HAL
open science

Identification de nouveaux acteurs du métabolisme des HDL : impact sur les maladies cardiovasculaires

Lise Hardy

To cite this version:

Lise Hardy. Identification de nouveaux acteurs du métabolisme des HDL : impact sur les maladies cardiovasculaires. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS546 . tel-03128927

HAL Id: tel-03128927

https://theses.hal.science/tel-03128927

Submitted on 2 Feb 2021

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université Sorbonne Université

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX ACTEURS DU METABOLISME DES HDL : IMPACT SUR LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Défendue publiquement par

Lise Hardy

Le 16 décembre 2019

Devant le jury composé de

Pr. Bruno Fève	Président
Pr. Romain Barrès	Rapporteur
Pr. David Masson	Rapporteur
Dr. Mathilde Varret	Examinatrice
Dr. Laurent Yvan-Charvet	Examinateur
Dr. David-Alexandre Trégouët	Invité
Dr. Wilfried Le Goff	Directeur de thèse

SOMMAIRE

Sommaire I

Remerciements IV

Liste des publications VI

Valorisation VII

Abréviations IX

Liste des figures et tableaux XI

Résumé français XII

Résumé anglais XIII

Avant-propos 1

Etude bibliographique 7

A. Les lipoprotéines de haute densité 7

1. Structure des HDL 7

a. Protéome 9

b. Lipidome 12

c. Glycome 18

d. miR-nome 18

2. Métabolisme des lipoprotéines HDL 18

a. Biogenèse des HDL 18

b. Remodelage intravasculaire 23

B. HDL et maladies cardiovasculaires liées à l'atherosclerose 39

1. L'athérosclérose : une pathologie lipido-oxydo-inflammatoire 39

a. Initiation 39

b. Progression 41

c. Stabilisation 41

d. Rupture 42

2. Concentrations plasmatiques de HDL-C et risque cardiovasculaire 42
3. Rôle athéroprotecteur des HDL 44
a. Les monocytes 44
b. Les macrophages 46
c. Les cellules endothéliales 50
d. Cellules musculaires lisses 52
e. Autres activités athéroprotectrices des HDL 53
f. Lipoprotéines HDL dysfonctionnelles 55
C. Les thérapies par les lipoprotéines HDL : défis présents et futurs 56
1. Les stratégies hypolipémiantes 56
a. Les statines 56
b. Les thérapies de combinaison 58
2. La thérapie par les lipoprotéines HDL 60
a. Les inhibiteurs de la CETP 60
b. La thérapie par les molécules d'apoA-I 64
D. La régulation épigénétique du métabolisme des HDL 68
1. Les microARNs et le métabolisme des HDL 69
a. Biogenèse des microARNs 70
b. Fonctions des miRs 71
c. Stabilité des miRs 72
d. Impact des miRs sur le rôle athéroprotecteur des lipoprotéines HDL 72
2. Modifications des histones et impact sur le métabolisme des HDL 75
a. Le code des histones 76
b. Impact sur les gènes du métabolisme lipidique 78
3. La méthylation de l'ADN et les lipoprotéines HDL 79
a. Méthylation et déméthylation de l'ADN : principes 79
b. Méthylation de l'ADN : causes et conséquences 81

c. Impacts sur le métabolisme des HDL 89

4. Collaboration des systèmes de régulation épigénétique 93

a. Coopération entre méthylation et modifications des histones 93

b. Coopération avec les miRs 94

c. Les facteurs de transcription 95

Objectifs des travaux 97

Travaux de recherche 98

Discussion générale 203

Article collaboratif 213

Bibliographie 221

REMERCIEMENTS

De nombreuses personnes importantes ont leur place ici.
Désolée pour celles que j'aurais inconsciemment oubliées.

Bruno, merci d'avoir accepté de présider cette soutenance, et de vous être arrangé pour cela. Rien ne vous y obligeait, j'en suis flattée.

David, merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteur.

Romain, je te remercie pleinement. Ton aide a été précieuse au cours de ma thèse, scientifiquement d'abord, puis humainement. Merci de répondre présent pour cette dernière étape. Ton avis compte, j'espère être à sa hauteur.

Mathilde, ravie de te compter parmi nous pour cette étape importante pour moi. Merci à toi.

Laurent, je te remercie d'avoir accepté d'être mon examinateur aujourd'hui.

David-Alexandre, je te dois un grand merci pour toute la confiance que tu m'as accordée. Sans toi, pas de TF10, et probablement une thèse différente pour moi, en tout cas sans cette jolie collaboration. Elle nous a permis de nous investir ensemble sur d'autres projets, que je suis fière d'avoir menés à terme avec Will, Florian et toi. Tu as toute mon estime.

Will, tu mérites plus qu'un immense merci. Tu m'as donné la confiance nécessaire à l'épanouissement scientifique et humain inhérent à la thèse. Je te remercie de ton implication et de ton intérêt constants dans mon travail. Il est évident que j'ai acquis ma maturité scientifique en grande partie grâce à toi. Merci pour tes encouragements quotidiens, ta positivité, ton écoute, ton humour et ton soutien indéfectibles. Je pense pouvoir dire qu'on a passé quatre belles années. Je te souhaite tout le meilleur.

Eric, mille mercis également, pour ta confiance, ton humanité et ton soutien. Je suis fière d'avoir travaillé à tes côtés. Merci de m'avoir appris tant de choses et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et de m'écouter, tout simplement. A toi aussi, tout le meilleur.

Lucie, merci pour tout : tout ce que tu m'as appris, les moments off, les fous rires en manip... J'espère que tu te souviendras longtemps du jour où j'ai eu peur de ma main. Ton soutien a été énorme, et ce même depuis que tu n'es plus là quotidiennement. Je t'embrasse et te souhaite pleins de bonheurs persos et pros !

La team Génépi, merci pour votre soutien sans faille. Alain, Philippe, Olivier, vous m'avez fait marrer, et je crois vous avoir fait marrer aussi ! Vous m'avez écoutée, épaulée, questionnée… Merci du temps que vous avez pris pour moi et pour les belles discussions que nous avons eu. J'espère qu'il y en aura de belles encore à l'avenir.

Isabelle, Maryse et Jean-Marc merci pour votre franchise, votre soutien, votre justesse et vos encouragements. Vous avez toujours été là, même quand je ne demandais rien, c'est précieux. Je vous souhaite le meilleur.

Amélie, Martine, avouons-le, ces années n'auraient pas eu la même saveur sans vous. Merci les filles pour les conseils scientifiques, humains, culinaires, modesques… ! Et merci pour tout le soutien, là encore, indéfectible, et vos encouragements ! Je vous bisouille et vous souhaite de l'amour et du bonheur en pagaille.

Un grand merci à tous les PI du labo pour leur implication scientifique et technique.

Marie, Maha, merci pour tout le travail sur le papier, les données que vous avez traitées encore et encore pour répondre à chacune de nos questions. C'est aussi grâce à vous que l'histoire est (objectivement !) si jolie.

Aurélie, et plus récemment Sophie, merci pour votre écoute et vos encouragements, depuis le début ! Plein de bonheur pour vous.

A vous tous les docs, anciens et nouveaux, passés (personne n'est mort) et présents : un immense merci. D'avoir été mon meilleur public (je suis le vôtre), de m'avoir raconté tous les potins, d'avoir écouté les miens, d'avoir partagé vos galères de manips, et d'avoir compatis pour les miennes… Je vous souhaite à tous le plus de réussite professionnelle, le plus d'éclats de rire, le plus d'émotions dans vos vies ! Julie, Mélissa, Sophie, Mathilde, Adélaïde, Pukar, Inès, Rebecca, Haoussa, Alex, Marie-Aude, Véronica, merci.

Merci à tous mes proches, chéri, famille, amis. Thèse ou pas, vous me soutenez et m'encouragez. Quoi de plus précieux ?

