction in lipid accumulation. We confirmed previous studies indicating that both ABCA1 and ABCG1 gene expression is strongly induced in THP-1 macrophages and HMDM upon LXR/RXR activation by 22-hydroxycholesterol (22OH-C) and *9-cis* retinoic acid (9cRA) as well as the synthetic LXR agonists, TO901317 [27-31]. In addition to the marked induction of ABCA1 and ABCG1 mRNA levels, we observed that expression of the Cla-1 receptor was induced 2-fold upon stimulation with 22OH-C/9cRA, suggesting that Cla-1 may be a target for LXR-mediated upregulation in human macrophages. More strikingly, ABCG1 mRNA levels were some ~2.5-fold more elevated than those of ABCA1 and Cla-1 in acLDL-loaded macrophages upon LXR stimulation, reinforcing the hypothesis that ABCG1 represents a preferential target of LXR in foam cells. In cholesterol-loaded human macrophages, the LXR-stimulation of ABCA1 and ABCG1 gene expression was accompanied by enhanced cholesterol efflux to apoAI and HDL. Although cholesterol efflux to apoAI is specifically attributed to ABCA1, our findings in HMDM from a TD patient indicated that the stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonists is strictly dependent on ABCA1, as complete lack of induction was observed in TD HMDM as compared to control HMDM. This finding equally suggests that the marked stimulation of ABCG1 expression upon LXR treatment does not contribute to the enhanced cholesterol efflux to HDL induced by LXR agonists in cholesterol-loaded HMDM.

Indeed, the silencing of ABCG1 expression with a specific siRNA was without effect on cholesterol efflux to HDL in cholesterol-loaded HMDM stimulated or not with LXR agonists, a result in contrast to data obtained in mouse macrophages. Indeed, recent studies have reported that cholesterol efflux to HDL was significantly reduced in ABCG1 KO macrophages upon induction by LXR agonists [5, 6, 48] or without induction [49]. In LXR-stimulated mouse macrophages, ABCG1 appears to reduce the accumulation of FC in the ER and thus to attenuate CE formation by redistributing FC to the plasma membrane where it is accessible by HDL acceptors for cholesterol efflux. Our findings indicate however that ABCG1 fulfils a distinct role in primary human macrophages and support the contention that the response to LXR activation occurs in a species-specific manner. Indeed, reduction of cholesterol efflux to HDL was only observable when LXR-stimulated ABCG1 knock-down (KD) macrophages were not loaded with cholesterol, suggesting that ABCG1 could attenuate cholesterol accumulation in non-cholesterol loaded human macrophages but not in foam cells. The accumulation of CE in macrophages results from the internalization of cholesterol from modified LDL via the scavenger receptor pathway, such as CD36 and SR-A, through endosomal cholesterol transport to the ER where FC is converted to EC under the action of ACAT. Our finding therefore suggests that the preferred source of cholesterol for ABCG1 is located in intracellular compartments that are distinct from those sensitive to the action of ACAT since the silencing of ABCG1 expression has no effect on cholesterol efflux to HDL in HMDM loaded with acLDL. In agreement with this hypothesis, the inhibition of ACAT in acLDL-loaded HMDM by the S58035 inhibitor allowed the same observation (data not shown).

Our study equally indicates that cholesterol efflux to HDL requires intracellular ATP in LXR-stimulated human macrophages. Indeed, the extensive depletion (~80%)

of human macrophages in cellular ATP reduced the increment of cholesterol efflux to HDL seen upon LXR stimulation, probably as a result of the decreased activity of ABCA1 since we identified this transporter as being implicated in this LXR-mediated effect. ABCA1-mediated cholesterol to apoAI was greatly reduced in response to depletion in cellular ATP in human macrophages treated with or without LXR agonists, providing evidence that ABCA1 needs energy to promote the export of FC to apoAI. ABCA1 has been showed to possess functional ATPase activity which is found to be particularly robust when reconstituted in liposomes composed of phospholipid with choline head groups [42]. The ATPase activity of purified ABCA1 is reduced by addition of cholesterol, thereby arguing in favour of the proposed model in which ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipids transport [42, 50]. Our findings therefore support the notion that ABCA1 possesses functional ATPase activity and strongly suggest that this latter is required for lipidation of apoAI by human macrophages.

Accumulation of cholesterol in macrophages leads to foam cell formation, a critical step in the early stages of atherosclerosis. The present work provides new information on the mechanisms controlling cholesterol homeostasis in human macrophages, notably by the identification of Cla-1, ABCA1 and ABCG1 as complementary partners in the removal of free cholesterol to HDL. Indeed, our findings indicate that Cla-1 is involved in the elimination of the excess of free cholesterol in cholesterol-loaded human macrophages in a transport mechanism that does not necessitate energy. However in foam cells stimulated with LXR agonists, in which cholesterol efflux to HDL occurs by an ATP-dependent transport mechanism, we demonstrated that ABCA1 is solely responsible for enhanced cholesterol efflux. By contrast, stimulation of ABCG1 by LXR agonists appears to play a role in the

specific removal of free cholesterol to HDL from human macrophages newly recruited in the intima but not in CE-enriched foam cells already present in the atherosclerotic plaque.

References.

1. Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, et al. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Apr 1 2002;22(4):630-637.

2. van Eck M, Bos IS, Kaminski WE, et al. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 30 2002;99(9):6298-6303.

3. Klucken J, Buchler C, Orso E, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 18 2000;97(2):817-822.

4. Wang N, Yvan-Charvet L, Lutjohann D, et al. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *Faseb J.* Apr 2008;22(4):1073-1082.

5. Out R, Jessup W, Le Goff W, et al. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ Res.* Jan 4 2008;102(1):113-120.

6. Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, et al. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest.* Dec 2007;117(12):3900-3908.

7. Zhang W, Yancey PG, Su YR, et al. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* Nov 4 2003;108(18):2258-2263.

8. Van Eck M, Bos IS, Hildebrand RB, et al. Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am J Pathol.* Sep 2004;165(3):785-794.

9. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* Aug 2007;117(8):2216-2224.

10. Kiss RS, Maric J, Marcel YL. Lipid efflux in human and mouse macrophagic cells: evidence for differential regulation of phospholipid and cholesterol efflux. *J Lipid Res.* Sep 2005;46(9):1877-1887.

11. Chinetti-Gbaguidi G, Rigamonti E, Helin L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls cellular cholesterol trafficking in macrophages. *J Lipid Res.* Dec 2005;46(12):2717-2725.

12. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest.* Dec 2004;114(11):1564-1576.

13. Rigamonti E, Helin L, Lestavel S, et al. Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ Res.* Sep 30 2005;97(7):682-689.

14. Le Goff W, Zheng P, Brubaker G, et al. Identification of the cAMP-responsive enhancer of the murine ABCA1 gene: requirement for CREB1 and STAT3/4 elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Mar 2006;26(3):527-533.

15. Rust S, Rosier M, Funke H, et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* Aug 1999;22(4):352-355.

16. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* Aug 1999;22(4):336-345.

17. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* Aug 1999;22(4):347-351.

18. Osgood D, Corella D, Demissie S, et al. Genetic variation at the scavenger receptor class B type I gene locus determines plasma lipoprotein concentrations and particle size and interacts with type 2 diabetes: the framingham study. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun 2003;88(6):2869-2879.

19. Acton S, Osgood D, Donoghue M, et al. Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul 1999;19(7):1734-1743.

20. Hong SH, Kim YR, Yoon YM, et al. Association between HaeIII polymorphism of scavenger receptor class B type I gene and plasma HDL-cholesterol concentration. *Ann Clin Biochem.* Sep 2002;39(Pt 5):478-481.

21. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, et al. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation.* May 23 2000;101(20):2411-2417.

22. Waldo SW, Li Y, Buono C, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* Apr 2008;172(4):1112-1126.

23. Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, et al. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of

patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* May 27 2008;117(21):2785-2792.

24. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 28 2002;99(11):7604-7609.

25. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, et al. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 3 2002;99(18):11896-11901.

26. Levin N, Bischoff ED, Daige CL, et al. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jan 2005;25(1):135-142.

27. Cignarella A, Engel T, von Eckardstein A, et al. Pharmacological regulation of cholesterol efflux in human monocyte-derived macrophages in the absence of exogenous cholesterol acceptors. *Atherosclerosis.* Apr 2005;179(2):229-236.

28. Beyea MM, Heslop CL, Sawyez CG, et al. Selective up-regulation of LXR-regulated genes ABCA1, ABCG1, and APOE in macrophages through increased endogenous synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. *J Biol Chem.* Feb 23 2007;282(8):5207-5216.

29. Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, et al. The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation. *Atherosclerosis.* Jan 2008;196(1):180-189.

30. Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, et al. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem.* May 12 2000;275(19):14700-14707.

31. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 16 2001;98(2):507-512.

32. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, et al. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res.* Feb 1981;22(2):339-358.

33. Treguier M, Moreau M, Sposito A, et al. LDL particle subspecies are distinct in their capacity to mediate free cholesterol efflux via the SR-BI/Cla-1 receptor. *Biochim Biophys Acta.* Feb 2007;1771(2):129-138.

34. Marbeuf-Gueye C, Broxterman HJ, Dubru F, et al. Kinetics of anthracycline efflux from multidrug resistance protein-expressing cancer cells compared with P-glycoprotein-expressing cancer cells. *Mol Pharmacol.* Jan 1998;53(1):141-147.

35. van Reyk DM, Jessup W. The macrophage in atherosclerosis: modulation of cell function by sterols. *J Leukoc Biol.* Oct 1999;66(4):557-561.

36. Jessup W, Gelissen IC, Gaus K, et al. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol.* Jun 2006;17(3):247-257.

37. Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 28 1999;96(20):11358-11363.

38. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, et al. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem.* Nov 3 2000;275(44):34508-34511.

39. Haidar B, Denis M, Krimbou L, et al. cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J Lipid Res.* Dec 2002;43(12):2087-2094.

40. Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci.* Oct 2005;62(19-20):2150-2160.

41. Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res.* Nov 10 2006;99(10):1031-1043.

42. Takahashi K, Kimura Y, Kioka N, et al. Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J Biol Chem.* Apr 21 2006;281(16):10760-10768.

43. de La Llera-Moya M, Connelly MA, Drazul D, et al. Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res.* Dec 2001;42(12):1969-1978.

44. Ji Y, Jian B, Wang N, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* Aug 22 1997;272(34):20982-20985.

45. Kellner-Weibel G, de La Llera-Moya M, Connelly MA, et al. Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry.* Jan 11 2000;39(1):221-229.

46. Hirano K, Yamashita S, Nakagawa Y, et al. Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ Res.* Jul 9 1999;85(1):108-116.

47. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* Jan 3 2006;113(1):90-97.

48. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* Feb 2005;1(2):121-131.

49. Out R, Hoekstra M, Hildebrand RB, et al. Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 2006;26(10):2295-2300.

50. Smith JD, Le Goff W, Settle M, et al. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* Apr 2004;45(4):635-644.

Acknowledgments.

INSERM provided generous support of these studies. S.L. and M.O. were recipients of a Research Fellowship from the French Ministry of Research and Technology. W.L.G. was the recipient of a PNRC award from INSERM. Authors thank Dr. Thierry Huby for the generous gift of rabbit anti-Cla-1 blocking and non-blocking antibodies.

Legends to figures.

Figure 1. ABCA1 and ABCG1 mRNA levels are highly stimulated by LXR agonists in human macrophages. A, THP-1 macrophages and B, HMDM were incubated in the presence or in the absence of 0.1 mM 8Br-cAMP, 1 µM TO901317 or 4 µg/mL 22-hydroxycholesterol (22OH-C) and 1 µM 9-cis retinoic acid (9cRA) for 24 h. Total RNA was then extracted, quantified by Real time quantitative PCR and normalized to both human delta-aminolevulinate synthase and human alpha-tubulin housekeeping genes. Values are the mean ± SEM of 9 independent experiments and expressed as a fold change relative to cells incubated in the absence of agonists. *$p<0.05$, **$p<0.005$ and ***$p<0.0005$ compared with cells not treated with agonist. C, Summary of the effect of each agonist on the ABCA1, ABCG1 and Cla-1 mRNA levels in THP-1 macrophages and HMDM. +, induction; ↔, no change.

Figure 2. Abundance of ABCG1 mRNA levels in acLDL-loaded human macrophages stimulated with LXR agonists. A, THP-1 macrophages and B, HMDM were cholesterol-loaded or not with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL) for 24 h and incubated in the presence or in the absence of 0.1 mM 8Br-cAMP, 1 µM TO901317 or 4 µg/mL 22-hydroxycholesterol (22OH-C) and 1 µM 9-cis retinoic acid (9cRA) for an additional 24h-period. Total RNA was then extracted, quantified by Real time quantitative PCR and normalized to human alpha-tubulin (TUBA) housekeeping gene. Expression data were corrected for PCR efficiencies of the target and the reference gene, thus making possible analysis of the expression of one gene relative to the others. Similar results were obtained with normalization to human delta-aminolevulinate synthase housekeeping gene. Values are the mean ± SEM of 9 independent experiments. C, Summary of the abundance of ABCA1, ABCG1 and

Cla-1 mRNA levels in THP-1 macrophages and HMDM according to different treatments.

Figure 3. Marked stimulation of cholesterol efflux in human macrophages by LXR agonists. THP-1 macrophages and HMDM were cholesterol-loaded with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL) for 24 h and treated with or without of 0.1 mM 8Br-cAMP, 1 µM TO901317 or 4 µg/mL 22-hydroxycholesterol (22OH-C) and 1 µM 9-cis retinoic acid (9cRA) for an additional 24h-period. Cholesterol efflux to 5 µg/mL lipid-free apoA-I (A), 15 µg/ml HDL-PL (B) or 5% (v/v) normolipidemic plasma (C) was assayed for a 4-hour chase period in the presence or absence of the respective drug. Values are the mean ± SEM from at least three independent experiments and expressed as relative to cells incubated in the absence of agonists. *$p<0.05$ and **$p<0.0005$ compared with cells not treated with agonist.

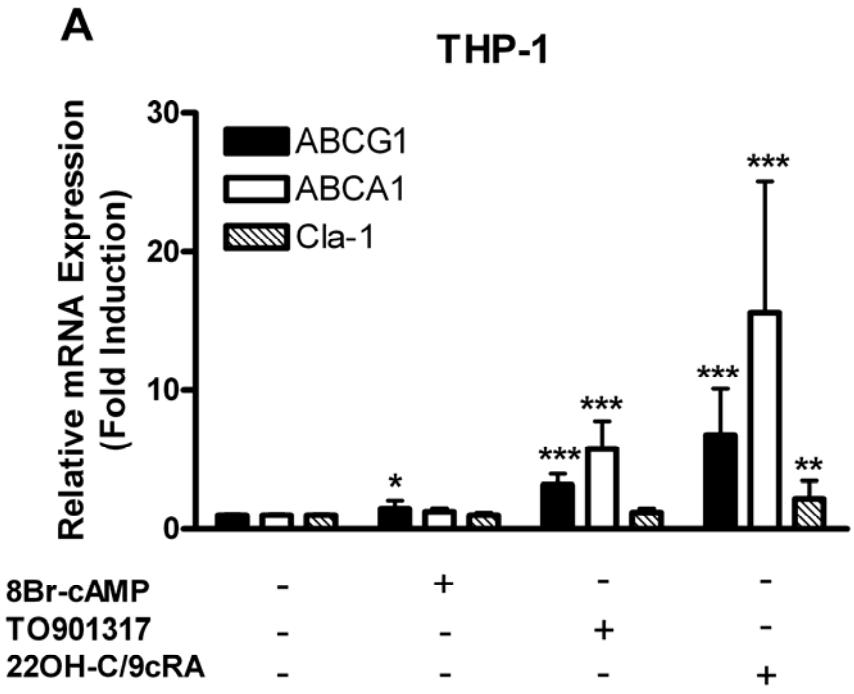
Figure 4. Stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonist does not require the transporter ABCG1 in cholesterol-loaded HMDM. HMDM were transfected with 50 nM control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting human ABCG1 (ABCG1 KD) for 24 h and incubated with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL) (A-C) or 10% human serum (D) for an additional 24h-period. HMDM were then stimulated with 4 µg/mL 22-hydroxycholesterol (22OH-C) and 1 µM 9-cis retinoic acid (9cRA) and free cholesterol efflux to 15 µg/ml HDL-PL was assessed by radioisotopic [^{3}H]Cholesterol (A, D) or cholesterol mass analysis (high-performance liquid chromatography [HPLC]) (B) (n=3, ± SD). *$p<0.05$ compared to cells transfected with control siRNA (Ctrl). (C) Total ABCG1 protein was assessed by Western blot analysis.