Lise

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS ORIGINALES

❖ ***Remodeling of the HDL phospholipidome by ABCG1 contributes to its atheroprotective properties***

Lise M. Hardy, Marie Lhomme, Lucie Poupel, Isabelle Guillas, Maharajah Ponnaiah, Eric Frisdal, Maryline Olivier, Petra El Khoury, Elise F. Villard, Jean-François Franetich, Hervé Durand, Yuri V. Bobryshev, Philippe Lesnik, Emmanuel L. Gautier, Thierry Huby, Wendy Jessup, Alain Carrié, Eric Bruckert, Maryse Guerin, Anatol Kontush and Wilfried Le Goff

Soumis pour publication – Octobre 2019

❖ ***Identification of ZNF471, a novel transcription factor, modulator of DNA methylation and plasma lipid levels in cardiometabolic diseases***

Lise M. Hardy, Claire Perret, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Carole Proust, Thierry Huby, Philippe Lesnik, Maryse Guérin, Alain Carrié, Philippe Couvert, David-Alexandre Trégouët and Wilfried Le Goff

En préparation

❖ ***A Genome Wide Association Study on plasma FV levels identified PLXDC2 as a new modifier of the coagulation process***

Florian Thibord, **Lise Hardy**, Manal Ibrahim-Kosta, Noémie Saut, Anne-Sophie Pulcrano-Nicolas, Mete Civelek, Per Eriksson, Jean-François Deleuze, Wilfried Le Goff, David-Alexandre Trégouët and Pierre-Emmanuel Morange

Journal of Thrombosis and Haemostasis

REVUE

❖ ***Critical role of the human ATP-Binding Cassette G1 transporter in cardiometabolic diseases***

Lise M. Hardy, Eric Frisdal and Wilfried Le Goff

International Journal of Molecular Sciences 2017, 18, 1892; doi:10.3390/ijms18091892

VALORISATION

COMMUNICATIONS ORALES

❖ ***Identification of a novel transcription factor as a modulator of DNA methylation and plasma lipid levels in cardiometabolic diseases***

Lise Hardy, Claire Perret, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Carole Proust, Philippe Lesnik, Maryse Guérin, Alain Carrié, Philippe Couvert, David-Alexandre Trégouët and Wilfried Le Goff

NSFA (Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose), 21-23 juin 2017, Biarritz, France

❖ ***Transcription Factor 10: modulator of DNA methylation and plasma lipid levels in cardiometabolic diseases***

Lise Hardy, Claire Perret, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Carole Proust, Philippe Lesnik, Maryse Guérin, Alain Carrié, Philippe Couvert, David-Alexandre Trégouët and Wilfried Le Goff

Avancées de la recherche ICAN (Institute of Cardiometabolism and Nutrition), 30 janvier 2018, Paris, France

❖ ***Modulation of the HDL phospholipidome by ABCG1 enhances their atheroprotective properties***

Lise Hardy, Marie Lhomme, Elise F. Villard, Petra El Khoury, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Philippe Lesnik, Thierry Huby, Alain Carrié, Maryse Guerin, Anatol Kontush, Wilfried Le Goff

NSFA, 20-22 juin 2018, Biarritz, France
Format « Ma thèse en 180 secondes », Prix du public

❖ ***Modulation of the HDL phospholipidome by ABCG1 enhances their atheroprotective properties***

Lise M. Hardy**,** Marie Lhomme, Maryline Olivier, Lucie Poupel, Elise F. Villard, Petra El Khoury, Maharajah Ponnaiah, Eric Frisdal, Thierry Huby, Philippe Lesnik, Alain Carrié, Eric Bruckert, Maryse Guerin, Anatol Kontush, Wilfried Le Goff

NSFA, 19-21 juin 2019, Biarritz, France

COMMUNICATIONS AFFICHEES

❖ ***Identification of a novel transcription factor as a modulator of DNA methylation and plasma lipid levels in cardiometabolic diseases***

Lise Hardy, Claire Perret, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Carole Proust, Philippe Lesnik, Maryse Guérin, Alain Carrié, Philippe Couvert, David-Alexandre Trégouët and Wilfried Le Goff

FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Advanced Lecture Course ALC17-012, Nuclear Receptors and Epigenomic Mechanisms in Human Disease and Aging, 27 août-1er septembre 2017, Spetses, Grèce

❖ ***Modulation of the HDL phospholipidome by ABCG1 enhances their atheroprotective properties***

Lise Hardy, Marie Lhomme, Elise F. Villard, Petra El Khoury, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Philippe Lesnik, Thierry Huby, Alain Carrié, Maryse Guerin, Anatol Kontush, Wilfried Le Goff

NSFA, 20-22 juin 2018, Biarritz, France

❖ ***Modulation of the HDL phospholipidome by ABCG1 enhances their atheroprotective properties***

Lise Hardy, Marie Lhomme, Elise F. Villard, Petra El Khoury, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Philippe Lesnik, Thierry Huby, Alain Carrié, Maryse Guerin, Anatol Kontush, Wilfried Le Goff

European Lipoprotein Club (ELC) meeting, 10-13 septembre 2018, Tutzing, Allemagne

❖ ***Identification de TF10, nouveau facteur de transcription : modulateur de la méthylation de l'ADN et des lipides plasmatiques dans les maladies cardiométaboliques***

Hardy LM, Perret C, Poupel L, Frisdal E, Proust C, Lesnik P, Guérin M, Carrié A, Couvert P, Trégouët DA et Le Goff W

Réunion scientifique annuelle de la société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme, du réseau de recherche CMDO et du congrès COLOSSUS, 6-8 février 2019, Magog-Orford, Québec, Canada

AUTRES

❖ ***Participation au camp d'hiver du réseau de recherche CMDO (Cardiométabolique, Diabète et Obésité)***

1er-5 février 2019, Magog-Orford, Québec, Canada

❖ ***Obtention de la bourse "Albert Renold Travel Fellowship" de l'EFSD (European Foundation for the Study of Diabetes)***

Visite du laboratoire de Romain Barrès, Novo Nordisk Foundation, Center for Basic Metabolic Research, Avril 2019, Copenhague, Danemark

❖ ***Encadrement d'un stagiaire pendant 6 mois***

Novembre 2018 – Avril 2019 – Etudiant en 2ème année à l'IUT de Bobigny

ABREVIATIONS

ABCA1	ATB-binding cassette A1
ABCG1	ATB-binding cassette G1
ADCY9	Adénylate cyclase 9
ADN	Acide déoxyribonucléique
AG	Acide gras
APO	Apolipoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
ASCVD	Atherosclerotic cardiovascular disease
CCL	Chimiokine (C-C motif)
CCR	Récepteur de chimiokine (C-C motif)
EC	Ester de cholestérol
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CL	Cholestérol libre
CML	Cellule musculaire lisse
CV	Cardiovasculaire
DNMT	Méthyltransférase de l'ADN
eNOS	Synthase endothéliale du monoxyde d'azote
FED	Maladie des yeux de poisson
FH	Hypercholestérolémie familiale
FLD	Déficience familiale en LCAT
FT	Facteur de transcription
HAT	Acétylase d'histone
HDAC	Déacétylase d'histone
HDL	Lipoprotéine de haute densité
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
IL	Interleukine
KD	Knock Down
KDM	Déméthylase de lysine
KO	Knock Out
LCAT	Acyltransférase lécithine-cholestérol
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDL-R	Récepteur aux LDL

LE	Lipase endothéliale
LH	Lipase hépatique
LPL	Lipoprotéine lipase
LXR	Liver X Receptor
MCV	Maladie cardiovasculaire
miR	micro ARN
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Monoxyde d'azote
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PLA	Phospholipase
PLTP	Protéine de transfert des PL
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PS	Phosphatidylsérine
RCT	Reverse cholesterol transport
rHDL	HDL reconstituée
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
S1P	Sphingosine 1 phosphate
SM	Sphingomyéline
SNP	Single nucleotide polymorphism
SR-BI	Récepteur scavenger de classe B type 1
SREB	Sterol regulatory element-binding
TG	Triglycérides
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRL	Lipoprotéine riche en TG
TLR4	Récepteur toll-like 4
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
ZNF	Protéine à doigt de zinc

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Formation de la plaque d'athérome dans l'endothélium vasculaire. 1
Figure 2 : Le métabolisme des lipoprotéines. 6
Figure 3 : Les lipoprotéines HDL. 7
Figure 4 : Hétérogénéité des lipoprotéines HDL 8
Figure 5 : Structure d'un phospholipide. 13
Figure 6 : Structure d'un sphingolipide 16
Figure 7 : Structure du transporteur ABCG1 26
Figure 8 : Rôle clé du macrophage dans le métabolisme du cholestérol 40
Figure 9 : Etapes de développement de l'athérosclérose 43
Figure 10 : Synthèse du cholestérol et action des statines 56
Figure 11 : Les différents mécanismes de régulation épigénétiques 69
Figure 12 : Synthèse et maturation des miRs 70
Figure 13 : Modifications des régions N-terminales des histones H2a, H2b, H3 et H4. 76
Figure 14 : Rôle des DNA méthyltransférases dans la méthylation de l'ADN. 80
Figure 15 : Impact de la méthylation sur la transcription des gènes. 80
Figure 16 : Régulation de l'expression des miRs par la méthylation de l'ADN. 94
Figure 17 : Structure d'une structure protéique en doigt de zinc type C_2H_2. 209
Figure 18 : Le domaine KRAB des protéines de type ZNF recrute les cofacteurs. 210