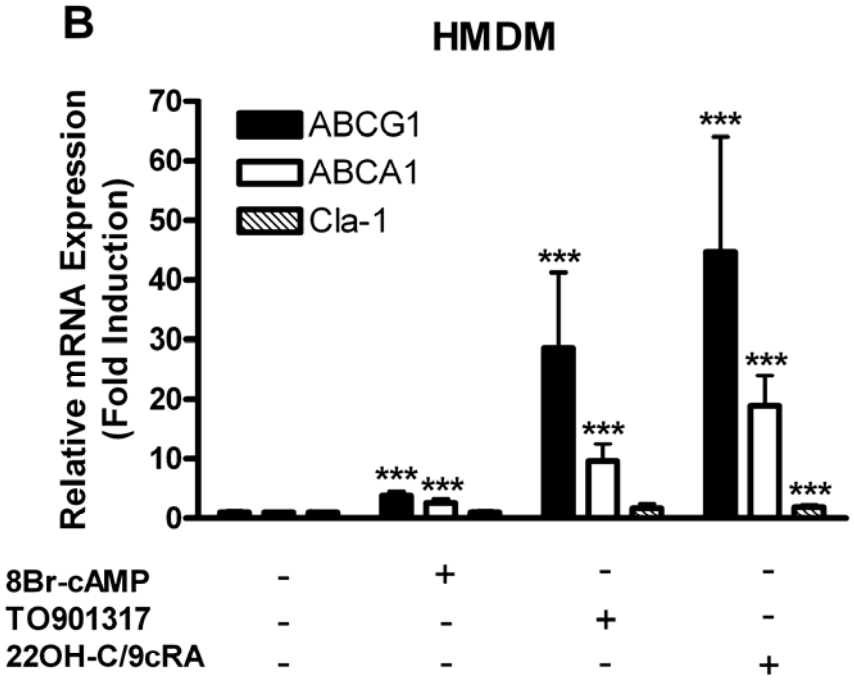
Figure 5. Lack of stimulation of cholesterol efflux to HDL by LXR agonist in Tangier Disease HMDM. HMDM from a Tangier Disease (TD) patient displaying a functional homozygous mutation in the ABCA1 gene and control HMDM from normolipidemic individuals (Ctrl) were cholesterol-loaded with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL) for 24 h and treated with 4 µg/mL 22-hydroxycholesterol (22OH-C) and 1 µM 9-cis retinoic acid (9cRA) for an additional 24h-period. Cholesterol efflux to 5 µg/mL lipid-free apoA-I (A) or 15 µg/ml HDL-PL (B) was assayed for a 24-hour chase period in the presence or absence of 22OH-C/9cRA (n=3, ± SD). *$p<0.05$ compared with cells not treated with 22OH-C/9cRA.

Figure 6. Effect of cellular ATP depletion on cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages. THP-1 macrophages and HMDM were cholesterol-loaded with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL) for 24 h and treated with or without 4 µg/mL 22-hydroxycholesterol (22OH-C) and 1 µM 9-cis retinoic acid (9cRA) for an additional 24h-period. When required, cholesterol-loaded human macrophages were depleted in cellular ATP for 30 mn prior to the efflux period by incubation with 10 mM sodium azide, which blocks ATP synthesis by the mitochondrial respiratory chain. Cholesterol efflux to 5 µg/mL lipid-free apoA-I (A) or 15 µg/ml HDL-PL (B) was then assayed for a 4-hour chase period in the presence or absence of 22OH-C/9cRA. ATP-depleted macrophages were assayed for cholesterol efflux in a glucose-free media in order to prevent ATP synthesis from β-oxidation. Values are the mean ± SEM from three independent experiments and expressed as relative to cells not depleted in ATP. *$p<0.005$ and **$p<0.0005$ compared with respective cells not depleted in ATP.

Figure 7. Reduction of cholesterol efflux to HDL by inhibition of the Cla-1 receptor in cholesterol-loaded human macrophages. A, THP-1 macrophages and B, HMDM were cholesterol-loaded with 50 µg/mL acetylated LDL (acLDL) for 24 h. Cholesterol-loaded human macrophages were incubated for 30 mn prior to the efflux period with 5 µg/mL of either a rabbit anti-Cla-1 blocking antibody (B) or a rabbit anti-Cla1 non-blocking antibody as a control (NB). Cholesterol efflux to 15 µg/ml HDL-PL was assayed for a 4-hour chase period. Values are the mean ± SEM from three independent experiments and expressed as relative to cells preincubated with control non-blocking antibody. *$p<0.0005$ compared with cells preincubated with control non-blocking antibody.

Figure 1

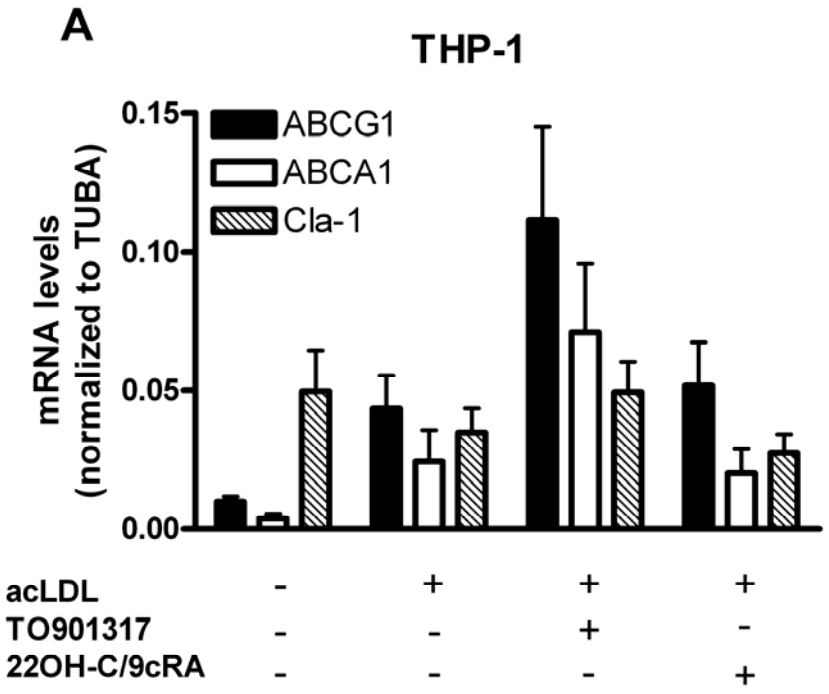


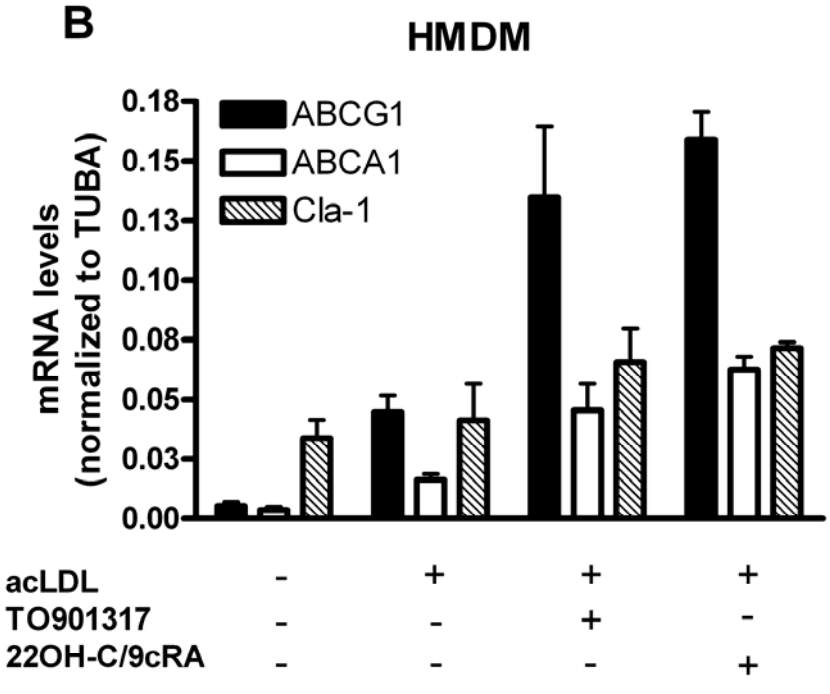


C

Gene \ Agonist	THP-1			HMDM		
	8Br-cAMP	TO901317	22OH-C/9cRA	8Br-cAMP	TO901317	22OH-C/9cRA
ABCG1	+	++	++	+	+++	+++
ABCA1	↔	++	++	+	++	++
Cla-1	↔	↔	+	↔	↔	+

Figure 2





C

Gene \ Agonist	THP-1			HMDM		
	8Br-cAMP	TO901317	22OH-C/9cRA	8Br-cAMP	TO901317	22OH-C/9cRA
ABCG1	+	++	++	+	+++	+++
ABCA1	↔	++	++	+	++	++
Cla-1	↔	↔	+	↔	↔	+

Figure 3

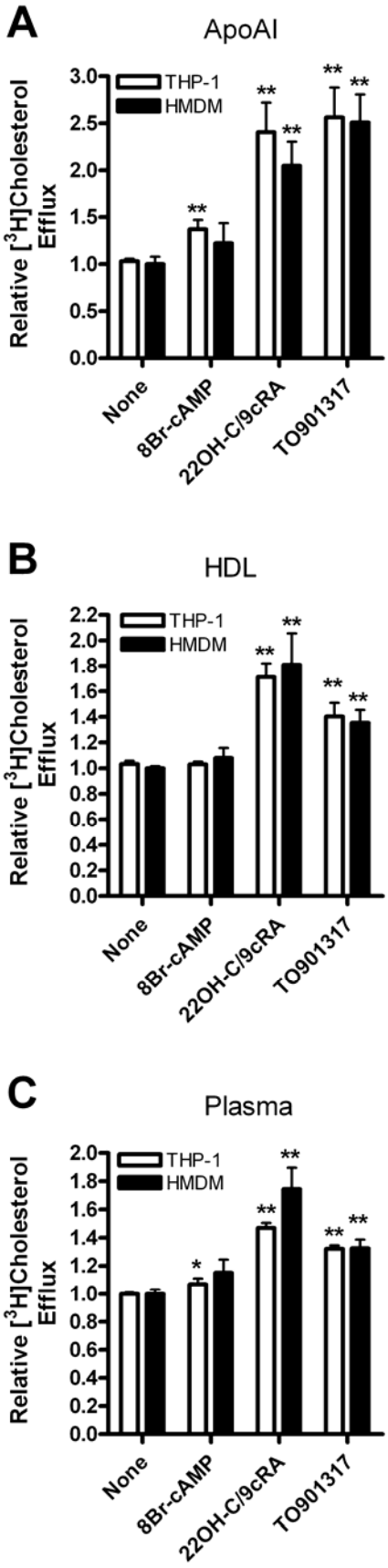

A
ApoAI
THP-1
HMDM
Relative [3H]Cholesterol Efflux
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
None
8Br-cAMP
22OH-C/9cRA
TO901317
B
HDL
2.2
1.8
1.6
1.4
1.2
0.8
0.6
0.4
0.2
C
Plasma
*

Figure 4

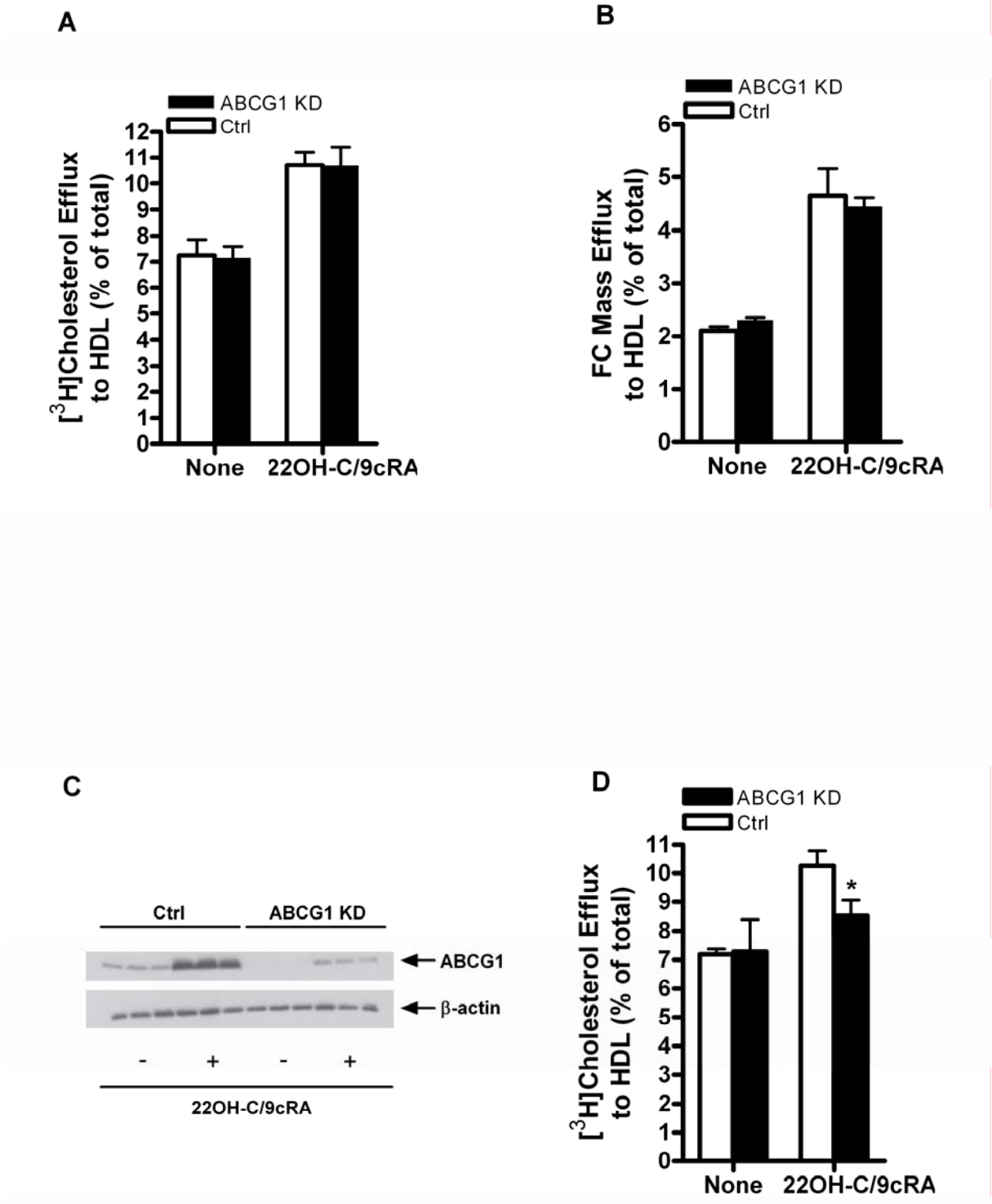

A
ABCG1 KD
Ctrl
[3H]Cholesterol Efflux to HDL (% of total)
None
22OH-C/9cRA
B
ABCG1 KD
Ctrl
FC Mass Efflux to HDL (% of total)
None
22OH-C/9cRA
C
Ctrl
ABCG1 KD
ABCG1
β-actin
- + - +
22OH-C/9cRA
D
ABCG1 KD
Ctrl
[3H]Cholesterol Efflux to HDL (% of total)
*
None
22OH-C/9cRA