Tableau 1 : Les différentes classes de lipoprotéines et leurs caractéristiques…….3
Tableau 2 : Distribution des phospholipides et sphingolipides majeurs dans les classes de lipoprotéines VLDL, LDL et HDL..... 3
Tableau 3 : Efficacité des statines sur la réduction de LDL-C et les conséquences sur le risque cardiovasculaire. 57
Tableau 4 : Implication des miRs dans le métabolisme des lipoprotéines HDL 75
Tableau 5 : Impact de la modulation de la méthylation des gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique sur le métabolisme des HDL..... 91

Schéma bilan 1 99
Schéma bilan 2 145

RESUME FRANÇAIS

Les lipoprotéines HDL (*High-Density Lipoproteins*) sont protectrices dans les maladies cardiovasculaires (MCV) liées à l'athérosclérose : de faibles concentrations de cholestérol associé aux HDL est un facteur de risque indépendant des MCV. Les HDL sont notamment capables de réaliser de l'efflux de lipides des tissus périphériques pour assurer son retour vers le foie, et ont également des rôles anti-inflammatoire, anti-thrombotique, ou anti-oxydatif. Le travail mené ici vise à identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la détermination du rôle athéroprotecteur des lipoprotéines HDL.

Le célèbre transporteur ABCG1 (*ATP-Binding Cassette G1*) réalise de l'efflux de cholestérol, mais aussi de ses dérivés, de phospholipides, ou encore de vitamines à partir des macrophages périphériques vers les HDL. Nous avons montré que la stimulation de l'expression d'*ABCG1* dans l'hépatocyte favorisait un réarrangement du contenu des HDL en phospholipides, en particulier une déplétion en phosphatidyléthanolamine (36 :5), suggéré délétère dans le cadre de l'athérosclérose. Ce remodelage est associé à une amélioration de la capacité d'efflux de cholestérol des HDL et de leur fonction anti-inflammatoire. En parallèle, des études épidémiologiques nous ont permis d'identifier ZNF471 (*Zinc Finger Protein 471*), nouveau facteur de transcription. Il semble capable de moduler l'expression et l'activité de protéines clés du métabolisme des lipides, *via* une régulation épigénétique impactant la méthylation de l'ADN. Plus précisément, nous avons mis en évidence que l'expression de ZNF471 dans les hépatocytes augmentait la méthylation de l'ADN sur la région promotrice du gène codant la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). En conséquence, l'expression du gène et l'activité protéique de la CETP sont réduits, ce qui favorise l'accumulation de cholestérol associé aux HDL. De plus, les capacités d'efflux de cholestérol des HDL sont également stimulées par ZNF471. Ces deux études ont été menées sur des modèles in vitro, in vivo, mais aussi chez l'Homme grâce à l'identification de polymorphismes de l'ADN fonctionnels dans les gènes *ABCG1* et *ZNF471*.

Ces travaux de recherche permettent l'identification de nouveaux acteurs génétiques et épigénétiques dans la détermination des fonctions des lipoprotéines HDL. Ils ouvrent ainsi la voie à de nouvelles explorations thérapeutique et mécanistique sur les rôles des HDL dans les MCV liées à l'athérosclérose.

RÉSUMÉ ANGLAIS

Since low concentrations of High-Density Lipoproteins-cholesterol (HDL-C) are associated with increased cardiovascular disease (CVD) risk, HDL are recognized as protective in atherosclerotic CVD (ASCVD). Indeed, HDL promote lipid efflux from macrophages and allow their reverse transport to liver. They are also able to perform anti-inflammatory, anti-thrombotic or anti-oxidative activities. Here, we aimed to identify new factors implicated in the determination of atheroprotective functions of HDL.

ATP-Bonding Cassette G1 (ABCG1) transporter perform not only cholesterol, but also cholesterol derivatives, phospholipids or vitamin efflux from peripheral macrophages to HDL. We showed that ABCG1 expression in hepatocytes promoted HDL phospholipid content rearrangement, notably phosphatidylethanolamine (36:5) depletion, which is a suggested deleterious phospholipid in atherosclerosis. This HDL remodeling is associated with a better cholesterol efflux capacity and an improvement of their anti-inflammatory properties. Simultaneously, epidemiological studies allow us to identify a novel transcription factor, ZNF471 (Zinc Finger Protein 471). ZNF471 seems to modulate expression and activity of key proteins implicated in lipid metabolism, through epigenetic DNA methylation regulation. We highlighted that ZNF471 expression in hepatocytes increased DNA methylation in *CETP* (Cholesterol Ester Transfer Protein) gene promoter region. As a consequence, CETP gene expression and protein activity were diminished, which raised HDL-C circulating concentrations. We also pointed out that ZNF471 expression stimulated HDL cholesterol efflux capacities. Both studies were conducted on *in vitro*, *in vivo* models, but also in human thanks to the discovery of functional polymorphisms into *ABCG1* and *ZNF471* genes.

This work allows the identification of novels genetic and epigenetic actors in determining HDL lipoproteins activities. It paves the way for new therapeutic and mechanistic insights on the roles of HDL in ASCVD.

AVANT-PROPOS

Les maladies cardiovasculaires (MCV), qui regroupent l'ensemble des troubles affectant le cœur et les vaisseaux, restent la première cause de mortalité dans le monde depuis plus de 15 ans. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que les MCV provoquent environ 17,7 millions de décès chaque année, soit 31% de la mortalité totale (chiffres 2015). Certains facteurs de risque des MCV sont immuables, comme l'hérédité, l'âge et le sexe. Cependant, l'hygiène de vie et l'environnement contribuent fortement au développement de ces pathologies multifactorielles : le diabète, le tabagisme, le surpoids, la sédentarité, l'hypertension, l'hypercholestérolémie ou l'hypertriglycéridémie sont autant de facteurs de risque modifiables.

L'athérosclérose, maladie chronique de bas grade, à composantes lipidique et inflammatoire, peut être une cause de MCV. Elle correspond à la formation de plaques d'athérome dans l'endothélium des artères de moyen et gros calibres (figure 1), et peut ainsi être à l'origine de nombreuses affections cardiovasculaires. L'endothélium vasculaire est composé de trois tuniques : l'intima, couche la plus interne, la media, couche intermédiaire, et l'adventice.

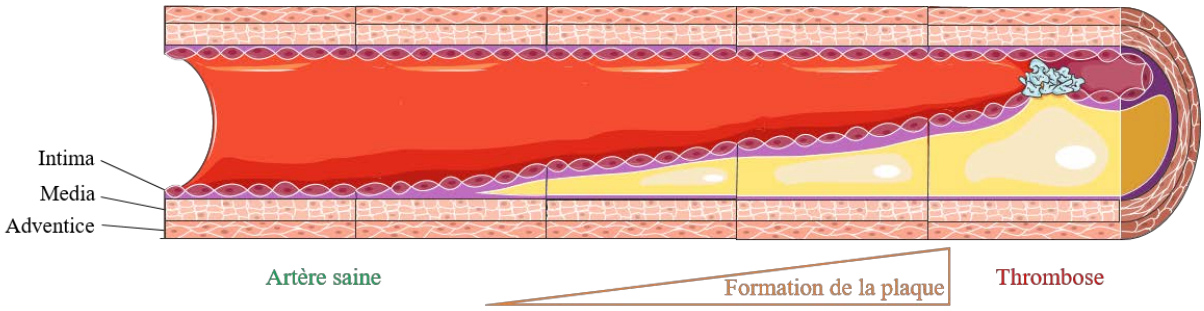


Figure 1 : Formation de la plaque d'athérome dans l'endothélium vasculaire.
La plaque d'athérosclérose se forme dans l'intima vasculaire et réduit le diamètre artériel, on parle de sténose. La rupture de la plaque peut conduire à la thrombose, qui obstrue la circulation sanguine et peut être à l'origine d'accidents vasculaires.

La plaque d'athérome résulte de l'accumulation locale de lipides, glucides complexes, sang et produits sanguins, dépôts fibreux et calciques, et de cellules immunitaires et inflammatoires dans l'intima des artères. Ces accumulations forment les stries lipidiques qui entraînent un important remodelage de la paroi. Tout d'abord, les lipides chargés sur les lipoprotéines de faible densité LDL (*Low-Density Lipoproteins*) pénètrent dans la paroi du vaisseau et s'oxydent. Les cellules endothéliales sont activées par les LDL oxydées (LDLox) et sécrètent des chimiokines, qui se lient à leurs récepteurs présents à la surface des monocytes

circulants. L'expression de protéines d'adhésion telles que la P-sélectine, VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) ou ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule*) à la surface des cellules endothéliales permet le recrutement, l'adhésion et l'infiltration des monocytes dans l'intima. Les monocytes infiltrés se différencient en macrophages et deviennent des cellules spumeuses en endocytant les lipides oxydés de la plaque. Enfin, les cellules musculaires lisses de la média deviennent prolifératives, sécrétrices et migratoires, formant la chape fibreuse. L'aggravation de la pathologie peut conduire à une sténose (rétrécissement de diamètre de l'artère) ou une rupture de la plaque. Le thrombus formé par l'agrégation plaquettaire au site de rupture peut conduire à une obstruction de la lumière artérielle. Ces ruptures sont dramatiques car elles peuvent être la cause de MCV.

Les lipides sont transportés dans le plasma humain associés à des protéines spécialisées, appelées apolipoprotéines. Les molécules complexes formées par cette association sont les lipoprotéines. Le foie et l'intestin sont les organes responsables de la production des différentes apolipoprotéines plasmatiques. Les lipoprotéines ont différentes origines. Les chylomicrons contiennent en très grande majorité des triglycérides (TG) formés à partir des acides gras (AG) absorbés par l'intestin lors de l'alimentation. Les VLDL, également riches en TG, sont originaires du foie mais sont largement chargées en AG libres de la circulation. Les IDL et LDL sont formées à partir des VLDL remaniées. Enfin, les HDL sont principalement produites par l'intestin et le foie, mais peuvent également être issues de remaniements de lipoprotéines de très faibles densités, comme les chylomicrons. Une fois chargées des lipides (cholestérol estérifié (CE) ou libre (CL), TG, phospholipides (PL) et sphingolipides), les lipoprotéines permettent leur transport vers les tissus périphériques, ainsi que le transport inverse de cholestérol, depuis ces tissus périphériques vers le foie.

Les diverses classes de lipoprotéines diffèrent par leur taille, leur contenu en lipides ainsi qu'en apolipoprotéines (tableau 1) (Gotto et al., 1986; Feingold and Grunfeld, 2000).

Tableau 1 : Les différentes classes de lipoprotéines et leurs caractéristiques.
TG : triglycérides, EC : esters de cholestérol, CL : cholesterol libre, PL: phospholipids, apo : apolipoprotéines, VLDL : very-low density lipoprotein, IDL : intermediate density lipoprotein, LDL : low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein, Lp (a) : lipoprotéine (a).

Lipoprotéine	Densité (g/ml)	Diamètre (nm)	Composition (%)					Apolipoprotéines
			Protéines	TG	EC	CL	PL	
Chylomicron	<0.930	75-1200	2	90	2	1	5	Apo B-48, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
VLDL	0.930- 1.006	30-80	10	54	13	7	16	Apo B-100 Apo E, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo C-IV
IDL	1.006- 1.019	25-35	17	20	34	9	20	Apo B-100, Apo E, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo C-IV
LDL	1.019- 1.063	18-25	23	4	41	21	11	Apo B-100, Apo E, Apo C-II, Apo C-III
HDL2	1.063- 1.125	9-12	42	5	13	5	35	Apo A-I, Apo A-II, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo C-IV, Apo E
HDL3	1.125- 1.210	5-10	56	3	15	3	23	Apo A-I, Apo A-II, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo C-IV, Apo E
Lp (a)	1.055- 1.085	~30	34	3	36	9	18	Apo B-100, Apo (a)

Par ailleurs, Wiesner et ses collaborateurs ont établi un profil lipidique des différents types de lipoprotéines (tableau 2) (Wiesner et al., 2009). De façon intéressante, cette étude montre que les phospholipides (PL) et leurs dérivés (lysophospholipide ou plasmalogène) sont majoritairement portés par les HDL plasmatiques. Parmi les PL, les molécules de phosphatidylcholine (PC) sont très largement les plus abondantes. Les sphingomyélines (SM) et les céramides sont principalement retrouvés dans les LDL.

Tableau 2 : Distribution des phospholipides et sphingolipides majeurs dans les classes de lipoprotéines VLDL, LDL et HDL.
PC : Phosphatidylcholine, SM : sphingomyelin, LPC : lysophosphatidylcholine, PE : phosphatidylethanolamine, PE-pl : plasmalogène dérivé des PE.

Lipide	Concentration (µM)	VLDL (%)	LDL (%)	HDL (%)
PC	1986 ± 727	8,1 ± 6,4	29,9 ± 6,6	62 ± 10,3
SM	415 ± 141	7,2 ± 6,8	50,4 ± 7,5	42,6 ± 10,7
LPC	330 ± 168	1,7 ± 1,5	11 ± 4,5	87,3 ± 5,4
PE	35,6 ± 20,8	18,6 ± 9,4	21,3 ± 5,6	60,1 ± 11,4
pl-PE	31,9 ± 13,9	11,6 ± 5,3	28,5 ± 6,5	59,9 ± 8,8
Céramide	8,1 ± 3,4	15,6 ± 9,9	60,3 ± 6,7	24,1 ± 7,4

Les fonctions des différentes lipoprotéines sont directement associées à leur nature. Elles possèdent, par exemple différents pouvoirs athérogènes. Ainsi, les lipoprotéines de faible densité LDL (*Low Density Lipoprotein)*, les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), les chylomicrons et leurs résidus sont reconnus pour être pro-athérogènes. Les concentrations plasmatiques élevées de cholestérol associé aux LDL (LDL-C) ont été identifiées au sein de la cohorte Framingham comme un risque majeur de développement de MCV (Gordon et al., 1977) et de l'épaississement de la paroi artérielle (Zhang et al., 2017). De même, Gordon et coll. indiquent que de fortes concentrations de cholestérol associé aux lipoprotéines de haute densité HDL (*High Density Lipoprotein*, HDL-C) sont athéroprotectrices. L'étude CANHEART confirme sur plus de 600 000 individus les données obtenues par Gordon : Ko et coll. et montrent que les concentrations plasmatiques de HDL-C sont associées au risque de mortalité cardiovasculaire selon une courbe en « U » (Ko et al., 2016). Ceci peut être expliqué par les propriétés athéroprotectives des HDL, notamment leur capacité à réaliser de l'efflux de cholestérol cellulaire à partir des macrophages spumeux de la plaque, celle-ci étant négativement associée à l'athérosclérose (Khera et al., 2011), à l'infarctus du myocarde (Guerin et al., 2018) et aux MCV (Rohatgi et al., 2014).

Dans le but d'augmenter les concentrations plasmatiques de HDL-C, certaines thérapies ont été développées. La majorité des inhibiteurs de la CETP développés n'ont jamais réellement pu montrer d'effets sur les évènements cardiovasculaires, et les recherches sur le seul inhibiteur prometteur ont malgré tout été abandonnées. D'autres thérapies comme l'utilisation d'apo A-I synthétiques ont mis en évidence des résultats contradictoires, souvent peu concluants. Ces résultats suggèrent que moduler les concentrations de HDL-C seules ne suffit pas à expliquer l'effet athéroprotecteur des HDL. La courbe en « U » de l'étude CANHEART indique en effet une augmentation du risque cardiovasculaire chez les patients avec des concentrations de HDL-C circulantes élevées (Ko et al., 2016).

L'effet athéroprotecteur des HDL peut être partiellement expliqué par leur implication importante dans le transport inverse du cholestérol. Ce processus permet à l'organisme de l'éliminer ou le recycler, *via* son retour depuis les tissus périphériques vers le foie, afin de maintenir l'homéostasie lipidique. Chez l'Homme, l'efflux de cholestérol cellulaire, première étape de ce transport inverse, se fait *via* différents transporteurs :

- *ATP Binding Cassette A1* (ABCA1) est indispensable pour la biogenèse des HDL : il réalise de l'efflux de cholestérol et de phospholipides cellulaires vers les particules d'ApoA-I libres, les préβ-HDL discoïdales et les petites HDL3.