Figure 5

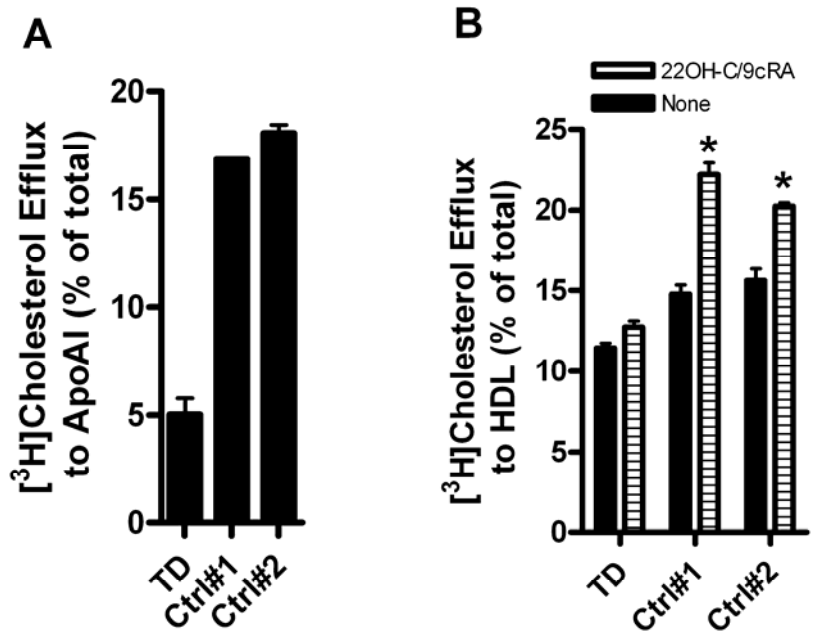


Figure 6

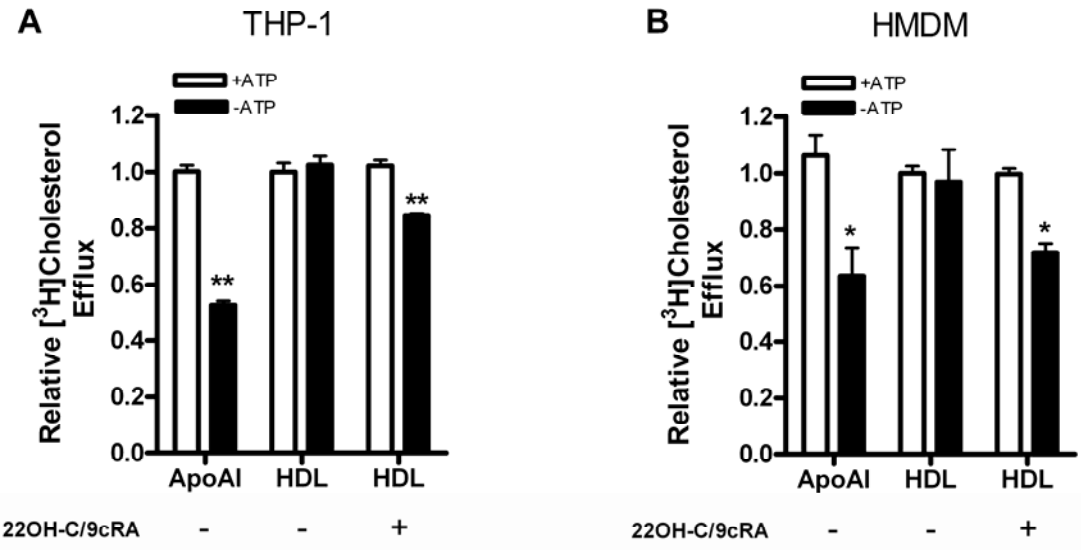
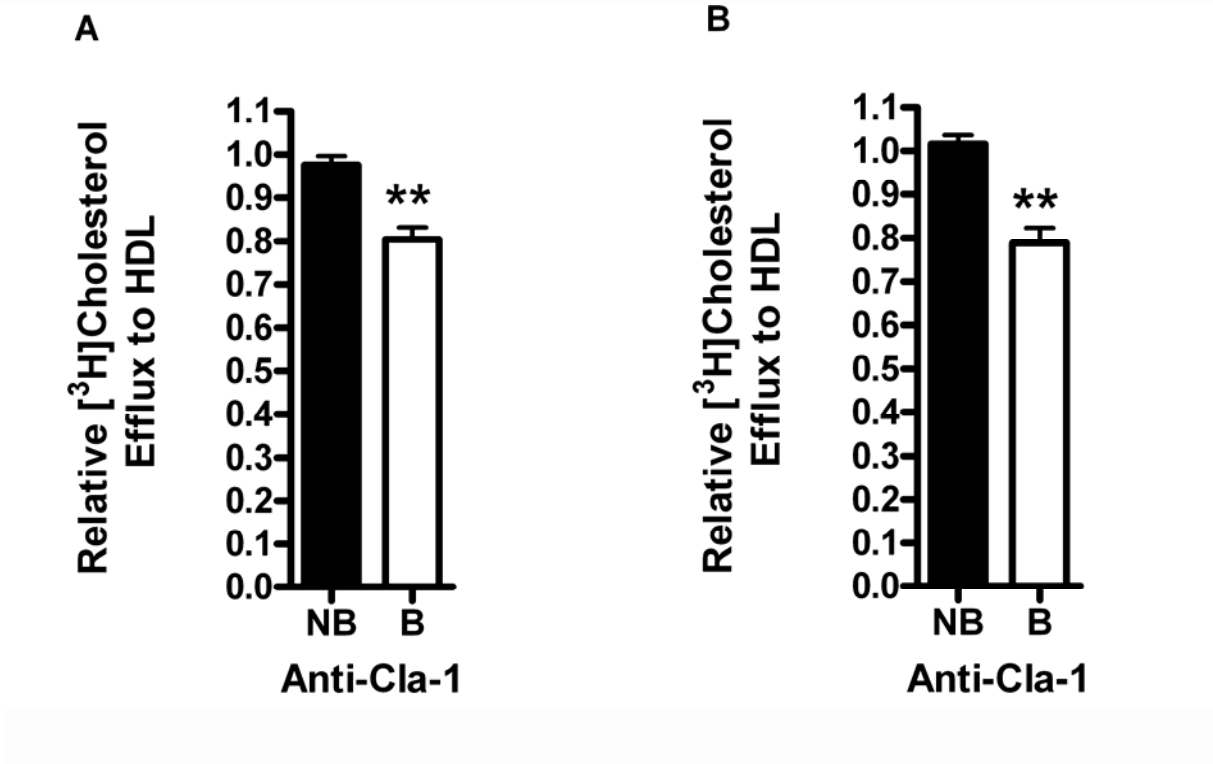


Figure 7


A
Relative [3H]Cholesterol Efflux to HDL
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
NB
B
Anti-Cla-1
B
Relative [3H]Cholesterol Efflux to HDL
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
NB
B
Anti-Cla-1

SECONDE PARTIE

SECONDE PARTIE

Evaluation de l'implication d'ABCG1 dans la phagocytose

Présentation de l'étude:

L'un des autres rôles clé du macrophage dans l'athérogenèse réside, comme nous l'avons vu précédemment, dans sa capacité à phagocyter les cellules apoptotiques présentes au sein de la lésion, ce processus de phagocytose étant déterminant pour l'évolution de l'athérogenèse.
Certains ABC transporteurs ont initialement été mis en avant pour être impliqués dans les processus de phagocytose grâce à des études menées chez le nématode. Les similitudes entre ces gènes et ABCA1 ont permis de poser ABCA1 comme gène candidat impliqué dans ces processus de phagocytose. Si l'implication d'ABCA1 a pu être ainsi démontré en revanche, aucune étude n'a encore étudié l'implication d'ABCG1 dans ces processus de phagocytose. Pourtant des études menées sur des souris LDL-R KO transplantées par de la moëlle osseuse ABCG1 KO montrent clairement une augmentation du nombre de cellules apoptotiques au niveau des lésions pouvant suggérer un défaut de phagocytose chez les souris ABCG1 KO. Ainsi ABCG1 pourrait potentiellement jouer un rôle dans la phagocytose. Nos études ont donc visé à évaluer ce rôle potentiel.

Nos études ont été menées dans diverses populations cellulaires permettant d'évaluer l'implication d'ABCG1 dans la phagocytose : des lignées de CHO surexprimant le transporteur et des macrophages murins. Ces cellules ont pu être analysées par cytométrie de flux afin de quantifier le nombre de cellules apoptotiques marquées ingérées dans diverses conditions.

Ainsi, cette étude devrait nous permettre d'évaluer l'implication d'ABCG1 dans ces mécanismes de captation de cellules apoptotiques et le cas échéant d'approfondir ce processus.

Conclusions de l'étude:

Nous cherchions donc à évaluer une éventuelle implication d'ABCG1 dans les mécanismes de phagocytose de cellules apoptotiques et notre étude nous a permis de démontrer :

- L'ensemble des lignées de CHO surexprimant ABCG1 présentent une fluorescence bien supérieure aux autres lignées reflétant ainsi une capacité de captation des cellules apoptotiques supérieure. D'autre part, cette capacité de captation qui semble être rapidement saturée pour notre lignée contrôle est en revanche exponentielle pour la lignée CHO ABCG1.

  Ainsi, ABCG1 semble clairement impliqué dans les processus de captation de cellules apoptotiques, tandis que nos résultats n'ont pu mettre en évidence d'implication d'ABCA1.

- Les phénomènes de captation de cellules apoptotiques par la lignée CHO ABCG1 sont réduits par la cytochalasine D tandis que cette molécule n'a aucune répercussion sur la captation de la lignée CHO wild-type montrant que la captation induite par ABCG1 correspond réellement à un phénomène de phagocytose.

  Donc, outre sa capacité à ingérer des cellules apoptotiques nous avons pu démontrer qu'ABCG1 est clairement impliqué dans un phénomène de phagocytose des corps apoptotiques.

- Alors que les taux de captation de cellules non apoptotiques sont identiques entre les lignées wild-type et ABCG1 on peut observer que la lignée surexprimant ABCG1 a une capacité de phagocytose des cellules apoptotiques bien supérieure à la lignée contrôle.

Par conséquent, la phagocytose que réalise les cellules surexprimant ABCG1 est très spécifique des cellules apoptotiques ce qui peut révéler un intérêt notable dans le cadre de l'athérosclérose où l'on connaît les effets délétères de l'accumulation de ces cellules apoptotiques au sein des lésions.

- L'inhibiteur BLT-4, spécifique d'ABCG1, outre sa capacité à réduire de moitié l'efflux de cholestérol, a également la capacité de réduire de près de 50% la capacité de captation des cellules apoptotiques aussi bien dans notre modèle cellulaire transgéniques de CHO que dans une lignée macrophagique murine RAW264.7.

  Ainsi les phénomènes de captation et plus précisément de phagocytose des cellules apoptotiques que nous avons observés précédemment sont bien tout à fait spécifiques d'ABCG1.

- Partant du constat que l'expression d'ABCG1 peut être fortement induite par les agonistes des récepteurs LXR / RXR, nous avons pu tester et mettre en évidence la très forte induction de la phagocytose de cellules apoptotiques dans la lignée RAW264.7

  Ceci ouvre la voie à une nouvelle cible thérapeutique. Les agonistes LXR /RXR semblant avoir la capacité d'induire la phagocytose de cellules apoptotiques probablement via ABCG1.

Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence le rôle d'ABCG1 dans la captation et plus précisément la phagocytose de cellules apoptotiques. Cette phagocytose, réellement spécifique des cellules apoptotiques, peut être induite par des agonistes des récepteurs LXR / RXR ce qui permet de soulever l'hypothèse d'une éventuelle voie thérapeutique visant à éliminer les corps apoptotiques des lésions athérosclérotiques et donc à en diminuer les mécanismes pro-inflammatoires anti-athérogène.

Evaluation de l'implication d'ABCG1 dans la phagocytose

Introduction

Le phénomène de phagocytose des cellules apoptotiques par le macrophage joue un rôle majeur dans la progression de l'athérogenèse.
Il a en effet, été démontré que la délétion de facteurs nécessaires à la phagocytose de cellules apoptotiques tels que le complément C1q, chargé d'induire la reconnaissance de la cellule apoptotique par le phagocyte, via le récepteur Fcγ, chez des souris LDL-R KO entraîne une multiplication par trois de la taille des lésions par rapport aux souris LDL-R KO contrôle[1].
Cet effet s'explique à deux niveaux: d'une part, au sein des plaques avancées, le taux de cellules apoptotiques est augmenté de manière drastique, l'apoptose pouvant, par ailleurs, atteindre tous les types cellulaires présents au sein de la lésion: cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, lymphocytes et macrophages[2]. Cette apoptose est particulièrement critique puisqu'elle peut conduire à une nécrose post-apoptotique particulièrement délétère. En effet, les cellules nécrotiques relarguent des composés toxiques qui amplifient le contexte pro-inflammatoire présent au sein de la lésion. Ainsi, la phagocytose permet de limiter ce phénomène pro-athérogène. D'autre part, certaines études ont montré que la phagocytose de cellules apoptotiques a un effet anti-inflammatoire direct, via la production de molécules anti-inflammatoires par le phagocyte telles que le TGFβ, IL-8, IL-10 [3].

L'implication d'ABC transporteurs dans le phénomène de phagocytose remonte initialement à des études menées en 1991 chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ces études visant alors à identifier divers gènes impliqués dans la phagocytose ont ainsi mis en avant, notamment, le gène ced-7 dont la mutation entraînait un net défaut de clairance des corps apoptotiques[4]. Ce gène fut ultérieurement identifié comme appartenant à la famille des ABC transporteurs et sa protéine comme étant homologue à la

protéine ABCA1[5]. Ainsi, l'homologie entre ced-7 et ABCA1, la très forte expression d'ABCA1 au sein du macrophage et le résultat d'une étude montrant une forte diminution de la phagocytose de thymocytes apoptotiques par les macrophages en présence d'un anticorps anti-ABCA1[6] ont permis de suggérer l'implication d'ABCA1 dans les processus de phagocytose de cellules apoptotiques.

Hamon, en 2000, a ainsi constaté que chez des souris ABCA1 KO si l'apoptose au niveau des zones interdigitales est identique à celle observée chez les souris WT, en revanche, l'accumulation de corps apoptotiques est bien plus marquée chez les souris ABCA1 KO, et ce, malgré un recrutement identique de macrophages, ce qui souligne l'implication du transporteur ABCA1 dans la phagocytose des cellules apoptotiques.
In vitro, l'injection de thymocytes apoptotiques dans le péritoine suivis de l'analyse par FACS des macrophages péritonéaux révèle que chez les souris ABCA1 KO deux fois moins de macrophages sont engagés dans le processus de phagocytose que chez les souris wild-type. On peut ainsi en conclure qu'ABCA1 est impliqué mais il n'est tout de même pas essentiel[7]
D'autre part, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP par ABCA1 pourrait être une caractéristique essentielle pour la phagocytose. En effet, des études menées in vitro sur des cellules Hela, transfectées par une construction d'ABCA1 mutée, démontrent que les mutants dont la fonction de liaison et d'hydrolyse de l'ATP est altérée ont également une activité phagocytique deux fois moindre que celles les cellules transfectées par ABCA1 natif[7]. Toutefois, on peut noter que la mutation des domaines NBD peut entrainer un défaut au niveau du trafic cellulaire de la protéine, ce qui pourrait alors expliquer la réduction de l'activité phagocytique observée.
Un partenaire d'ABCA1 a été identifié: MEGF10, homologue de ced-1, impliqué dans la phagocytose chez le nématode. Il a ainsi été démontré que la surexpression dans des cellules Hela d'ABCA1, comme celle de MEGF10 induit la phagocytose et que la surexpression concomitante des deux protéines potentialise l'induction de phagocytose. D'autre part, l'interaction

de ces deux partenaires a également été constatée avec notamment l'observation d'un transfert d'énergie pouvant éventuellement suggérer un remodelage membranaire via une intervention au niveau du cytosquelette comme le fait la protéine ced-7[8].
Enfin il a également été évoqué qu'ABCA7, ABC transporteur très similaire à ABCA1, pourrait aussi être impliqué dans la phagocytose[9]. Cette hypothèse cohérente avec le fait qu'ABCA7 est régulé par SREBP2 et que SREBP2 peut aussi moduler les processus de phagocytose[10] a été confirmé par l'observation d'une diminution de moitié de l'activité phagocytique dans des cellules 3T3 lors de l'utilisation de siRNA ciblant ABCA7[11].

Toutefois l'implication d'ABCA1 dans les processus de phagocytose est sujette à controverse.
En effet, l'étude menée par Bared a permis l'observation d'un phénomène plutôt surprenant: les fibroblastes de patients Tangier présentent une capacité de phagocytose plus importante que des fibroblastes de patients contrôle. De plus, la transfection d'ABCA1 dans des fibroblastes de patients Tangier diminue la captation de billes confortant cette observation[12]. Toutefois il faut noter que cette observation est faite dans des fibroblastes dont l'implication dans la phagocytose est bien différente de celle que jouent les macrophages.
D'autre part, une autre étude a démontré que l'utilisation de siRNA ciblant ABCA1 n'a aucun impact sur la capacité phagocytique des macrophages murins péritonéaux ce qui est en désaccord total avec les études menées précédemment[9].

Ceci peut mettre en relief, les difficultés actuelles à évaluer la capacité phagocytique des macrophages. On peut notamment noter que l'utilisation d'observations microscopiques telles que l'utilisent les études menées par Luciani ne permet pas de discriminer les cellules apoptotiques ingérées par les phagocytes et les cellules apoptotiques qui ont simplement adhérées aux phagocytes. D'autre part l'ensemble des données utilisant des billes de latex

ne sont pas non plus tout à fait physiologiquement pertinentes. En effet, l'absence de récepteurs spécifiques de la reconnaissance des cellules apoptotiques sur ces billes peut provoquer un biais sur les résultats impliquant un processus de phagocytose spécifique de ces voies.

Une étude menée en 2006 a permis de démontrer que les souris LDL-R KO susceptibles à l'athérosclérose transplantées par des cellules de moelle osseuse ABCG1 KO présentent au niveau de l'aorte un taux de cellules apoptotiques quatre fois plus élevé que les souris contrôles.
Trois hypothèses peuvent expliquer ce résultat:

- Soit la délétion d'ABCG1 entraîne une induction de l'apoptose, ce qui suggère donc qu'ABCG1 jouerait un rôle anti-apoptotique.
- Soit la délétion d'ABCG1 entraîne une réduction de la phagocytose au sein du site provoquant ainsi une accumulation des cellules apoptotiques. Ainsi, ABCG1 aurait un rôle pro-phagocytaire et donc anti-athérogène.
- Soit une combinaison de ces deux premières hypothèses

De par les études menées sur ABCA1 que nous avons précédemment vu nous avons décidé de tester la seconde hypothèse tout en mettant en place une stratégie d'analyse efficace de la phagocytose.

Ainsi, notre étude va permettre d'approfondir les connaissances sur la phagocytose, d'évaluer l'implication d'ABCG1 dans ce processus, et de révéler éventuellement une nouvelle voie thérapeutique de l'athérosclérose.

Matériels et méthodes

Etablissement des lignées stables CHO ABCG1-ABCA1 et CHO ABCG1-Cla1

Les cellules Chinese Hamster Ovarian (CHO) sont des cellules largement utilisées pour l'expression de protéines recombinantes en recherche mais également pour des analyses de phagocytose[13].
Ces cellules représentent par conséquent un modèle de choix pour la mise au point de notre stratégie d'analyse. Le laboratoire dispose déjà de lignées stables CHO surexprimant les transporteurs / récepteurs impliqués dans l'efflux de cholestérol à savoir la lignée CHO Cla-1 établie par le Dr Thiery Huby[14] et la lignée CHO hABCG1 du Dr Wendy Jessup[15]. Afin de pouvoir répondre clairement à nos interrogations concernant l'implication d'ABCG1 et son éventuelle coopération avec d'autres partenaires dans le processus de phagocytose nous avons donc mis au point l'établissement de lignées stables surexprimant à la fois ABCG1 et ABCA1 et ABCG1 et Cla-1.