- *Adenosine triphosphate Binding Cassette G1* (ABCG1) réalise de l'efflux de cholestérol (Wang et al., 2004; Kennedy et al., 2005), phospholipides, sphingomyéline (Kobayashi et al., 2006), vitamine E (Olivier et al., 2014), ou d'oxystérols (Engel et al., 2007), préférentiellement vers les HDL2 matures (Wang et al., 2004; Tarling and Edwards, 2011), mais aussi vers les HDL plus petites, de type HDL3 ou HDL pré-β (Sankaranarayanan et al., 2009).
- *Scavenger Receptor class B type I* (SCARBI ou SR-BI) vers les HDL2, LDL ou VLDL. Il est à noter que SR-BI est également capable de capter sélectivement le cholestérol estérifié, pour le faire entrer dans la cellule.

Dans le contexte de l'athérosclérose, l'efflux de cholestérol dans les macrophages limite son accumulation dans la paroi artérielle. Il est ainsi considéré comme athéroprotecteur. Ces différents transporteurs, par leur action, ont un rôle important dans le remodelage des lipoprotéines, auquel ils participent avec d'autres enzymes clés (figure 2). Parmi elles, la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP, *Cholesterol Ester Transfer Protein*) semble jouer un rôle primordial. Elle effectue un hétéro-échange de triglycérides et d'esters de cholestérol entre HDL antiathérogènes et LDL/VLDL pro-athérogènes. La PLTP (Phospholipid Transfer Protein) est la protéine de transfert des PL entre lipoprotéines de haute densité. Les lipases (LPL *Lipoprotein Lipase*, LH hépatique, ou la lipase endothéliale) hydrolysent les triglycérides présents majoritairement dans les chylomicrons et les VLDL. Elles possèdent également des activités phospholipases. Toutes ces protéines sont des acteurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie lipidique.

L'avènement récent de nouveaux outils expérimentaux et d'analyses ont permis de mettre en évidence le rôle de la régulation épigénétique de ces enzymes majeures du métabolisme des lipides. L'épigénétique correspond à l'ensemble des modifications impactant la fonction d'un gène sans que sa séquence soit modifiée. Les modifications chimiques post-traductionnelles sur les histones, la méthylation de l'ADN ou encore les micro ARNs sont aujourd'hui considérés comme modifications épigénétiques. De nombreuses études cliniques ont identifié des associations entre les niveaux de méthylation de certains gènes clés du métabolisme lipidique, comme *ABCG1* (Hardy et al., 2017), *PLTP*, *CETP*, *LPL*… (Guay et al., 2014; Braun et al., 2017; Hedman et al., 2017) et les concentrations plasmatiques de lipides, dans différents contextes de maladies cardiométaboliques. Cependant, les mécanismes moléculaires régulant ces niveaux de méthylation de l'ADN ne sont, à ce jour, pas connus.

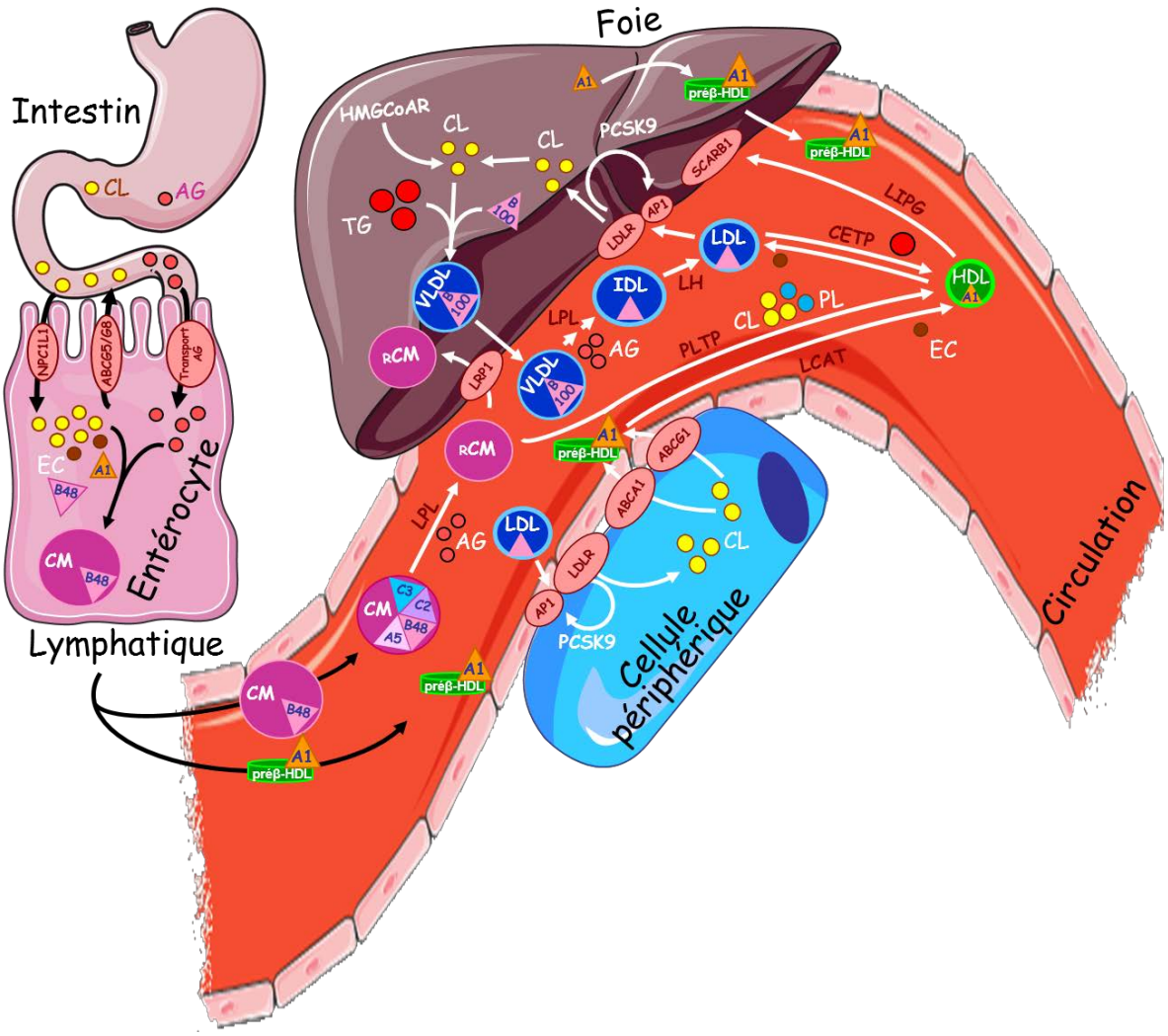


Figure 2 : Le métabolisme des lipoprotéines.
L'hydrolyse des graisses alimentaires dans l'intestin aboutit à l'entrée d'acides gras (AG) et de cholestérol libre (CL) dans les entérocytes, via les transporteurs ABCG5/8 (ATP binding cassette G5/8), NPC1L1 (niemann-pick C1-like 1) et un transporteur des AG. Les AG permettent la synthèse de TG qui sont associés à des esters de cholestérol (EC), des molécules de cholestérol libre (CL) et à une molécule d'apolipoprotéine B, isoforme 48 (B48) conduisant à la formation de chylomicrons (CM). Dans la circulation, les CM sont la cible de la lipoprotéine lipase (LPL), qui permet la libération d'AG. Les AG ainsi libérés pénètrent dans les cellules périphériques pour y servir de substrat à la production d'énergie (β-oxydation) ou pour y être stockés dans le cas des adipocytes. Les résidus de CM (rCM) sont captés au niveau hépatique par le récepteur des LDL (low density lipoprotein-R) et/ou par un autre récepteur de la même famille (LRP1, LDLR related protein 1). Dans les hépatocytes, les TG sont associés au CL et à l'apoB, isoforme 100 (B100), formant alors les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) qui passent ensuite dans la circulation. Le contenu en TG des VLDL est peu à peu hydrolysé par la LPL, libérant des AG et aboutissant à des particules issues des VLDL, les IDL (intermediate density lipoprotein) qui sont elles-mêmes la cible de lipases, lipase hépatique (LH) notamment, formant ainsi les lipoprotéines de type LDL. Le CL peut être originaire de l'absorption intestinale ou de la synthèse de novo par l'HMGcoA réductase dans le foie. Le CL est transporté par les VLDL/IDL/LDL depuis le foie vers les cellules périphériques où il est capté par endocytose grâce au LDL-R. Ce récepteur est associé à une protéine adaptatrice (LDLRAP1, LDLR adaptator protein 1). PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) favorise la dégradation du LDL-R et donc à la diminution de son expression à la membrane cellulaire. Au sein des HDL (high density lipoprotein), le CL est en partie issu de l'efflux depuis les cellules par interaction avec les transporteurs ABCA1 (ATP binding cassette A1) et ABCG1 (ATP binding cassette G1). Le CL peut être ensuite estérifié en CE par la LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase). La particule est ensuite réorganisée avec notamment adjonction de phospholipides par la PLTP (phospholipid transfer protein), l'action de lipases (lipase endothéliale, LIPG) et les échanges de CE/TG avec les particules LDL par l'intermédiaire de la protéine de transfert d'ester de cholestérol (CETP). Le cholestérol des particules HDL est capté par le foie via le transporteur SCARB1 (scavenger receptor class B-1), celui des LDL via le LDLR. Adapté de (Couvert et al., 2010)

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. LES LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE

1. Structure des HDL

Les lipoprotéines de haute densité (HDL, *High-Density Lipoproteins*), sont les lipoprotéines les plus denses et les plus petites (table 1) (Feingold and Grunfeld, 2000; Kontush and Chapman, 2012). Elles sont enrichies en protéines, qui constituent leur cœur structural. Les HDL sont également constituées de nombreuses espèces de lipides différentes. Les phospholipides (PL) et le cholestérol non estérifié, ou libre (CL), constituent la couche lipidique de surface des HDL, tandis que les esters de cholestérol (CE) et les triglycérides (TG) forment le cœur hydrophobe de la lipoprotéine (figure 3A) (Kontush and Chapman, 2012). Malgré ces caractéristiques communes, les HDL forment un groupe de particules hétérogènes en taille, densité, mobilité en gel d'électrophorèse, composition lipidique et protéique (figure 4) (Rye et al., 2009; Rosenson et al., 2011).

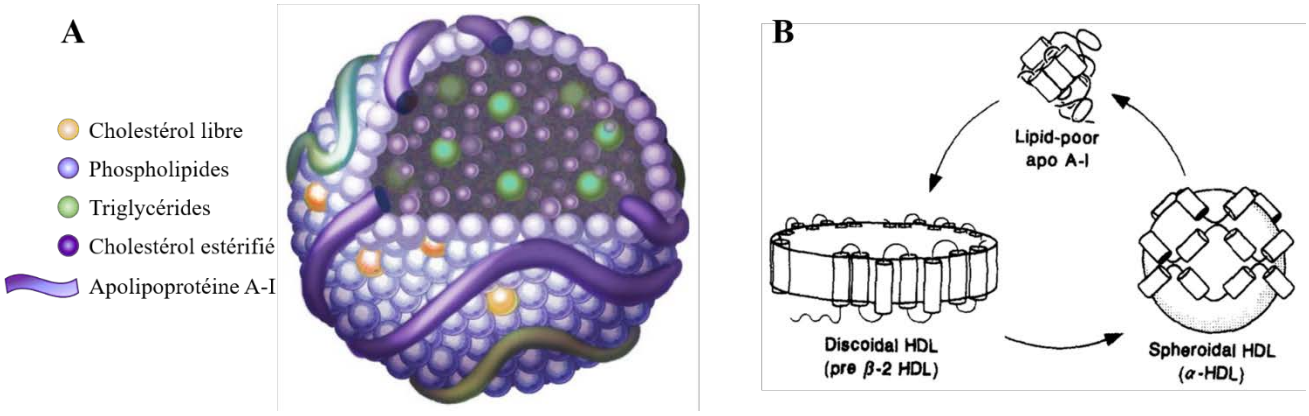


Figure 3 : Les lipoprotéines HDL.
***A**, La lipoprotéine HDL sphérique est composée de plusieurs molécules d'apolipoprotéines, notamment l'apo A-I. les phospholipides et le cholestérol libre forment la couche de surface, alors que les triglycérides et esters de cholestérol hydrophobe sont enchâssés au cœur de la lipoprotéine. **B**, La lipidation de la molécule d'apo A-I faiblement lipidée génère des HDL discoïdales, qui peuvent fusionner ou se charger en lipides pour former les HDL sphériques. Le recyclage des lipides contenus dans les HDL sphériques peuvent mener à la libération de l'apo A-I « libre ».*

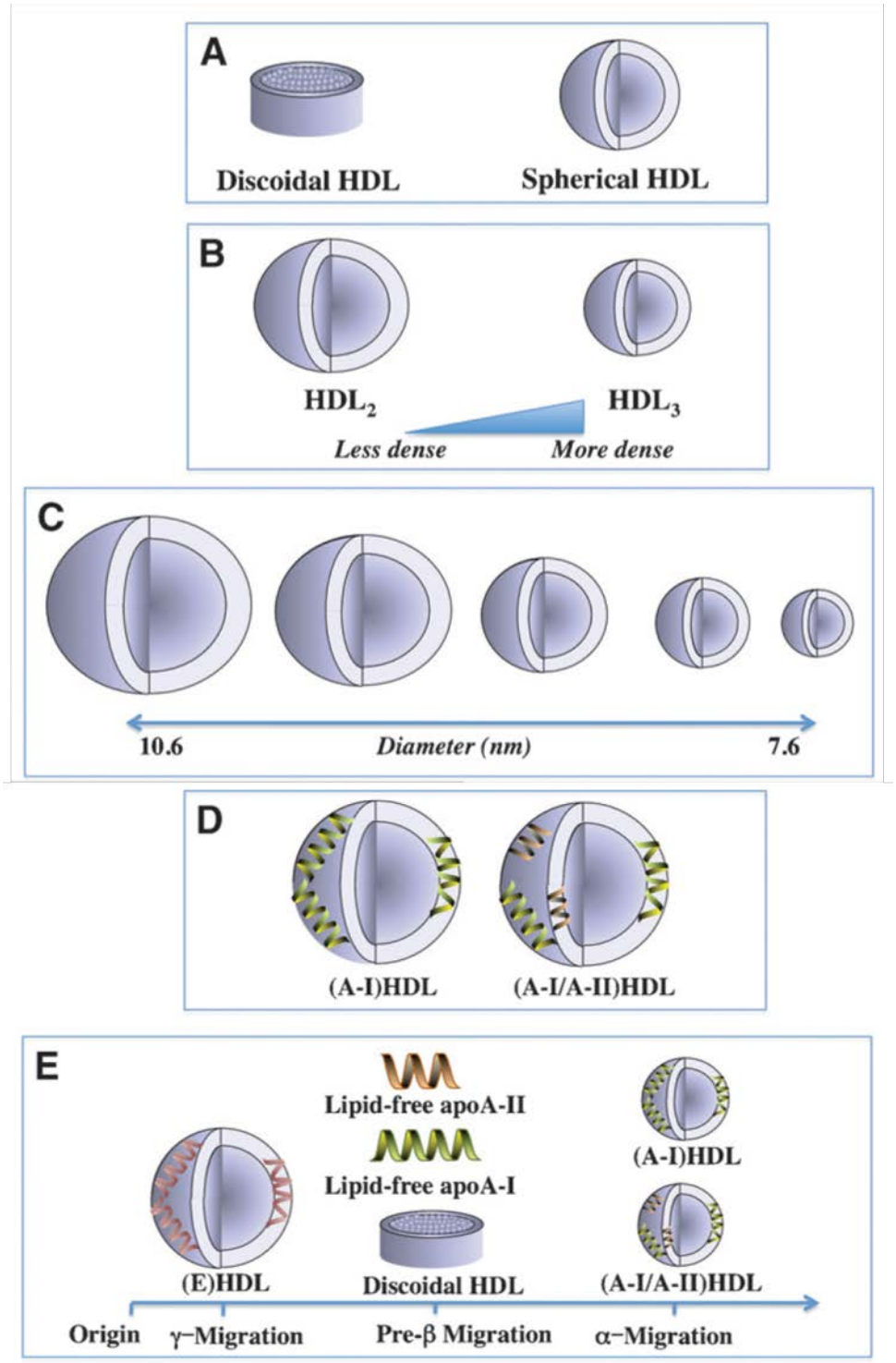


Figure 4 : Hétérogénéité des lipoprotéines HDL
*Chez l'Homme, les différentes sous-fractions de lipoprotéines HDL plasmatiques diffèrent selon leur forme (**A**), leur densité (**B**), leur taille (**C**), leur composition (**D**) et leur charge de surface (**E**). (Rye et al., 2009)*

Classées selon leur forme et leur densité, il existe trois formes de lipoprotéines HDL décrites, organisées selon ces propriétés (figure 3B) :

- les molécules d'apo A-I dite « libre »,
- les HDL de type discoïdal, appelées HDL pré-β,
- les HDL sphériques, ou HDL α ($HDL_{2a, 2b, 3a, 3b, 3c}$).