Pour cela, dans les deux cas, nous sommes partis de la lignée de CHO ABCG1 que nous avons transfecté soit avec le plasmide mABCA1 du Dr Jonathan Smith[16] soit avec le plasmide Cla-1 du Dr Thierry Huby[17].
Nous avons pour cela utilisé la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) et nous nous sommes référés aux instructions du fabricant. Une fois que les cellules, ensemencées en plaque 24 puits, sont arrivées à quasi confluence on remplace leur milieu de culture par 500µl milieu de culture sans antibiotique et on prépare les mix de transfection. D'une part, 5µg de plasmide sont dilués dans 50µl de milieu de culture sans antibiotique et sans sérum et d'autre part, 5µl de Lipofectamine 2000 sont également dilués dans 50µl de milieu de culture sans antibiotique et sans sérum. Ces "pré-mix" sont agités doucement puis laissés 5mn à incuber. Au bout de ces 5mn les deux "pré-mix" sont mélangés et laissés à incuber pendant 20mn à température ambiante. Enfin, le mix est déposé sur les cellules à transfecter et la plaque est laissée 24h à

l'incubateur à 37°C, 5% CO_2. Au bout des 24h le milieu est remplacé par du milieu de culture complet et au bout de 48h par du milieu complet contenant les antibiotiques de sélection pour les plasmides. (G418 à 0.8mg/ml pour les lignées possédant les plasmides ABCA1 ou Cla1 et zéocine à 1mg/ml pour les lignées contenant le plasmide ABCG1)

Culture cellulaire

- La lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovary) est cultivée en flasque de 75cm^2 dans un incubateur à 37°C et 5% de CO2 dans un milieu Ham F12 supplémenté en sérum de veau fœtal (10% v/v), 1mM de glutamine, un mix de pénicilline/streptomycine (100U/ml) ainsi qu'un antibiotique de sélection (G418 à 0.8mg/ml pour les lignées possédant les vecteurs ABCA1 ou Cla1 et zéocine à 1mg/ml pour les lignées contenant le vecteur ABCG1). Les cellules, adhérentes, sont maintenues dans leur milieu de culture jusqu'à confluence. Une fois à confluence, elles sont alors lavées deux fois au PBS puis décollées de la flasque par ajout de trypsine durant quelques minutes afin d'être diluées au 1/10ème dans 10ml de milieu frais. Lorsque des tests de phagocytose sont réalisés les cellules sont ensemencées dans une plaque 24 puits à une concentration de 400 000 cellules par puits la veille de l'expérimentation.

- La lignée macrophagique murine RAW264.7 est cultivée dans du milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de glutamine et 100U/ml de mix pénicilline/streptomycine dans des flasques de 75cm^2, en incubateur à 37°C et 5% CO_2. Les cellules, cultivées jusqu'à devenir confluentes sont alors lavées deux fois au PBS puis décollées à l'aide de trypsine durant quelques minutes pour enfin être diluées dans 10ml de milieu frais au 1/10ème. Lors des tests de phagocytose les cellules sont ensemencées la veille dans une plaque 24 puits à une concentration de 400 000 cellules par puits.

- Les macrophages murins dérivés de moelle osseuse

Pour chaque souris, la moelle osseuse des tibias et des fémurs est isolée par lavage avec du PBS à l'aide d'une seringue. Les cellules ainsi obtenues sont ensuite centrifugées 5mn à 1500 tours/mn puis les globules rouges sont lysés en présence de 5mL de solution de lyse ACK (Biowhittaker) pendant 5 mn à température ambiante. Après une nouvelle centrifugation 5mn à 1500 tours/mn, les cellules sont mises en suspension dans du milieu de culture DMEM supplémenté par 20% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, 30% de milieu de culture conditionné de cellules L929 (source de M-CSF), 2mM de glutamine et 100U/ml de mix pénicilline/streptomycine puis placé dans un incubateur maintenu à 37°C et 7.5% CO2 pendant 5 jours.

- La lignée monocytaire humaine THP-1, est cultivée en flasque de 150cm2 dans un milieu de culture RMPI supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, 2mM de glutamine et 100U/ml de mix pénicilline/streptomycine dans un incubateur maintenu à 37°C et 5% CO2. Environ une fois par semaine, lorsque ces cellules atteignent une concentration avoisinant les $1x10^6$ cellules/ml, les cellules sont centrifugées (10mn à 500G) puis le culot est resuspendu dans du milieu frais afin d'obtenir une concentration proche de 0.3x106 cellules/ml. Lorsque les cellules sont utilisées pour des tests de phagocytose elles sont ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 500 000 cellules / puits en présence de PMA (Phorbol Myristate Acétate) à une concentration de 50ng/ml permettant ainsi l'activation des monocytes et leur différentiation en macrophages laquelle est achevée après 3 jours.

- La lignée cellulaire Jurkat est une lignée humaine de lymphocytes T que l'on cultive en flasque $150cm^2$ exactement dans les mêmes conditions de culture que les THP-1.

Induction de l'apoptose cellulaire

Une fois la quantité de cellules apoptotiques nécessaires pour l'expérimentation déterminée le nombre de cellules adéquat est prélevé et transféré dans une flasque tout en veillant à ne pas dépasser une concentration de 750 000 cellules / ml afin d'assurer une exposition correcte aux UV pour chaque cellule. La flasque est alors mise durant 15mn en contact avec une plaque UV servant à révéler les gels d'agarose.
Une fois ce délai passé les cellules sont remises à l'incubateur à 37°C, 5% CO_2 durant 4 heures afin de laisser le processus d'apoptose se mettre en place. En parallèle des cellules dites "contrôle" subissent le même traitement que les cellules apoptotiques, à l'exception de l'exposition aux UV afin de contrôler l'efficacité de l'induction de l'apoptose.

Contrôle de l'apoptose cellulaire

L'une des premières étapes nécessaire à la validation de notre technique d'analyse consiste à s'assurer de l'efficacité de l'induction de l'apoptose, tout en veillant à ne pas avoir de cellules nécrotiques dans notre préparation. Pour cela, un kit de détection de l'apoptose de chez Beckman Coulter est utilisé selon les recommandations du fabricant. Au bout des 4 heures d'incubation 100µl de cellules apoptotiques et 100µl de cellules contrôle sont prélevés, et centrifugés 5mn à 500G. Après avoir préparé 1ml de tampon de liaison 1X (100µl de tampon 10X + 900µl d'eau ultra pure) les culots cellulaires sont resupendus dans 100µl de tampon 1X auquel on ajoute 4µl d'iodure de propidium et 0,75µl d'annexine V-FITC fournis dans le kit. Après avoir bien homogénéisé l'ensemble est placé dans la glace et à l'abri de la lumière durant 15mn puis 400µl de tampon 1X est rajouté et la préparation est analysée au cytomètre en flux.

Marquage des cellules apoptotiques

Les cellules apoptotiques sont centrifugées 5mn à 500G puis resuspendues dans 10ml de PBS 1X. Après avoir procédé à la dilution de la calcéine AM (Invitrogen) dans 34µl de PBS + 16µl de DMSO afin d'obtenir une concentration finale de 50µM final, les cellules apoptotiques sont mises en présence de la calcéine AM à raison d'une concentration de 5µM durant 10mn à 37°C afin qu'elles intègrent la calcéine. Cette calcéine une fois intégrée, sera clivée par les estérases cytosoliques et deviendra alors fluorescentes. Ensuite, 40ml de milieu sans sérum est ajouté et les cellules sont placées dans la glace durant 10mn afin de limiter le phénomène de quenching qui pourrait avoir lieu par la suite. Puis enfin les cellules apoptotiques marquées sont lavées 3 fois avec du milieu RPMI sans sérum et resupendues dans ce même milieu à une concentration qui permettra d'ajouter des volumes cohérents dans chaque puits selon le ratio phagocyte / cellules apoptotiques souhaité.

Incubation cellule apoptotique / phagocytes

Les cellules phagocytaires, ensemencées en plaque de culture 24 puits, sont mises en présence des cellules apoptotiques selon le ratio désiré durant 30mn, durée suffisante pour permettre l'internalisation des cellules apoptotiques. Avant l'analyse au cytomètre en flux les cellules sont lavées de façon intensive afin d'éliminer toute cellule apoptotique qui serait fixée mais non phagocytée. Enfin, les phagocytes sont décollés du puits par ajout de 100µl de trypsine et resupendus dans un volume final de 400µl en ajoutant du milieu de culture. Les cellules sont alors prêtes à être analysées par cytométrie en flux.

Résultats

- **Validation de la technique**

  - La mesure de l'apoptose

L'une des premières choses dont nous devons nous assurer est l'efficacité de notre technique d'induction de l'apoptose. Pour cela nous réalisons une mesure de détection de l'apoptose en utilisant le kit Annexine V / IP de Beckmann Coulter, comme décrit dans la partie matériel et méthodes.

La figure suivante représente les résultats types que nous pouvons obtenir lors des mesures d'apoptose. On peut observer sur l'axe des abscisses, le marquage annexine V-FITC destiné à évaluer l'apoptose par reconnaissance des phosphatidylsérines exposées à la surface cellulaire. Tandis que l'axe des ordonnées correspond au marquage à l'iodure de propidium. Cette molécule est un agent intercalant de l'ADN qui va pouvoir pénétrer dans les cellules dont la membrane plasmatique altérée et permet donc la détection de cellules nécrotiques.

Le graphe est donc subdivisé en quatre parties : la partie B3 regroupe les cellules n'ayant pas été marqué ni par l'annexine V, ni par l'iodure de propidium, elle regroupe donc les cellules non apoptotiques et non nécrotiques. Les cellules n'ayant pas été exposées aux UV se situent dans cette partie. En effet, comme nous pouvons le voir sur la Figure 1 93,5% des cellules Jurkat non apoptotiques se concentre dans cette zone.

La partie B4 contient les cellules marquées à l'annexine V et non marquées à l'iodure de propidium il s'agit donc de cellules apoptotiques, ce sont celles qui nous intéressent pour notre expérimentation et l'on peut voir sur la figure 2 qu'elle regroupe 81,1% des cellules Jurkat induites en apoptose, ce qui nous permet de valider notre technique d'induction de l'apoptose qui se révèle très efficace.

Les zones B1 et B2, quant à elles, représentent respectivement les cellules en apoptose secondaire prêtes à devenir nécrotiques et les cellules nécrotiques.

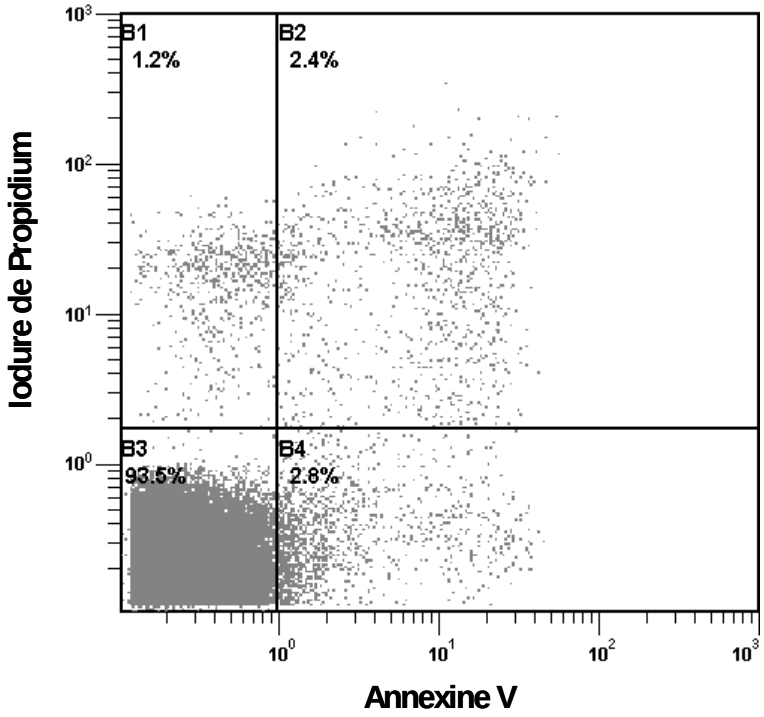


Fig.1: Evaluation par mesure au cytomètre en flux de l'apoptose chez des JURKAT n'ayant pas été soumise aux rayons UV. Ici 93,5% des cellules ne sont ni apoptotiques ni nécrotiques.

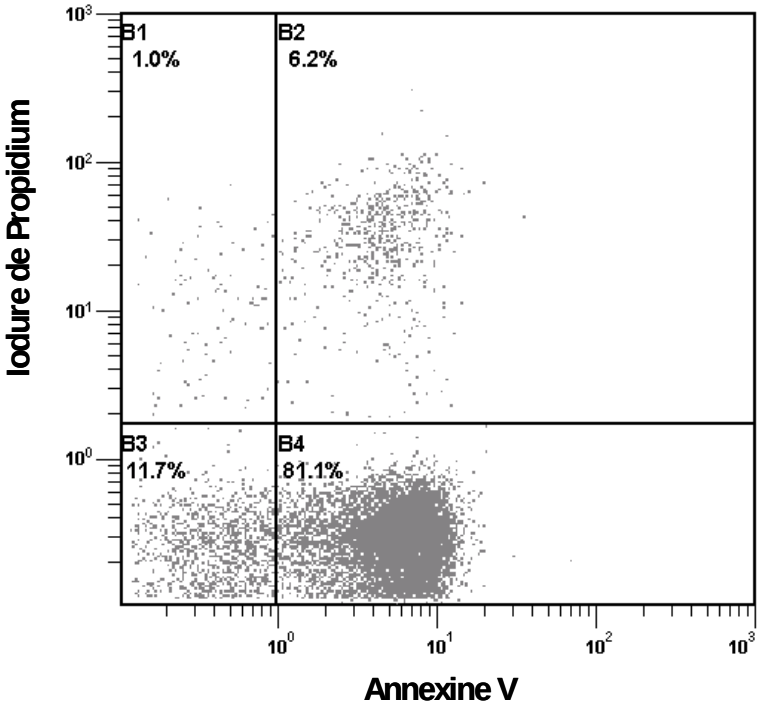


Fig.2: Mesure d'apoptose par cytométrie en flux chez des JURKAT ayant subi une exposition de 15mn aux rayons UV. 81,1% des cellules sont devenues apoptotiques et seules 7,2% sont nécrotiques.

Dans notre étude, nous devons veiller à avoir un minimum de cellules dans ces zones pour ne pas biaiser l'évaluation spécifique de la phagocytose des cellules apoptotiques.

- La détection du complexe phagocyte / cellule apoptotique

Le but de notre projet étant d'évaluer la capacité de phagocytose de cellules apoptotiques de nos phagocytes, nous sommes confrontés à une étape critique qui consiste à mesurer réellement le nombre de phagocytes ayant internalisé une ou plusieurs cellules apoptotiques tout en arrivant à discriminer ces cellules des phagocytes seuls, n'ayant rien ingéré et des cellules apoptotiques qui se seraient simplement fixées aux phagocytes. Pour cette raison les techniques de microscopie à fluorescence classique ou de lecture de plaque ont du être écartées, ne permettant pas une différenciation assez efficace en revanche, comme nous allons le voir, notre méthode d'analyse par cytométrie en flux représente donc ici la technique la plus adéquate.

La figure 3 représente l'analyse au cytomètre de notre population de phagocytes (ici des cellules CHO) sur une simple mesure de paramètres morphologiques: la taille (FS ou Forward Scatter) et la structure cellulaire (SS ou Side Scatter). Les réglages ont été effectués de sorte que l'ensemble des cellules se trouvent dans la fenêtre d'analyse. Puis, sur ce même programme ont été analysées nos Jurkat apoptotiques (fig. 4). Nous avons alors procédé à la mise au point d'une zone de sélection comprenant un minimum de cellules apoptotiques (1,7%) mais un maximum de CHO phagocytaire (58,7%) qui est restée la même pour toutes nos expérimentations sur ce projet. Ainsi, après la période de mise en contact cellules apoptotiques / phagocytes les cellules sont analysées avec le même programme ce qui permet d'obtenir dans la fenêtre d'analyse une majorité des phagocytes, mais quasi aucune cellule apoptotique seule et parmi ces phagocytes celles qui auront ingéré une cellule apoptotique seront détectées via la fluorescence qu'elles auront ingéré par la même occasion.