L'apo A-I « libre » est largement minoritaire dans le plasma et est capable de réaliser de l'efflux de cholestérol cellulaire, notamment par la présence des acides aminés (aa) LQEKLSPL en position 137 à 144. (Fielding and Fielding, 1995). L'apo A-I n'est ainsi jamais véritablement libre, car lipidée dès qu'elle est synthétisée, formant les HDL pré-β : le ratio du contenu en phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SM) est de l'ordre de 1 :1. Les particules de type pré-β représentent moins de 5% des HDL plasmatiques car elles sont très instables. Elles diffèrent des molécules d'apo A-I libres par leur contenu en phospholipides, notamment enrichi en phosphatidylcholine. Chaque particule peut contenir une ou plusieurs molécules d'aop A-I. Enfin, les particules HDL sphériques représentent la grande majorité du contenu plasmatique en HDL. Les HDL pré-β et les HDL sphériques sont généralement associées à d'autres protéines que l'apo A-I (apolipoprotéines ou non), modulant leur fonctionnalité HDL. La structure très dynamique de l'apo A-I est largement impliquée dans le caractère hétérogène des HDL (Davidson and Thompson, 2007).

a. Protéome

Les apolipoprotéines et autres protéines associées aux HDL sont majeures dans la détermination de leurs structures et fonctions. Les travaux de Sean Davidson ont permis d'identifier 95 protéines différentes constituant le protéome des HDL (Davidson, 2015). Les apolipoprotéines, molécules amphiphiles, permettent le maintien de l'intégrité des lipoprotéines lorsque celles-ci sont soumises aux forces thermodynamiques de l'espace intravasculaire. Les lipides hydrophobes ne sont alors jamais exposés à l'environnement aqueux du vaisseau. Ainsi, les apolipoprotéines assurent un rôle central pour les activités biologiques des HDL.

i. Apolipoprotéine A-I

L'apolipoprotéine A-I (apoA-I) est la protéine majeure des HDL : elle représente en effet environ 70% de la masse totale de la particule. Chez l'Homme, elle est encodée par le gène homonyme *APOA1*, localisé sur le chromosome 11q23. La séquence protéique a été déterminée par le travail de Brewer et al. dès les années 1970 (Brewer et al., 1978). Après

protéolyse, la protéine d'apoA-I mature est composée de 8 domaines de 22 résidus aminés de types hélices α, ainsi que 2 répétitions de 11 acides aminés (McLachlan, 1977). Elle agit comme un puissant régulateur de l'intégrité de la lipoprotéine. A l'état non lipidé, les hélices α sont maintenues au cœur de la protéine alors que les segments polaires sont au contact du milieu aqueux : l'agencement tridimensionnel de ces structures favorise le caractère amphiphile de l'apoA1 (Frank and Marcel, 2000). Dans les lipoprotéines HDL sphériques, plus riches en esters de cholestérol, l'apo A-I a également un rôle structural important, afin de maintenir l'intégrité de la molécule, et de protéger le cœur hydrophile. Il n'y a pas de consensus clair qui détermine si l'apo A-I peut être sécrétée totalement délipidée, ou si elle est associée à une très faible quantité de lipides dès sa sécrétion.

La synthèse d'apoA-I est réalisée par le foie (environ 70% de la quantité d'apoA-I produite) et l'intestin (30%). Une fois sécrétée, l'apo A-I interagit avec la phosphatidylcholine dimyristoyl (DMPC) (Atkinson et al., 1976) et/ou palmitoyloleoyl (POPC) (Matz and Jonas, 1982; Nichols et al., 1983) pour former des structures discoïdales, les HDL pré-β. Ces structures très dynamiques deviennent alors de puissants accepteurs de CL, faisant des HDL pré-β des éléments clés du transport inverse du cholestérol (Lund-Katz et al., 2003). L'apo A-I stimule ainsi l'efflux de cholestérol cellulaire, première étape du transport inverse. L'étude menée *in vitro* dans des cellules HepG2 par Chisholm et al. montre que certaines apo A-I peuvent être lipidées avant sécrétion, au sein de l'hépatocyte (Chisholm et al., 2002).

De plus, l'apoA-I agit comme cofacteur de la lécithine-cholestérol acyltransférase, ou LCAT (*Lecithin Cholesterol Acyl Transferase*) : selon la conformation de l'apolipoprotéine, l'activation de la LCAT est modifiée, modulant sa capacité à estérifier le cholestérol contenu dans les HDL (Frank and Marcel, 2000).

L'apo A-I $_{\text{Milano}}$ est une apo A-I particulière, produite chez les individus atteints de la mutation R173C, qui résulte en de très faibles concentrations plasmatiques d'apo A-I et de HDL-C, ainsi que d'une faible augmentation de la concentration de TG. La mutation a été découverte à l'université de Milan dans les années 1970, suite à une investigation menée dans le village de Limone sul Garda, en Italie, dans lequel plus de 3% de la population est atteinte. De façon intéressante, malgré ces faibles concentrations d'HDL-C, les individus porteurs de la mutation ne développent pas d'athérosclérose et leur risque CV est réduit (Franceschini et al., 1980).

ii. Apolipoprotéine A-II

L'apolipoprotéine A-II est la seconde protéine majoritaire des HDL, représentant 15-20% de la masse totale de la particule (Kontush and Chapman, 2012). Elle est présente dans environ 50% des lipoprotéines de type HDL. Une fois synthétisées par le foie, les deux chaînes de 77 acides aminés s'homodimérisent pour former la protéine fonctionnelle. L'apo A-II est impliqué dans la structure des HDL, et est capable de moduler la stabilité de l'apo A-I : à des ratios physiologiques apo A-II/apo A-I de 1 :2, l'apo A-II peut déstabiliser la structure de l'apo A-I, modulant ainsi sa fonctionnalité (Durbin and Jonas, 1997). Plus particulièrement, il a été récemment montré que l'efflux de cholestérol *via* ABCA1 était stimulé par la présence de l'apo A-II (Melchior et al., 2017).

iii. Apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E est également une protéine structurale et fonctionnelle importante. Produite dans le foie, mais aussi la rate, le rein, le cerveau ou encore le tissu adipeux, cette protéine tétramérique est formée de 8 hélices α amphiphiles. Elle a une très puissante affinité pour les triglycérides, participant ainsi à la formation de lipoprotéines de faible densité telles que les VLDL. Cependant, dans un milieu riche en phospholipides, l'apo E est capable de se réarranger en une structure de type HDL. De plus, elle a une affinité pour le récepteur aux lipoprotéines LDL, le LDL-R (*LDL Receptor*) et la protéine LRP1 (*LDL-R Related Potein 1*), ainsi que celui des VLDL (VLDL-R). Grâce à ces interactions, les HDL contenant de l'apo E peuvent délivrer continuellement du cholestérol et des phospholipides au foie (Hatters et al., 2006). Le gène de l'apo E a 3 isoformes, apo E2, apo E3 et apo E4. Les 3 isoformes protéiques diffèrent au niveau des aa en positions 112 et 158 : apo E3 a une cystéine et une arginine à ces positions respectivement, l'apo E2 a 2 cystéines, l'apo E4 2 arginines. Cette variation allélique module la fonctionnalité protéique. Ainsi, l'activité anti-oxydative de l'apo E dépend de l'isoforme concernée : les patients porteurs d'au moins un allèle apo E4 sont plus sensibles aux agents oxydants de l'environnement comme les LDLox dans le système vasculaire ou les dégâts oxydatifs relatifs à la maladie d'Alzheimer (Hayek et al., 1994; Montine et al., 1998). Les différentes isoformes affectent également l'affinité de l'apo E pour le LDL-R, ce qui participe à l'efficacité de l'alimination des LDL circulantes (Hatters et al., 2006). Enfin, les souris déficientes pour l'apo E sont susceptibles de développer spontanément des plaques d'athérome sous régime riche en graisses car leurs concentrations plasmatiques de VLDL sont très fortement augmentées par rapport aux souris contrôles (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992).