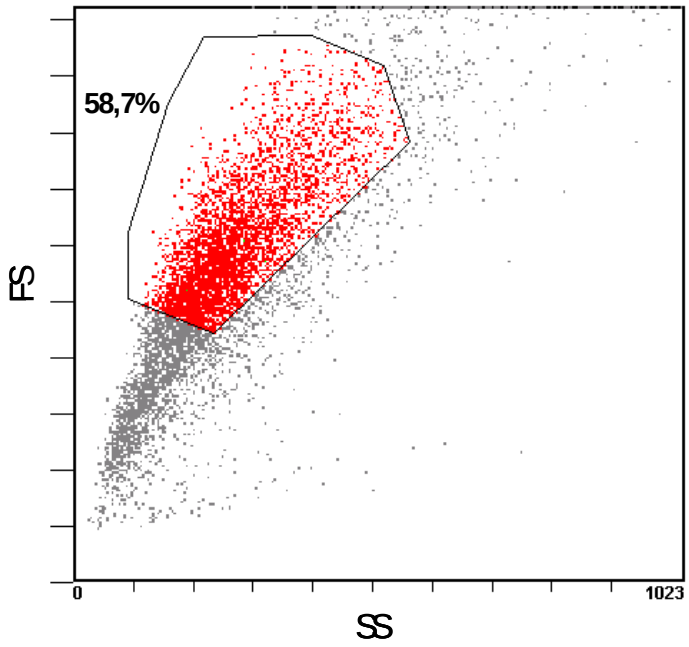


Fig.3: Analyse en cytométrie de flux de la population de phagocytes et mise en place de la fenêtre de sélection qui comprend 58,7% de ces phagocytes

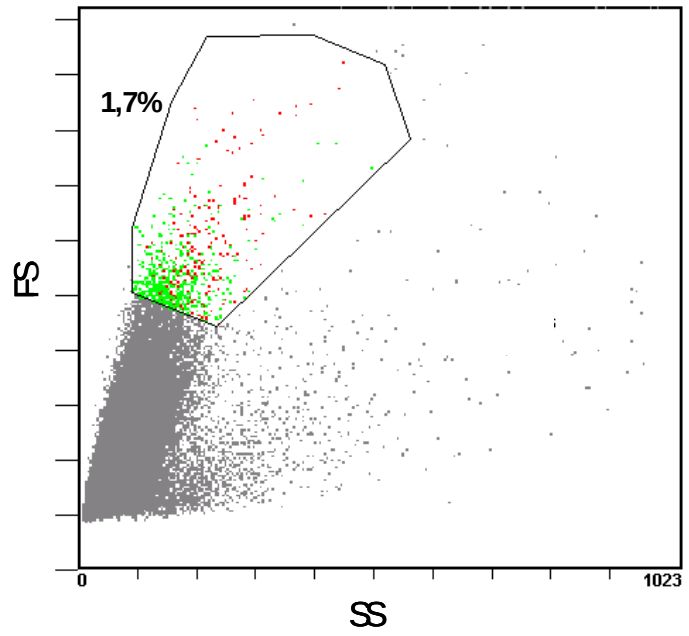


Fig.4: Analyse en cytométrie de flux de la population de cellules apoptotiques (Jurkat) et fenêtre de sélection comprenant 1,7% de cellules apoptotiques

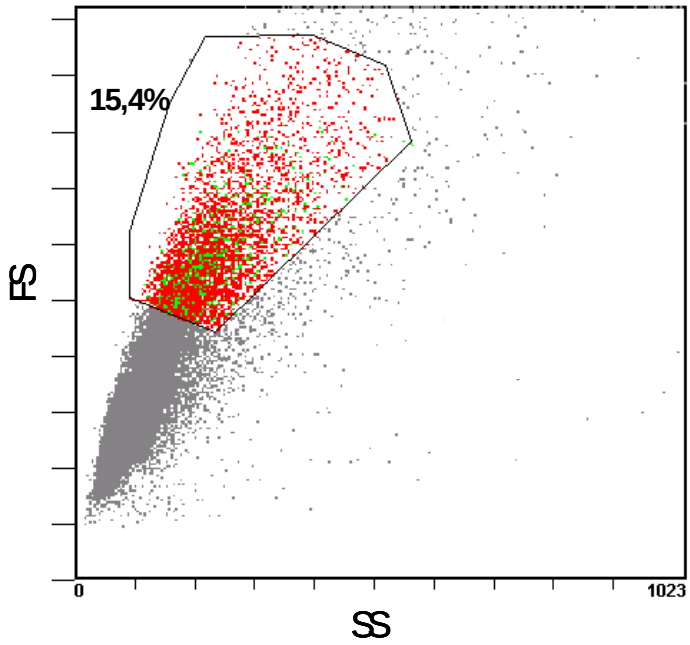


Fig.5: Analyse en cytométrie de flux de la population de phagocytes ayant été mis en contact avec les cellules apoptotiques. La fenêtre de sélection détecte que 15,4% des phagocytes sont devenues fluorescentes par ingestion des cellules apoptotiques marquées à la calcéine

D'autre part, nous pouvons également nous assurer de la validité de notre modèle expérimental en mesurant le taux moyen de fluorescence par cellule (X-Mean) des cellules apoptotiques et des phagocytes ayant ingéré les cellules apoptotiques fluorescentes.

Ainsi, lorsque l'on analyse le taux de fluorescence des cellules sélectionnées dans la figure 5, à savoir les phagocytes ayant ingéré des cellules apoptotiques marquées à la calcéine on obtient le graphe de la figure 6A, qui nous indique que ces cellules ont une unité arbitraire de fluorescence de 18. En revanche, lorsqu'on analyse la population de cellules apoptotiques marquées, que l'on observe dans la sélection de la figure 4, nous pouvons observer en figure 6B un pic pour un niveau de fluorescence d'environ 300. Ainsi, nous disposons d'un contrôle supplémentaire nous permettant de nous assurer de notre capacité à discriminer les cellules apoptotiques et les cellules phagocytaires.

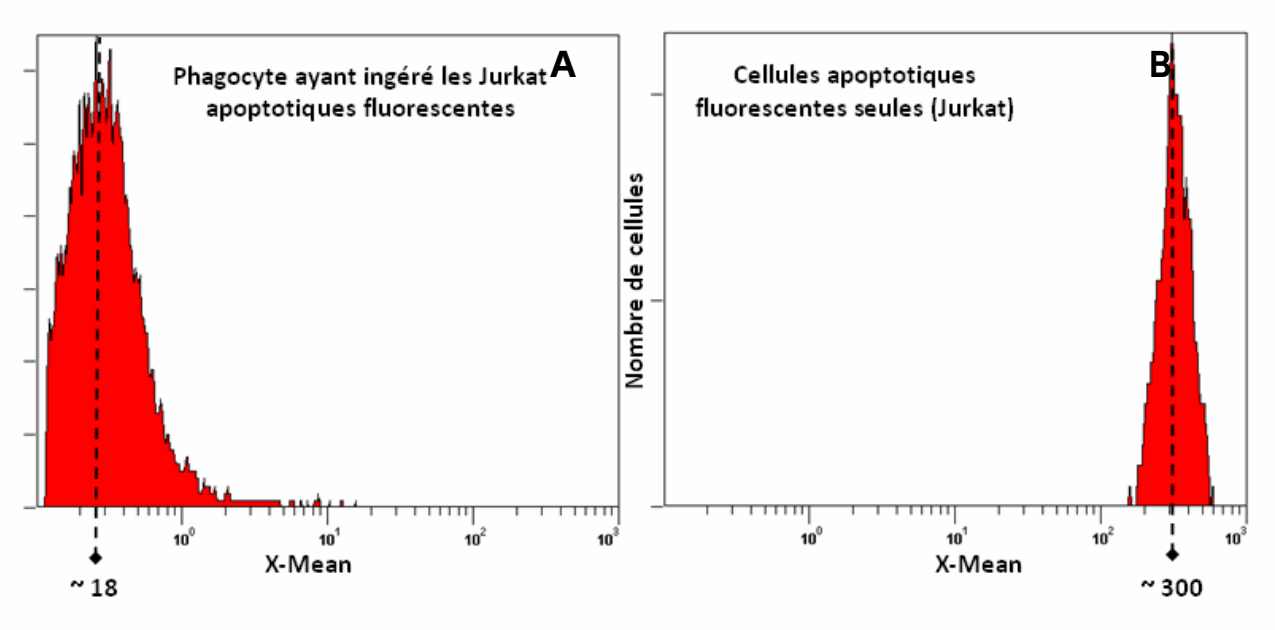


Fig 6. Evaluation du taux de fluorescence de deux populations cellulaires : les phagocytes (CHO) ayant ingéré des Jurkat apoptotiques marquées à la calcéine (A) qui présentent un taux de fluorescence de 18 et les Jurkat apoptotiques marquées à la calcéine (B) qui présentent un taux de fluorescence beaucoup élevé, d'environ 300.

- **<u>Caractérisation de nos modèles cellulaires et évaluation de l'implication d'ABCG1</u>**

  - Mise en évidence de l'implication d'ABCG1 dans les processus de captation

Comme nous l'avons évoqué précédemment les cellules CHO représentent un modèle cellulaire de choix pour l'étude la phagocytose. Grâce aux lignées que nous possédions et à celles que nous avons établies nous allons ainsi pouvoir valider notre modèle et déterminer quel est le rôle d'ABCG1 dans le processus de phagocytose.

Les résultats de la figure 7 démontrent clairement qu'ABCG1 joue un rôle dans l'ingestion de cellules apoptotiques. En effet, alors que la lignée CHO Wild-Type (WT) présente un taux de fluorescence de 3,4 après la mise en contact avec les cellules Jurkat apoptotiques, nous pouvons observer pour les lignées

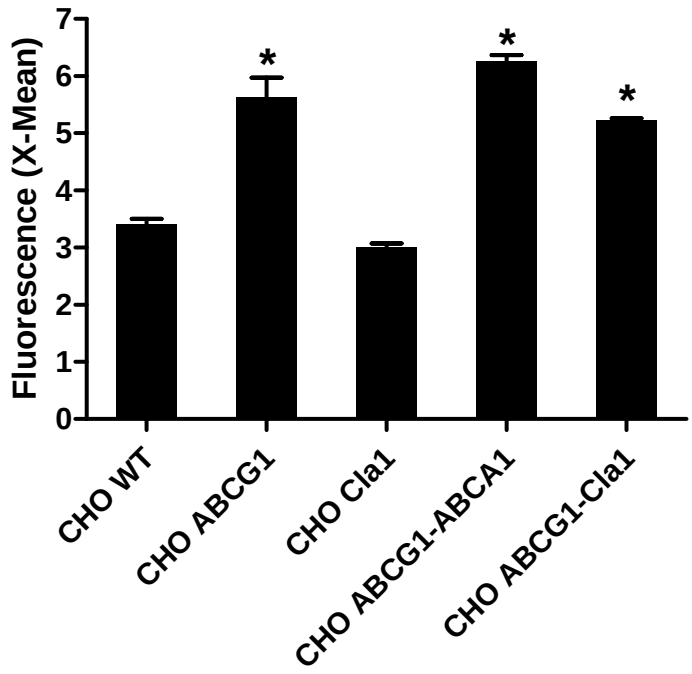


Fig 7. Mesure par cytométrie en flux du taux de phagocytose de nos lignées CHO. Les lignées CHO ABCG1, CHO ABCG1-ABCA1 et CHO ABCG1-Cla1 présentent respectivement des taux de phagocytose augmentés de 66%, 85% et 53% par rapport à celui de la lignée CHO wild-type. La lignée CHO Cla1, elle, ne présente aucune différence significative. *, $p<0.01$ vs CHO WT (One-way ANOVA, Dunnett's posttest)

CHO ABCG1, CHO ABCG1-ABCA1 et CHO ABCG1-Cla1 des taux de fluorescence allant respectivement de 5,2 (CHO ABCG1-Cla1) à 6,3 (CHO ABCG1-ABCA1) soit une augmentation de 53% à 85% du taux de fluorescence par rapport à la lignée sauvage ($p<0.01$).

En revanche, on peut noter que la lignée Cla1 ne présente aucune différence significative avec la lignée Wild-Type ce qui permet de conclure que Cla-1 n'est clairement pas impliqué dans le processus de captation. D'autre part, on peut aussi noter ici que la lignée double ABCA1-ABCG1 ne présente pas de potentialisation des effets d'internalisation par rapport à la lignée CHO ABCG1 seule.

Ainsi, soit ABCA1 n'est pas impliqué dans les processus de captation de cellules apoptotiques, soit nous avons atteints la saturation de notre système de captation faisant qu'aucun effet additif éventuel ne pourrait être observé par rapport à la lignée exprimant ABCG1 seul.
Donc, nous démontrons clairement ici d'une part la validité de notre modèle cellulaire et d'autre part l'implication d'ABCG1, en revanche, nous ne pouvons pas statuer sur un éventuel effet d'ABCA1 dans les processus de captation de corps apoptotiques.

Par la suite, afin de confirmer l'implication d'ABCG1 et de valider notre modèle, nous avons comparé les différences de capacité d'internalisation de nos lignées CHO ABCG1 et CHO wild-type en fonction de la variation du ratio phagocyte / cellule apoptotique. Les résultats (figure 8) permettent d'observer qu'il existe une différence nette entre les deux lignées, la lignée CHO ABCG1 présentant un nombre de cellules devenues fluorescentes et donc une capacité de captation bien plus élevé que la lignée contrôle.

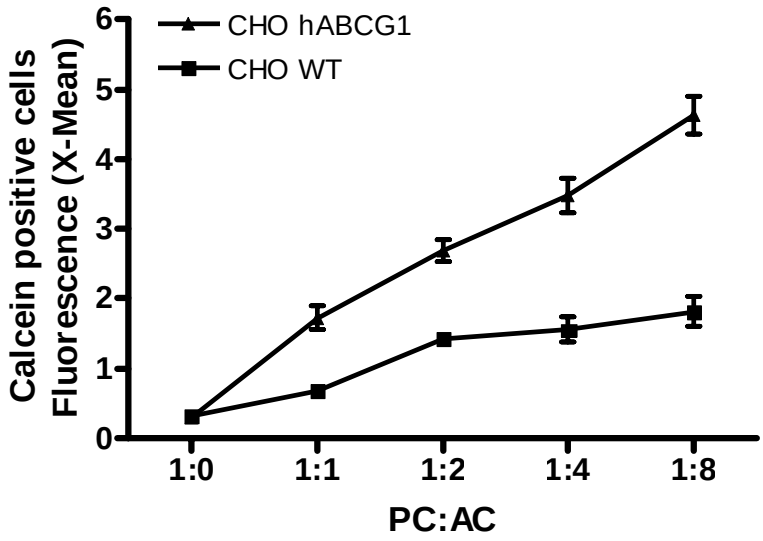


Fig 8. Comparaison des capacités phagocytaires des lignées CHO WT et ABCG1 en fonction du nombre de cellules apoptotiques mises en présence. La lignée CHO ABCG1 présente ici un nombre de cellules fluorescentes, reflétant la capacité d'internalisation beaucoup plus élevé que la lignée contrôle pouvant atteindre jusqu'à 253% du nombre de cellules fluorescentes de la lignée contrôle (ratio 1:8). Ces résultats démontrent l'implication d'ABCG1 dans les processus d'internalisation des corps apoptotiques.

Et si la lignée CHO wild-type semble présenter un plateau à partir d'un ratio de deux cellules apoptotiques par phagocyte en revanche la capacité d'internalisation de la lignée CHO ABCG1 continue d'augmenter de manière exponentielle au moins jusqu'au ratio 1:8.

Ainsi, à ce niveau, la lignée ABCG1 présente 2,5 fois plus de fluorescence que la lignée wild-type indiquant clairement une augmentation drastique du nombre de cellules internalisées. Ces résultats nous permettent de confirmer formellement l'implication d'ABCG1 dans les processus de captation des cellules apoptotiques.

- Caractérisation de ce processus de captation des cellules apoptotiques

Si nous avons pu démontrer l'implication d'ABCG1 dans les processus de captation, en revanche, rien ne nous permet de conclure qu'il s'agisse réellement d'un processus de phagocytose. Par conséquent, nous avons mené la même expérience que précédemment en présence d'un agent spécifique : la cytochalasine D. Cette molécule, couramment utilisée dans la littérature permet de bloquer tout mouvement d'actine, elle est donc couramment utilisée pour inhiber de manière spécifique les processus de phagocytose[18]. Les résultats, présentés sur la figure 9 nous permettent de voir que si l'utilisation de la cytochalasine D sur la lignée wild-type n'a aucun impact sur sa capacité d'internalisation en revanche elle entraine une forte réduction de la captation de cellules apoptotiques par les cellules surexprimant ABCG1. Ainsi, cela nous permet de conclure que le processus d'internalisation que nous avions observé pour la lignée CHO ABCG1 précédemment correspond bien à un mécanisme de phagocytose.

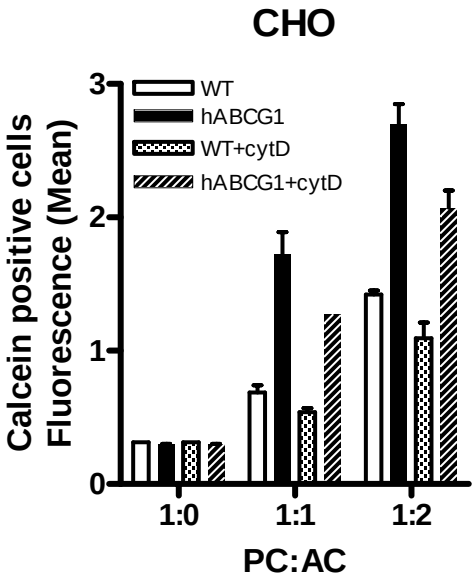


Fig 9. Mesure des taux de phagocytose des lignées CHO WT et ABCG1 en présence ou non d'un inhibiteur de la phagocytose : la cytochalasine D. Si cette molécule n'a aucun impact sur la captation de la lignée WT en revanche elle diminue significativement celle de la lignée ABCG1.

- Caractérisation du processus de phagocytose

Nous venons de démontrer que le processus de captation des cellules apoptotiques dans les cellules CHO ABCG1 correspondait à un mécanisme de phagocytose. Comme nous l'avons vu précédemment dans le contexte pathologique de l'athérosclérose, la phagocytose de cellules apoptotiques révèlerait un réel intérêt physiologique c'est pourquoi nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à ce processus de captation. Ainsi, nous pouvons voir sur la figure 10 que la captation de cellules non apoptotiques n'est pas caractéristique de la lignée CHO ABCG1, le nombre de cellules internalisées étant identique pour les cellules CHO WT et les cellules CHO ABCG1. En revanche, en ce qui concerne le processus de phagocytose de cellules apoptotiques on peut observer qu'il est largement réalisé par les cellules surexprimant ABCG1. On peut donc en conclure qu'ABCG1 est très spécifiquement impliqué dans la phagocytose de cellules apoptotiques ce qui peut se révéler crucial dans l'athérogenèse.

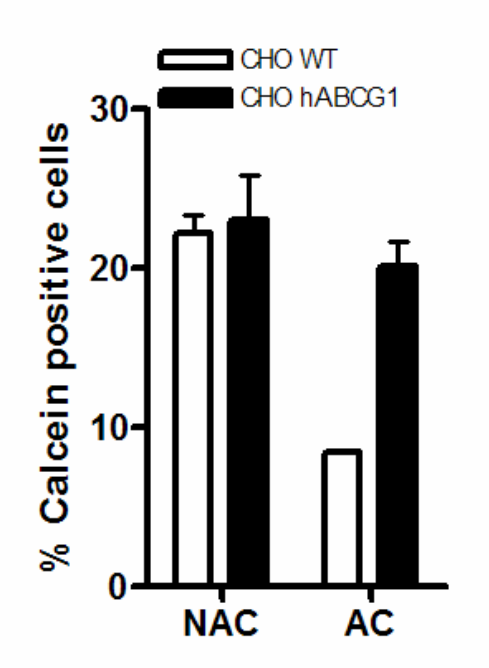


Fig 10. Comparaison des processus de captation entre les lignées CHO WT et CHO ABCG1.
Le processus de captation de la lignée CHO ABCG1 caractérisé pour être un vrai processus de phagocytose concerne principalement la captation de cellules apoptotiques tandis que le processus de captation des cellules de la lignée CHO WT concerne majoritairement des cellules non apoptotiques.

- Spécificité de l'implication d'ABCG1

Afin de confirmer l'implication spécifique d'ABCG1 dans les mécanismes de phagocytose de cellules apoptotiques nous avons décidé de moduler l'activité d'ABCG1 et d'en évaluer l'impact sur la phagocytose.

Les inhibiteurs BLT (Block Lipid Transport) sont des molécules qui présentent la propriété d'inhiber l'efflux de cholestérol selon un mécanisme encore totalement inconnu. Or, nous avons observé que la molécule BLT-4 avait la capacité d'inhiber de manière très spécifique l'efflux de cholestérol dépendant d'ABCG1 entraînant une réduction de près de 70% ($p<0.0001$) de l'efflux (fig. 11A). C'est pourquoi afin de moduler l'activité d'ABCG1 sur la phagocytose nous avons décidé d'utiliser cette molécule.

Nous pouvons ici constater qu'outre son impact sur l'efflux de cholestérol dépendant d'ABCG1, BLT-4 a aussi la propriété de réduire très fortement (près de -60%, $p<0.05$) la phagocytose de cellules apoptotiques dépendante

d'ABCG1 ce qui permet de confirmer l'implication spécifique d'ABCG1 dans les processus de phagocytose de cellules apoptotiques que nous avons précédemment observé.

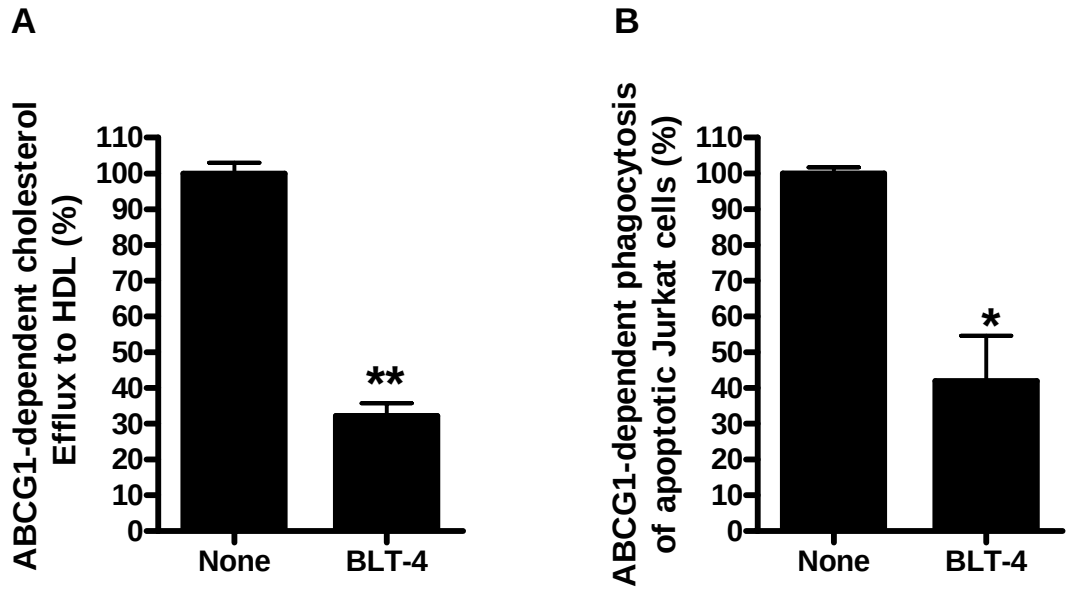


Fig 11. Impact de la molécule BLT-4 sur l'efflux de cholestérol ABCG1-dépendant (A) et sur les processus de phagocytose de corps apoptotiques dépendant d'ABCG1 (B) dans les cellules CHO ABCG1. La spécificité d'inhibition de l'efflux dépendant d'ABCG1 par BLT-4 nous a permis de cibler cette molécule en tant qu'inhibitrice spécifique d'ABCG1. Or, cette inhibition se répercute également sur les processus de phagocytose via ABCG1 nous prouvant l'implication spécifique de ce transporteur dans la phagocytose. *, $p<0.05$ et **, $p<0.0001$ (Test T).

- Implication d'ABCG1 dans le macrophage

Alors que les résultats obtenus avec notre modèle cellulaire sont clairement explicites sur l'implication d'ABCG1 dans la phagocytose de cellules apoptotiques nous avons voulu déterminer ce qui avait lieu au sein du macrophage. En effet, ce type cellulaire est celui qui est le plus impliqué dans les processus de phagocytose de cellules apoptotiques au sein de la plaque et son implication pourrait donc se révéler déterminante en termes d'évolution de la pathologie. Nous avons donc utilisé la lignée

macrophagique murine RAW264.7 pour déterminer si la molécule BLT-4 a également un impact au niveau de la phagocytose de cellules apoptotiques et donc si ABCG1 est également impliqué dans ce processus au sein du macrophage. Comme nous pouvons le voir sur la figure 12, l'utilisation de la molécule BLT-4 induit dans le macrophage murin une réduction considérable de la phagocytose de cellules apoptotiques de près de 50% ($p<0.005$) suggérant qu'ABCG1 pourrait jouer un rôle tout à fait majeur dans la phagocytose de cellules apoptotiques au sein du macrophage.

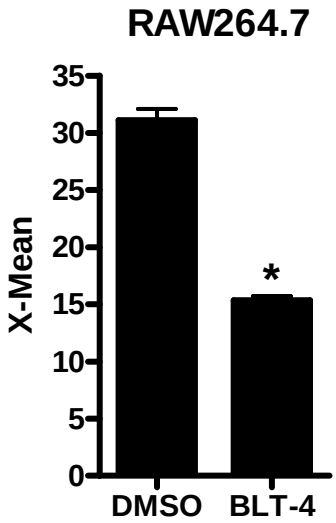


Fig 12. Mesure de la capacité de phagocytose de la lignée macrophagique murine RAW264.7 en présence ou non de la molécule BLT-4, démontrée pour inhiber spécifiquement ABCG1. Ici la capacité de phagocytose est inhibée de 50% en présence de cette molécule permettant de suggérer une implication majeure d'ABCG1 dans la phagocytose au sein du macrophage. *, $p<0.005$ (Test T).

- Impact de l'utilisation d'agonistes LXR/RXR sur la phagocytose de cellules apoptotiques

Au sein du macrophage les agonistes LXR / RXR sont connus pour induire l'efflux de cholestérol via une induction de l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1. Nous avons voulu tester ici leur impact sur la phagocytose. Les deux expérimentations réalisées avec des agonistes naturels des récepteurs LXR / RXR (22-hydroxcholesterol et 9-cis retinoic acid) et avec un

agoniste synthétique du récepteur LXR (T0901317) démontrent clairement l'induction du phénomène de phagocytose pouvant atteindre notamment pour la stimulation par le 9cisRA et 22OH-chol une augmentation de 50% de la capacité phagocytique des macrophages murins RAW264.7. Ainsi, nous pouvons ici envisager que ces agonistes, pourrait stimuler notamment ABCG1 et donc induire la phagocytose de cellules apoptotiques. Ces résultats sont intéressants puisqu'ils ouvrent la voie à une éventuelle nouvelle stratégie thérapeutique.

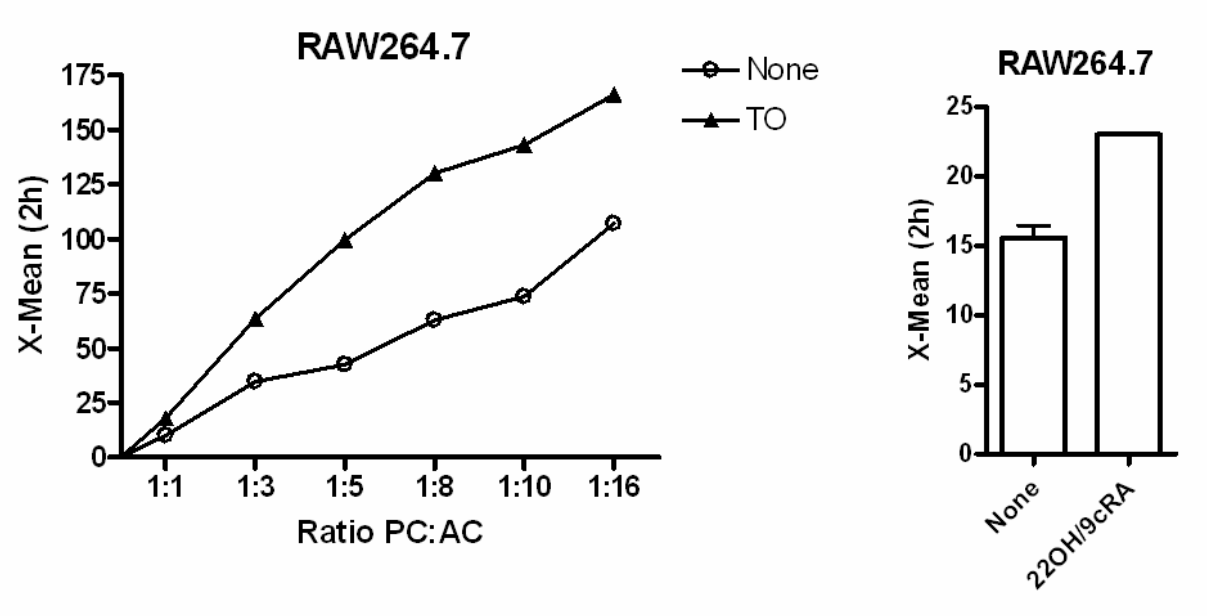


Fig 13. Mesure de la capacité phagocytique des phagocytes (RAW264.7) en présence ou non d'agonistes LXR/RXR (220H/9cisRA ou T0). Cette étude montre une nette augmentation des taux de cellules ingérées en présence de ces agonistes aux récepteurs LXR/RXR pouvant être dûe en partie à une induction de l'expression d'ABCG1.

- Caractérisation de la phagocytose ABCG1-dépendante

Nous avons pu obtenir grâce à une collaboration avec les laboratoires de Miranda Van Eck (Pays-Bas) et Wendy Jessup (Australie) des macrophages murins primaires wild-type et KO pour ABCG1.

Afin de mieux caractériser le processus de phagocytose dans lequel intervient ABCG1 nous avons décidé d'analyser la phagocytose de billes recouvertes ou non d'IgG afin de déterminer si la phagocytose impliquant

ABCG1 fait intervenir la voie de phagocytose du récepteur Fcγ qui est l'une des voies possibles de phagocytose comme nous l'avons vu en introduction.
Les résultats présentés en figure 14 nous permettent de voir qu'il n'y a aucune différence entre les macrophages WT et ABCG1 KO en ce qui concerne la captation de billes recouvertes d'IgG. Ceci nous permet de conclure qu'ABCG1 n'est donc pas impliqué dans la voie de phagocytose faisant intervenir le récepteur Fcγ. En revanche les macrophages ABCG1 KO présentent un taux de phagocytose de billes non coatées bien inférieur à celui des macrophages WT confirmant une nouvelle fois l'implication d'ABCG1 dans les processus de phagocytose.

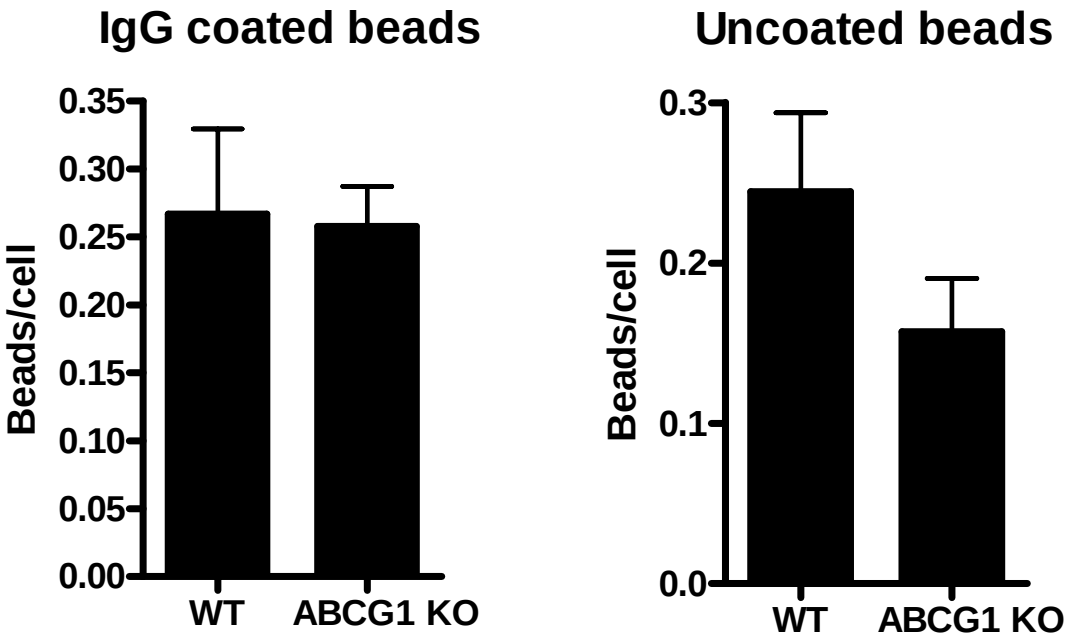


Fig 14. Evaluation de la captation de billes recouvertes ou non d'IgG par des macrophages murins dérivés de moelle osseuse de souris WT ou ABCG1 KO. Il n'existe aucune différence entre les BMDM WT et KO ABCG1 en ce qui concerne la phagocytose de billes recouvertes d'IgG ce qui indique qu'ABCG1 n'intervient pas dans les processus de phagocytose faisant intervenir la voie du récepteur Fcγ. En revanche, la diminution que l'on obtient pour les macrophages ABCG1 KO pour la phagocytose de billes non coatées nous indique qu'ABCG1 intervient bien dans les processus de phagocytose mais indépendamment de la voie Fcγ.

Discussion

L'une de nos hypothèses initiales consistait en une implication du transporteur ABCG1 dans le processus de phagocytose des corps apoptotiques présents au sein de la lésion. Si cette hypothèse est confirmée en revanche nous ne pouvons pas exclure que l'accumulation de cellules apoptotiques dans l'étude de Baldan, ne provient pas également d'une augmentation du taux d'apoptose en l'absence d'ABCG1.

Ces travaux ont donc permis, dans un premier temps, de mettre au point un système efficace de mesure de la phagocytose de cellules apoptotiques discriminant de manière sûre l'analyse des cellules apoptotiques et des phagocytes.

Mais elle nous a surtout permis de mettre en évidence un rôle jusque là tout à fait inconnu d'ABCG1 dans les processus de phagocytose de cellules apoptotiques. En effet, comme nous avons pu le voir, seules les cellules surexprimant ABCG1 présente la particularité de capter beaucoup plus de cellules apoptotiques que la lignée contrôle ce qui est tout à fait pertinent avec les résultats obtenus avec la molécule BLT-4, qui inhibe spécifiquement ABCG1 entrainant ainsi une très forte réduction de la capacité phagocytique des cellules.
Ces résultats nous ont aussi permis de mettre en avant la spécificité de la phagocytose qui privilégie largement la captation des cellules apoptotiques, ceci est important dans le cadre physiopathologique de l'athérosclérose où l'on sait que beaucoup de cellules apoptotiques se trouvent au sein de la lésion et qu'elles y jouent un rôle largement pro-inflammatoire et pro-athérogène. Ceci laisse penser qu'il existe un mécanisme sous-jacent de reconnaissance tels que l'un de ceux que nous avons cité dans l'introduction et qui vise à induire la phagocytose mediée par ABCG1.

Cette conclusion et l'observation d'une forte induction de la phagocytose de cellules apoptotiques sous agonistes LXR / RXR permet d'envisager une éventuelle voie thérapeutique tout à fait intéressante et pouvant passer éventuellement par ABCG1.

D'autre part, l'implication d'ABCA1 dans ces processus de phagocytose de cellules apoptotiques ayant également été démontrée on peut envisager qu'il puisse exister un système de coopération entre ABCA1 et ABCG1 pour réguler ces mécanismes de phagocytose. Il pourrait donc être intéressant de chercher à démontrer une éventuelle coopération. De même, ABCA1 et ABCG1, connus initialement pour médier l'efflux de cholestérol doivent probablement être régulés de manière très fine afin de soit favoriser l'efflux ou la phagocytose selon les conditions environnantes. Il serait donc intéressant de se pencher sur les diverses voies de régulation de ces mécanismes de phagocytose et d'efflux.

L'utilisation de macrophages déficients pour ABCG1 nous a aussi permis de constater que la voie phagocytaire dans laquelle ABCG1 est impliquée ne passe pas par la voie du récepteur Fcγ mais il reste encore beaucoup de choses à caractériser pour pouvoir comprendre parfaitement le mode d'action d'ABCG1 dans la phagocytose. Il serait notamment pertinent de réaliser les expérimentations sur macrophages humains (lignée et culture primaire). D'autre part, l'utilisation de siRNA ciblant ABCG1 pourrait également nous permettre d'inhiber de manière très efficace ABCG1 et d'en mesurer l'impact sur la phagocytose.
Enfin il pourrait être intéressant d'évaluer les profils inflammatoires en termes d'ARNm de ces macrophages puisque ces étapes de phagocytose jouent largement sur les états d'inflammations au sein de la lésion.

Réferences

1. Bhatia VK, Yun S, Leung V, Grimsditch DC, Benson GM, Botto MB, Boyle JJ, Haskard DO. Complement C1q reduces early atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Am J Pathol.* 2007;170:416-26.
2. Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:469-75.
3. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101:890-8.
4. Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in Caenorhabditis elegans. *Genetics.* 1991;129:79-94.
5. Wu YC, Horvitz HR. The C. elegans cell corpse engulfment gene ced-7 encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell.* 1998;93:951-60.
6. Luciani MF, Chimini G. The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *Embo J.* 1996;15:226-35.
7. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol.* 2000;2:399-406.

8. Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M, Mignotte V, Zhou Z, Chimini G. Cooperation between engulfment receptors: the case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS ONE.* 2006;1:e120.

9. Jehle AW, Gardai SJ, Li S, Linsel-Nitschke P, Morimoto K, Janssen WJ, Vandivier RW, Wang N, Greenberg S, Dale BM, Qin C, Henson PM, Tall AR. ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *J Cell Biol.* 2006;174:547-56.

10. Castoreno AB, Wang Y, Stockinger W, Jarzylo LA, Du H, Pagnon JC, Shieh EC, Nohturfft A. Transcriptional regulation of phagocytosis-induced membrane biogenesis by sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13129-34.

11. Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Sato R, Yokoyama S. ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis. *J Lipid Res.* 2006;47:1915-27.

12. Bared SM, Buechler C, Boettcher A, Dayoub R, Sigruener A, Grandl M, Rudolph C, Dada A, Schmitz G. Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15:5399-407.

13. Mikerov AN, Wang G, Umstead TM, Zacharatos M, Thomas NJ, Phelps DS, Floros J. Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa more than do SP-A1 variants. *Infect Immun.* 2007;75:1403-12.

14. Maillard P, Huby T, Andreo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-

BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *Faseb J.* 2006;20:735-7.

15. Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:534-40.

16. Smith JD, Waelde C, Horwitz A, Zheng P. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem.* 2002;277:17797-803.

17. Treguier M, Moreau M, Sposito A, Chapman MJ, Huby T. LDL particle subspecies are distinct in their capacity to mediate free cholesterol efflux via the SR-BI/Cla-1 receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771:129-38.

18. Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol.* 1987;105:1473-8.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Ainsi, ces travaux ont permis de réellement mieux comprendre le rôle majeur que peut jouer ABCG1 dans le développement de l'athérosclérose.

En effet, nous avons d'abord pu démontrer dans une première partie, l'implication d'ABCG1 dans la formation de cellules spumeuses et dans l'athérogenèse. Comme nous avons pu l'observer, ABCG1 est impliqué dans l'efflux de cholestérol lorsque le macrophage n'est pas chargé en cholestérol indiquant qu'ABCG1 ne permet pas l'élimination du cholestérol en excès dans les cellules spumeuses. La compréhension de ces mécanismes est essentielle est ouvre notamment la voie à des perspectives thérapeutiques très intéressantes où l'on pourrait envisager de stimuler l'efflux de cholestérol dans les macrophages via la voie ABCG1.

Dans une seconde partie, nous avons pu démontrer qu'ABCG1 jouait également un rôle dans les processus de phagocytose des cellules apoptotiques. Ce processus est absolument déterminant puisqu'il va permettre notamment d'influer sur le profil inflammatoire de la plaque. Ici aussi nous avons pu mettre en évidence l'implication des agonistes LXR / RXR qui permettent de stimuler ce processus de phagocytose confirmant l'intérêt thérapeutique que peuvent présenter ABCG1 et les agonistes LXR / RXR.

Ainsi en se resituant dans le contexte plus globale de l'athérogenèse on se rend compte aisément qu'ABCG1 est impliqué dans au moins deux voies d'évolution de la pathologie. Ce transporteur joue donc un rôle déterminant dans l'évolution de la pathologie et ce même si l'absence de pathologie liée à sa mutation comme il en existe pour ABCA1 et la maladie de Tangier aurait pu en laisser douter.

Sur le plan thérapeutique il serait intéressant d'approfondir l'action des agonistes PPAR sur ABCG1 dans les mécanismes d'efflux et de phagocytose

des corps apoptotiques. En effet, ABCG1 étant largement modulé par les agonistes LXR/RXR, les molécules thérapeutiques activant les récepteurs PPARs pourraient se révéler être d'efficaces inducteurs de l'efflux ou de la phagocytose et donc à terme elles pourraient être la cible du développement d'un nouvel axe thérapeutique.

Notre cible étant ABCG1 au sein du macrophage il serait maintenant vraiment intéressant de pouvoir mettre au point une lignée murine qui serait mutée pour ABCG1 mais au sein du macrophage exclusivement ce qui nous permettrait de discriminer *in vivo* le rôle d'ABCG1 macrophagique du rôle d'ABCG1 dans les autres types cellulaires.

Il pourrait également être intéressant d'étudier le rôle d'ABCG1 dans d'autres aspects de l'athérosclérose tels que l'aspect plus inflammatoire notamment puisqu'il a été démontré que la délétion d'ABCG1 *in vivo* pouvait moduler le profil inflammatoire. Et afin d'approfondir sur le plan thérapeutique de l'intérêt d'ABCG1 il pourrait être intéressant de mener des études approfondies sur l'impact des agonistes des récepteurs PPAR chez des macrophages humains dérivés de monocytes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Stary et al.
A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association
Circulation 85(1): 391-405 (1992)

[2] Stary et al.
A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.
Circulation 89(5): 2462-2478 (1994)

[3] Stary et al.
A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association
Circulation 92(5): 1355-1374 (1995)

[4] Sanz & Fayad.
Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease
Nature 451: 953-957 (2008)

[5] Raines & Ross
Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis
British Heart Journal 69(1): S30-37 (1993)

[6] Skålén et al.
Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis
Nature 417: 750-754 (2002)

[7] Oörni et al.
Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions
Journal of Lipid Research 41(11): 1703-1714 (2000)

[8] Li & Glass
The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention
Nature Medicine 8: 1235-1242 (2002)

[9] de Villiers & Smart
Macrophage scavenger receptor and foam cell formation
Journal of Leukocyte Biology 66(5): 740-746 (1999)

[10] Smith et al.
Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E
Proceedings of the National Academy of Sciences 92(18): 8264-8268 (1995)

[11] Stoneman et al.
Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques
Circulation Research 100(6): 884-893 (2007)

[12] Boring et al.
Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis.
Nature 394(6696): 894-897 (1998)

[13] Lesnik et al.
Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis.
Journal of Clinical Investigation 111(3): 333-40 (2003)

[14] Cathcart et al.
Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic.
Journal of Leukocyte Biology 38(2): 341-50 (1985)

[15] Leusen et al.
Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine 128(5): 461-76 (1996)

[16] McMillen et al.
Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice.
Circulation 111(21): 2798-2804 (2005)

[17] Nicholls & Hazen
Myeloperoxidase and cardiovascular disease.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 25(6): 1102-1111 (2005)

[18] Zheng et al.
Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages.
Journal of Biological Chemistry 280(1): 38-47 (2005)

[19] Cathcart et al.
Oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) by activated human monocytes and the cell lines U937 and HL60.

In Vitro Cellular and Developmental Biology 24(10): 1001-1008 (1988)

[20] Mazumder et al.
Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells.
Journal of Immunology 159(4): 1938-1944 (1997)

[21] Mukhopadhyay et al.
Ceruloplasmin enhances smooth muscle cell- and endothelial cell-mediated low density lipoprotein oxidation by a superoxide-dependent mechanism.
Journal of Biological Chemistry 271(25): 14773-14778 (1996)

[22] Van Lenten et al.
Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures.
Journal of Clinical Investigation 96(6): 2758-2767 (1995)

[23] Cathcart et al.
Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex.
Journal of Lipid Research 32(1): 63-70 (1991)

[24] Sun & Funk
Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein.
Journal of Biological Chemistry 271(39): 24055-24062 (1996)

[25] Auchère & Capeillère-Blandin
NADPH as a co-substrate for studies of the chlorinating activity of myeloperoxidase.
Biochemical Journal 343(3): 603-613 (1999)

[26] Barry-Lane et al.
p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice.
Journal of Clinical Investigation 108(10):1513-22 (2001)

[27] Ross
Atherosclerosis--an inflammatory disease.
New England Journal of Medicine 340(2): 115-126 (1999)

[28] Miller et al.
Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors.
Current Opinion in Lipidology 14(5): 437-445 (2003)

[29] Stoll & Bendszus
Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization.
Stroke 37(7): 1923-1932 (2006)

[30] Gordon
Alternative activation of macrophages.
Nature Reviews - Immunology 3(1): 23-35 (2003)

[31] Porcheray et al.
Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation.
Clinical and Experimental Immunology 142(3): 481-9 (2005)

[32] Beaudeux et al.
Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 42(2): 121-131 (2004)

[33] Galis et al.
Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.
Journal of Clinical Investigation 94(6): 2493-2503 (1994)

[34] Carrell et al.
Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms.
Circulation 105(4): 477-482 (2002)

[35] Jonasson et al.
Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.
Arteriosclerosis 6(2): 131-138 (1986)

[36] Zeini et al.
Differential sensitivity to apoptosis among the cells that contribute to the atherosclerotic disease.
Biochemical and Biophysical Research Communications 363(2): 444-450 (2007)

[37] Wolf & Green
Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases.
Journal of Biological Chemistry 274(29): 20049-20052 (1999)

[38] French & Tschopp
Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors.
Cell Death and Differentiation 10(1): 117-123 (2003)

[39] Adams & Cory
The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.
Science 281(5381): 1322-1326 (1998)

[40] Simon et al.
Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction.
Apoptosis 5(5): 415-418 (2000)

[41] Lizard et al.
Induction of apoptosis and of interleukin-1beta secretion by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression.
FEBS Letters 419(2-3): 276-280 (1997)

[42] Lizard G et al.
Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production.
FASEB Journal 12(15): 1651-1663 (1998)

[43] Yao & Tabas
Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway.
Journal of Biological Chemistry 275(31): 23807-23813 (2000)

[44] Hardwick et al.
Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein.
Journal of Pathology 179(3): 294-302 (1996)

[45] Cai et al.
Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 24(12): 2263-2270 (2004)

[46] Sarih et al.
Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis.
Biochemical and Biophysical Research Communications 191(2): 503-508 (1993)

[47] Ball et al.
Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma.
Atherosclerosis 114(1): 45-54 (1995)

[48] Kockx & Herman
Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?
Cardiovascular Research 45(3): 736-746 (2000)

[49] Lauber et al.
Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal.
Cell 113(6): 717-730 (2003)

[50] Verhoven et al.
Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes.
Journal of Experimental Medicine 182(5): 1597-1601 (1995)

[51] Moffatt et al.
Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes.
Journal of Immunology 162(11): 6800-6810 (1999)

[52] Azuma et al.
Alterations in cell surface phosphatidylserine and sugar chains during apoptosis and their time-dependent role in phagocytosis by macrophages.
Biological and Pharmaceutical Bulletin 25(10):1277-81 (2002)

[53] Price et al.
Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a beta 2-glycoprotein I-dependent manner.
Journal of Immunology 157(5): 2201-8 (1996)

[54] Balasubramanian & Schroit
Characterization of phosphatidylserine-dependent beta2-glycoprotein I macrophage interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes.
Journal of Biological Chemistry 273(44): 29272-29277 (1998)

[55] Hanayama et al.
Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes.
Nature 417(6885): 182-187 (2002)

[56] Nakano et al.
Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6.
Journal of Biological Chemistry 272(47): 29411-29414 (1997)

[57] Hamon et al.
ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine.
Nature Cell Biology 2(7): 399-406 (2000)

[58] Williamson et al.
Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells.
PLoS ONE 15;2(1): e729. (2007)

[59] Jehle et al.
ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages.
Journal of Cell Biology 14;174(4):547-56 (2006)

[60] Platt et al.
Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro.
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 93(22): 12456-12460 (1996)

[61] Fukasawa et al.
SRB1, a class B scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells.
Experimental Cell Research 222(1):246-250 (1996)

[62] Savill et al.
Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis.
Journal of Clinical Investigation 90(4): 1513-1522 (1992)

[63] Ramprasad et al.
The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68.
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 92(21): 9580-9584 (1995)

[64] Sambrano & Steinberg
Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine.
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 92(5): 1396-1400 (1995)

[65] Fadok et al.
The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes.
Cell Death and Differentiation 5(7):551-562 (1998)

[66] Devitt et al.
Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.
Nature 392(6675): 505-509 (1998)

[67] Oka et al.
Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells.

Proceedings of National Academy of Sciences of USA 95(16): 9535-9540 (1998)

[68] Fadok et al.
A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.
Nature 405(6782): 85-90 (2000)

[69] Miyanishi et al.
Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor.
Nature 450(7168): 435-439 (2007)

[70] Park et al.
BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module.
Nature 450(7168): 430-4 (2007)

[71] Erwig & Henson
Clearance of apoptotic cells by phagocytes.
Cell Death and Differentiation 15(2): 243-250 (2008)

[72] Schrijvers et al.
Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 25(6): 1256-1261 (2005)

[73] Casley-Smith & Day
The uptake of lipid and lipoprotein by macrophages in vitro: microscopical study.
Quarterly Journal of Physiology and Cognate Medical Sciences 51(1): 1-10 (1966)

[74] Brown & Goldstein
Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts.
Cell 6(3): 307-316 (1975)

[75] Brown & Goldstein
A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood.
Proceedings National Academy of Sciences of USA 96(20): 11041-11048 (1999)

[76] DeBose-Boyd et al.
Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi.
Cell 23;99(7): 703-712 (1999)

[77] Penman et al.
The type I and type II bovine scavenger receptors expressed in Chinese hamster ovary cells are trimeric proteins with collagenous triple helical domains comprising noncovalently associated monomers and Cys83-disulfide-linked dimers.
Journal of Biological Chemistry 266(35): 23985-23993 (1991)

[78] Emi et al.
Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene.
Journal of Biological Chemistry 268(3): 2120-2125 (1993)

[79] Gough et al.
A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake.
Journal of Lipid Research 39(3): 531-543 (1998)

[80] Doi et al.
Charged Collagen Structure Mediates the Recognition of Negatively Charged Macromolecules by Macrophage Scavenger Receptors
The Journal of Biological Chemistry 268(3): 2126-2133

[81] Robbins & Horlick
Macrophage scavenger receptor confers an adherent phenotype to cells in culture. Biotechniques 25:240-244 (1998)

[82] Suzuki et al.
A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection.
Nature 386(6622): 292-296 (1997)

[83] Freeman et al.
Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: Lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 88: 4931-4935

[84] Fitzgerald et al.
Lipopolysaccharide induces scavenger receptor A expression in mouse macrophages: a divergent response relative to human THP-1 monocyte/macrophages.
Journal of Immunology 164(5): 2692-2700 (2000)

[85] Clinton et al.
Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis.
American Journal of Pathology 140(2): 301-316 (1992)

[86] Geng et al.
Interferon-oy Inhibits Scavenger Receptor Expression and Foam Cell Formation in Human Monocyte-derived Macrophages
Journal of clinical immunology 89: 1322-1330 (1999)

[87] van Lenten & Fogelman
Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor-alpha.
Journal of Immunology 148(1):112-6 (1992)

[88] Bottalico et al.
Transforming growth factor-beta 1 inhibits scavenger receptor activity in THP-1 human macrophages.
Journal of Biological Chemistry 266(34): 22866-22871 (1991)

[89] Nagy et al.
Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma
Cell 93(2): 229-240 (1998)

[90] Kern et al.
Alternatively spliced mRNA molecules of the thrombospondin receptor (CD36) in human PBMC.
European Journal of Immunogenetic 26(5): 337-342 (1999)

[91] Babitt et al.
Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae.
Journal of Biological Chemistry 272(20): 13242-13249 (1997)

[92] Tandon et al.
Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion.
Journal of Biological Chemistry 264(13): 7576-7583 (1989)

[93] Silverstein et al.
Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion.
Journal of Clinical Investigation 84(2): 546-552 (1989)

[94] Endemann et al.
CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein.
Journal of Biological Chemistry 268(16): 11811-11816 (1993)

[95] Podrez et al.
Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species
Journal of Clinical Investigation 105(8): 1095-1108 (2000)

[96] Febbraio et al.
Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice.
Journal of Clinical Investigation 105: 1049-1056 (2000)

[97] Babaev et al.
Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 20(12):2593-9 (2000)

[98] Moore et al.
Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice.
Journal of Clinical Investigation 115(8):2192-201 (2005)

[99] Huh et al.
Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation.
Blood 87(5): 2020-2028 (1996)

[100] Han et al.
Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.
Journal of Biological Chemistry 275(2): 1241-1246 (2000)

[101] Tontonoz et al.
PPARg Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL
Cell 93: 241-252 (1998)

[102] Moore et al.
The role of PPAR-γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake
Nature Medicine 7(1): 41-47 (2001)

[103] Rabinowitz & Gordon
Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli.
Journal of Experimental Medicine 174(4): 827-836 (1992)

[104] de Villiers et al.
Macrophage Phenotype in Mice Deficient in Both Macrophage-Colony–Stimulating Factor (Op) and Apolipoprotein E
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 18:631-640 (1998)

[105] Ramprasad et al.
The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68
Proceedings ofnational Academy of Sciences of USA 92: 9580-9584 (1995)

[106] Yoshida et al.
Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor
Biochemistry Journal 334: 9-13 (1998)

[107] Smirnova et al.
Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation
American Journal of Physiology 287(2): 782-790 (2004)

[108] Draude & Lorenz
TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages.
American Journal of Physiology 278(4): 1042-1048 (2000)

[109] Van der Westhuyzen et al.
Cathepsin-D-dependent initiation of the hydrolysis by lysosomal enzymes of apoprotein B from low-density lipoproteins.
European Journal of Biochemistry 112(1): 153-160 (1980)

[110] Brown & Goldstein
A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis
Sciences 232: 34-47 (1986)

[111] Akala et al.
Lysosomal Enzymes Are Released From Cultured Human Macrophages, Hydrolyze LDL In Vitro, and Are Present Extracellularly in Human Atherosclerotic Lesions
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 23: 1430-1436 (2003)

[112] Kathryn et al.
Evidence for a Cholesterol Transport Pathway from Lysosomes to Endoplasmic Reticulum That Is Independent of the Plasma Membrane
Journal of Biological Chemistry 273(7): 4266-4274 (1998)

[113] Breslow & Soccio
Intracellular cholesterol transport.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 24(7):1150-60 (2004)

[114] Xie et al.
Cholesterol balance and metabolism in mice with loss of function of Niemann-Pick C protein.
American Journal of Physiology 276(2): E336-344 (1999)

[115] Buhman et al.
Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases.
Biochimica and Biophysica Acta 1529(1-3): 142-154. (2000)

[116] Khelef et al.
Enrichment of acyl coenzyme A:cholesterol O-acyltransferase near trans-golgi network and endocytic recycling compartment.
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 20(7):1769-76 (2000)

[117] Tabas
The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages.
Current Opinion in Lipidology 6: 260-268 (1995)

[118] Bernard et al.
Influence of high density lipoprotein on esterified cholesterol stores in macrophages and hepatoma cells.
Arteriosclerosis 10(1): 135-144 (1990)

[119] Wang et al.
Gene expression of acyl coenzyme A cholesterol acyltransferase is upregulated in human monocytes during differentiation and foam cell formation.
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 16: 809-814 (1996)

[120] Panousis et al.
Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferongamma.
Journal of Lipid Research 41: 75-83. (2000)

[121] Tabas
Free cholesterol-induced cytotoxicity. A possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions.
Trends Cardiovascular Medicine 7:256-263 (1997)

[122] Ghosh et al.
Mobilization of cytoplasmic CE droplets by overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase.

Journal of Lipid Research 44(10):1833-40 (2003)

[123] Mazzone et al.
Progesterone blocks intracellular translocation of free cholesterol derived from cholesteryl ester in macrophages
Journal of Lipid Research 36(3):544-51 (1995)

[124] Zhao et al.
Macrophage-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase significantly reduces atherosclerosis and lesion necrosis in Ldlr mice.
Journal of Clinical Investigation 117(10):2983-92 (2007)

[125] Glomset
The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction.
Journal of Lipid Research 9(2):155-167 (1968)

[126] Lewis & Rader
New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport.
Circulation research 96(12):1221-32 (2005)

[127] Rothblat & Phillips
Mechanism of cholesterol efflux from cells: effects of acceptor structure and concentration.
Journal of Biological Chemistry 257: 4775-4782 (1982)

[128] Johnson et al.
Cholesterol transport between cells and high density lipoproteins.
Biochimica and Biophysica Acta 1085: 273-298 (1991)

[129] Rothblat et al.
Cell cholesterol efflux: integration of old an new observations provides new insights.
Journal of Lipid Research 40:781-796 (1999)

[130] Curtiss et al.
Apolipoprotein E and atherosclerosis
Current Opinion in Lipidology 11: 243-251 (2000)

[131] Mazzone & Reardon
Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3.
Journal of Lipid Research 35(8):1345-53 (1994)

[132] Basheeruddin et al.
Transcriptional and post-transcriptional control of apolipoprotein E gene expression in differentiating human monocytes

Journal of Biological Chemistry 267: 1219-1224 (1992)

[133] Duan et al.
Tumor necrosis factor-a modulates monocyte/macrophage apoprotein E gene expression.
Journal of Clinical Investigation 96: 915-922 (1995)

[134] Mazzone et al.
Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol.
Journal of Lipid Research 30: 1055-1064 (1989)

[135] Lucic et al.
Regulation of macrophage apoE secretion and sterol efflux by the LDL receptor
Journal of Lipid Research 48 (2): 366. (2007)

[136] Galetto et al.
Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region.
Biochemical Journal 357(Pt 2):521-7 (2001)

[137] Zannis et al.
Intracellular modifications of human apolipoprotein E.
Journal of Biological Chemistry 261(29):13415-21 (1986)

[138] Marmillot et al.
Desialylation of human apolipoprotein E decreases its binding to human high-density lipoprotein and its ability to deliver esterified cholesterol to the liver.
Metabolism 48(9):1184-92 (1999)

[139] Basu et al.
Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes.
Journal of Biological Chemistry 257(16):9788-95 (1982)

[140] Von Eckardstein et al.
ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages.
FASEB Journal 15(9): 1555-61 (2001)

[141] Ranalletta et al.
Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1-/- bone marrow.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(10):2308-15 (2006)

[142] Out et al.
Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 27(3):594-9 (2007)

[143] de la Llera-Moya et al.
Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface.
Jounal of Lipid Research 40: 575-580 (1999)

[144] Graf et al.
The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae.
Journal of Biological Chemistry 274: 12043–12048 (1999)

[145] Yancey et al.
HDL phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor-BI (SR-BI). Journal of Biological Chemistry 275:36596-36604 (2000)

[146] Tréguier et al.
LDL particle subspecies are distinct in their capacity to mediate free cholesterol efflux via the SR-BI/Cla-1 receptor.
Biochimica and Biophysica Acta 1771(2): 129-38 (2007)

[147] Chen et al.
Scavenger receptor-BI (SR-BI) inhibits ATP binding cassette transporter 1 (ABC1)-mediated cholesterol efflux in macrophages
Journal of Biological Chemistry 275(40):30794-800 (2000)

[148] Yvan-Charvet et al.
SR-BI inhibits ABCG1-stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL
Journal of lipid Research 49: 107-114 (2008)

[149] Wang et al.
Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo.
Journal of Clinical Investigation 117(8):2216-24 (2007)

[150] Dean et al.
The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.
Genome Research 11(7): 1156-1166 (2001)

[151] Annilo et al.
Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region on 2q34.
Cytogenetic and Genome Research 98(2-3) :169-176 (2002)

[152] Jiang et al.
PPAR and LXR activators regulate ABCA12 expression in human keratinocytes.
Journal of Investigative Dermatology 128(1): 104-9 (2008)

[153] Kim et al.
Abca7 null mice retain normal macrophage phosphatidylcholine and cholesterol efflux activity despite alterations in adipose mass and serum cholesterol levels.
Journal of Biological Chemistry 280(5): 3989-3995 (2005)

[154] Linsel-Nitschke et al.
Potential role of ABCA7 in cellular lipid efflux to apoA-I.
Journal of Lipid Research 46(1): 86-92 (2005)

[155] Jehle et al.
ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages.
Journal of Cell Biology 174(4): 547-556 (2006)

[156] Iwamoto et al.
ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis.
Journal of Lipid Research 47(9): 1915-1927 (2006)

[157] Chan et al.
ATP-binding cassette transporter A7 regulates processing of amyloid precursor protein in vitro
Journal of Neurochemistry 106(2): 793-804 (2008)

[158] Smit et al.
Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease.
Cell 75: 451-462 (1993)

[160] Huang et al.
Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3.
Journal of Biological Chemistry 278(51): 51085-51090 (2003)

[161] Engel et al.
The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages
Biochemical and Biophysical Research Communications 288(2): 483-488 (2001)

[162] Annilo et al.
Human and mouse orthologs of a new ATP-binding cassette gene, ABCG4.
Cytogenetics and Cell Genetics 94(3-4): 196-201 (2001)

[163] Wang et al.
LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(6): 1310-1316 (2006)

[164] Plösch et al.
Abcg5/Abcg8-independent pathways contribute to hepatobiliary cholesterol secretion in mice.
American Journal of Physiology 291(3): G414-423 (2006)

[165] Berge et al.
Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters.
Science 290: 1771-1775 (2000)

[166] Yu et al.
Ezetimibe normalizes metabolic defects in mice lacking ABCG5 and ABCG8.
Journal of Lipid Research 46(8): 1739-1744 (2005)

[167] Luciani et al.
Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9.
Genomics 21(1): 150-9 (1994)

[168] Santamarina-Fojo et al.
Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter.
Proceedings of National Academy of Sciences of USA 97(14):7987-92 (2000)

[169]Pullinger et al.
Analysis of hABC1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms.
Biochimical and Biophysical Research Communications 271: 451-455 (2001)

[170] Clee et al.
Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease.
Circulation 103(9):1198-205 (2001)

[171] Santamarina-Fojo et al.
Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter
Proceedings in National Academy of Sciences of USA 97(14): 7987-7992 (2000)

[172] Costet et al.
Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor.
Journal of Biological Chemistry 275(36): 28240-28245 (2000)

[173] Schwartz et al.
ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR.
Biochemical and Biophysical Research Communications 274(3): 794-802. (2000)

[174] Janowski et al.
Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta.
Proceedings in National Academy of Sciences of USA 96(1): 266-271 (1999)

[175] Chinetti et al.
PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway.
Nature Medicine 7(1): 53-58 (2001)

[176] Singaraja et al.
Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1.
Journal of Biological Chemistry 276(36): 33969-33979 (2001)

[177] Li et al.
Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma.
Journal of Clinical Investigations 114(11): 1564-1576 (2004)

[178] Rigamonti et al.
Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 28(6): 1050-1059 (2008)

[179] Oram et al.
ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages.
Journal of Biological Chemistry 275(44): 34508-34511 (2000)

[180] Le Goff et al.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(3): 527-533 (2006)
Identification of the cAMP-responsive enhancer of the murine ABCA1 gene: requirement for CREB1 and STAT3/4 elements.

[181] Porsch-Ozcurumez et al.
The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux.
Journal of Biological Chemistry 276(15): 12427-12433 (2001)

[182] Suzuki et al.
Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via Liver X receptor-independent mechanism.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 24(3): 519-525 (2004)

[183] Panousis & Zuckerman
Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 20(6): 1565-1571 (2000)

[184] Khovidhunkit et al.
Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR.
Journal of Lipid Research 44(9): 1728-1736 (2003)

[185] Varghese et al.
Effects of sirolimus on mesangial cell cholesterol homeostasis: a novel mechanism for its action against lipid-mediated injury in renal allografts.
American Journal of Physiology 289(1):F43-48 (2005)

[186] Mei et al.
Interleukin-10 inhibits the down-regulation of ATP binding cassette transporter A1 by tumour necrosis factor-alpha in THP-1 macrophage-derived foam cells.
Cell Biology International 31(12): 1456-1461 (2007)

[187] Rubic & Lorenz
Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10
Cardiovascular Research 69(2): 527-535 (2006)

[188] Panousis et al.
TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma.
Journal of Lipid Research 42(5): 856-863 (2001)

[189] Langmann et al.
Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages.
Biochemical and Biophysical Research Communications 257(1): 29-33 (1999)

[190] Wang & Oram
Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1.
Journal of Biological Chemistry 277(7): 5692-5697 (2002)

[191] Wang et al.
A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I.
Journal of Clinical Investigations 111(1): 99-107 2003)

[192] Haidar et al.
cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts.
Journal of Lipid Research 43(12): 2087-2094 (2002)

[193] Murthy et al.
LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells.
Journal of Lipid Research 43(7): 1054-1064 (2002)

[194] Neufeld et al.
Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter.
Journal of Biological Chemistry 276(29):27584-90 (2001)

[195] Rust et al.
Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1.
Nature Genetics 22(4): 352-355 (1999)

[196] Bodzioch et al.
The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease.
Nature Genetics 22(4): 347-351 (1999)

[197] Brooks-Wilson et al.
Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency.
Nature Genetics 22(4): 336-345 (1999)

[198] Oram & Yokoyama
Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids.
Journal of Lipid Research 37(12): 2473-2491 (1996)

[199] Langmann et al.
Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages.
Biochemical and Biophysical Research Communications 257(1): 29-33 (1999)

[200] Singaraja et al.
Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis
Journal of Clinical Investigations 110(1): 35-42 (2002)

[201] Orsó et al.
Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice.
Nature Genetics 24(2): 192-196 (2000)

[202] Lee & Parks
ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation.
Current Opinion in Lipidology 16(1): 19-25 (2005)

[203] Brunham et al.
Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo.
Journal of Clinical Investigation 116(4): 1052-1062 (2006)

[204] Timmins et al.
Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I.
Journal of Clinical Investigations 115(5): 1333-1342 (2005)

[205] Brunham et al.
Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment.
Nature Medicine 13(3): 241-242 (2007)

[206] Oram et al.
ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol.
Journal of Biological Chemistry 276(43): 39898-39902 (2001)

[207] Hamon et al.
Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1.
Blood 90(8): 2911-2915 (1997)

[208] Becq et al.
ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in Xenopus laevis oocytes
Journal of Biological Chemistry 272(5): 2695-2699 (1997)

[209] Hamon et al.
ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine
Nature Cell Biology 2(7): 399-406 (2000)

[210] Luciani & Chimini
The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death.

EMBO Journal 15(2): 226-235 (1996)

[211] Hamon et al.
ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells.
Biochimical and Biophysical Acta 1585(2-3): 64-71 (2002)

[212] Bared et al.
Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells.
Molecular Biology of the Cell (12):5399-5407 (2004)

[213] Jehle et al.
ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages.
Journal of Cellular Biology 174(4): 547-556 (2006)

[214] Oram & Heinecke
ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease.
Physiological Reviws 85(4): 1343-1372 (2005)

[215] Croop et al.
Isolation and characterization of a mammalian homolog of the Drosophila white gene.
Gene 185(1): 77-85 (1997)

[216] Langmann et al.
Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene.
Biochimical and Biophysical Acta 1494(1-2):175-80 (2000)

[217] Lorkowski et al.
Genomic sequence and structure of the human ABCG1 (ABC8) gene.
Biochemical and Biophysical Research Communications 280(1): 121-31 (2001)

[218] Kennedy et al.
Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein.
Journal of Biological Chemistry 276(42): 39438-39447 (2001)

[219] Lorkowski et al.
Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease.
Biochemical and Biophysical Research Communications 283(4): 821-30 (2001)

[230] Wang et al.
LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(6): 1310-1316 (2006)

[231] Nakamura et al.
Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein.
Journal of Biological Chemistry 279(44): 45980-45989 (2004)

[232]Wang et al.
ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins.
Proceedings in National Academy of Sciences of USA 101(26): 9774-9779 (2004)

[233] Baldán et al.
Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr-/- and ApoE-/- mice transplanted with Abcg1-/- bone marrow.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(10): 2301-2307 (2006)

[234] Ranalletta et al.
Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1-/- bone marrow.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(10): 2308-2315 (2006)

[235] Out et al.
Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(10): 2295-300 (2006)

[236] Yvan-Charvet et al.
Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice.
Journal of Clinical Investigations 117(12): 3900-3908 (2007)

[237] Out et al.
Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 28(2): 258-64 (2008)

[238] Vaughan & Oram
ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins.

[221] Venkateswaran et al.
Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols.
Journal of Biological Chemistry 275(19): 14700-14707 (2000)

[222] Akiyama et al.
Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux.
Molecular and Cellular Biology 22(8): 2607-2619 (2002)

[223] Klucken et al.
ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport.
Proceedings in National Academy of Sciences of USA 97(2): 817-822 (2000)

[224] Thomassen et al.
ABCG1 is deficient in alveolar macrophages of GM-CSF knockout mice and patients with pulmonary alveolar proteinosis.
Journal of Lipid Research 48(12): 2762-2768 (2007)

[225] Kaplan et al.
Bacterial lipopolysaccharide induces expression of ABCA1 but not ABCG1 via an LXR-independent pathway.
Journal of Lipid Research 43(6): 952-959 (2002)

[226] Khovidhunkit et al.
Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR.
Journal of Lipid Research 44(9): 1728-1736 (2003)

[227] Gerbod-Giannone et al.
TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells.
Proceedings in National Academy of Sciences of USA 103(9): 3112-3117 (2006)

[228] Cserepes et al.
Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization.
Biochemical and Biophysical Research Communications 320(3): 860-867 (2004)

[229] Gelissen et al.
ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 26(3): 534-540 (2006)

Journal of Biological Chemistry 280(34): 30150-30157 (2005)

[239] Vaughan & Oram
ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions.
Journal of Lipid Research 44(7): 1373-1380 (2003)

[240] Terasaka et al.
High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1.
Proceedings of the National Academy of Sciences 104(38): 15093-8 (2007)

[241] Seres et al.
Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types.
Biochimica and Biophysica Acta 1778(10): 2378-87 (2008)

[242] Mauldin et al.
Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus.
Circulation 17(21): 2785-2792 (2008)