iv. Apolipoprotéine C

La famille des apolipoprotéines C regroupe 4 petites protéines, apo C-I, apo C-II, apo C-III et apo C-IV. Elles sont toutes retrouvées majoritairement au sein des VLDL, IDL (Intermediate Density Lipoprotein), et pour certaines, dans les chylomicrons et LDL, mais également en faibles quantités dans les HDL, où elles ont des rôles variés. L'apo C-I peut moduler l'activité de diverses protéines du métabolisme des HDL, en inhibant la CETP notamment. L'apo C-I réduit alors significativement les transferts de lipides entre HDL et VLDL (Gautier et al., 2000; Dumont et al., 2005). Elle peut également impacter les HDL en activant la LCAT et inhibant la LH. Les apo C-II et III semblent avoir des fonctions antagonistes : l'apo C-II est activatrice de certaines triglycérides lipases, alors que l'apo C-III inhibe la LH et la LPL.

v. Apolipoprotéine M

Elle est majoritairement retrouvée dans les HDL, mais également à de faibles doses dans les LDL et les VLDL (Xu and Dahlbäck, 1999). L'apolipoprotéine M possède une forte affinité pour la sphingosine-1 phosphate (S1P), dont elle peut impacter la concentration plasmatique. Impliquée dans la formation de lipoprotéines HDL pré-β, dans l'efflux de cholestérol à partir des cellules spumeuses et dans la réduction de l'oxydation, l'apo M exerce des propriétés athéroprotectrices (Christoffersen et al., 2008; Arkensteijn et al., 2013).

vi. Autres composants du protéome des HDL

Les autres apolipoprotéines (apo A-IV et V, apo D…), très largement minoritaires dans les HDL, ne seront pas évoquées ici. Les HDL peuvent également s'associer avec d'autres protéines, comme certaines enzymes impliquées dans leur métabolisme (CETP, lipases, LCAT, transporteurs…). Ces interactions vont fortement influencer les fonctions des HDL : au niveau celluaire ou plasmatique, elles vont engendrer différentes réactions inflammatoires, immunitaires, proliératives, et vont activer certaines voies de signalisation impliquées dans ces réactions. Elles seront décrites et développées dans la partie A. 2.

b. Lipidome

Comme les apolipoprotéines, les 200 espèces lipidiques identifiées au sein des particules HDL contribuent à la détermination de leurs fonctions. L'étude de Philipp Wiesner menée en 2009 chez des sujets sains normolipidémiques couple des expériences de FPLC, afin de séparer les lipoprotéines en fonction de leur densité, à des analyses des fractions isolées en

spectrométrie de masse (Wiesner et al., 2009). Les analyses lipidomiques montrent que les HDL sont enrichies en PL (37-49% des lipides totaux) (Wiesner et al., 2009; Camont et al., 2013; Ståhlman et al., 2013; Kontush et al., 2015a), les LDL en cholestérol et les VLDL, en triglycérides.

i. Phospholipides

❖ Structure et fonctions

Un PL est une molécule composée d'un groupement phosphate hydrophile, auquel sont associés deux AG hydrophobes, *via* une molécule de glycérol (figure 5). Les PL sont donc des molécules amphipathiques. Le groupement phosphate est lié à un alcool aminé (R sur la figure 5) qui peut varier : choline (générant un phosphatidylcholine PC), éthanolamine (PE), sérine (PS), inositol (PI), glycérol (PG). L'acide phosphatidique (PA) est un PL particulier qui ne possède aucun alcool lié sur son groupement phosphate. Il est généré par l'action de la phospholipase D.

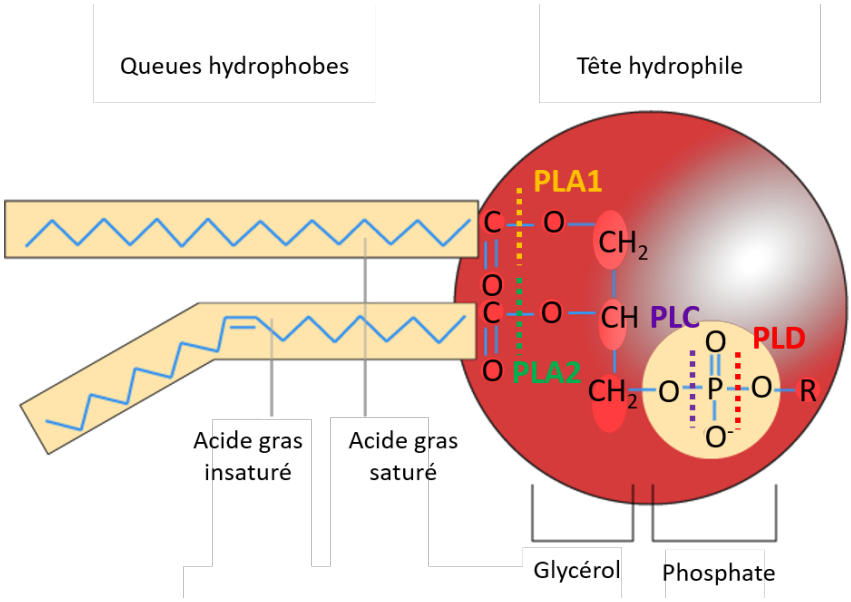


Figure 5 : Structure d'un phospholipide.
Un phospholipide est composé de de deux acides gras (saturés ou insaturés), liés à un groupement phosphate par une molécule de glycérol. Le groupe phosphate peut être modifié par l'ajout d'un alcool aminé R, qui peut être chargé ou polaire. Les phospholipases A1, A2, C ou D clive le phospholipide et en détache les différents groupements comme indiqué sur la figure.

Les deux AG ont chacun une longue chaîne carbonée (≥14C), souvent insaturée pour le second. Un AG insaturé possède une ou plusieurs double(s) liaison(s) entre 2 carbones. Lorsque les 2 C sont situés du même côté de la double liaison, on parle d'isomérie *cis*, retrouvées

naturellement dans les organismes vivants (*trans* lorsque les 2 C ne sont pas du même côté, en général synthétisés par l'Homme). En terme de nomenclature, un AG est nommé en fonction de la longueur de sa chaîne carbonée C et du nombre d'insaturations D qu'il contient (C :D). La position de la première insaturation est notée n-X ou ω-X, avec X la position du carbone concerné, comptée en partant de l'extrémité de la chaîne. Par exemple, l'acide palmitique est un acide gras saturé contenant 16 carbones sur sa chaîne, il est noté 16 :0. L'acide linoléique 18 :2 n-6 possède 18 carbones dont deux insaturations, la première survenant sur le sixième carbone de la chaîne.

Grâce à leur caractère amphiphile, les PL sont des molécules structurales des membranes cellulaires (plasmique et des organites). Ils les stabilisent, mais leur longueur, leur nature (saturés ou insaturés) et leur charge peut moduler la fluidité et la rigidité des membranes. Ils sont essentiels pour la formation des vacuoles, mais aussi l'endocytose ou la phagocytose. Leurs constituants sont mobilisables, suite à l'action de différentes phospholipases (PLA1, PLA2, PLC et PLD) (figure 5). Ils sont évidemment tous impliqués dans la formation des différentes lipoprotéines.

- Phosphatidylcholines

Les phosphatidylcholines (PC) sont les PL les plus abondants dans les HDL, tout comme dans les membranes cellulaires. Elles représentent en effet 32 à 35% des lipides totaux contenus dans les HDL (Wiesner et al., 2009; Camont et al., 2013; Ståhlman et al., 2013). Les PC sont des PL structuraux et prédominent dans les HDL_{3a} et $_{3b}$ (Camont et al., 2013). Les espèces majoritaires de PC sont de forme 16:0/18:2, 18:0/18 :2 and 16:0/20:4 (Lhomme et al., 2012). Les PC sont impliqués dans certains processus cellulaires, comme l'oxydoréduction du NAD+ en NADH et inversement par l'enzyme déshydrogénase 3-hydroxybutyrate, qui doit être liée à une PC pour agir. Les PC lient différents éléments de la chaîne respiratoire présente dans la membrane mitochondriale (cytochrome c, complexe III, ATP synthase) (Yeagle, 2014). Le dipalmytoyl-PC participe à la formation du surfactant pulmonaire et son absence peut entraîner une détresse respiratoire chez le nouveau-né.

- Phosphatidyléthanolamines et phosphatidylinositols

Les phosphatidyléthanolamines (PE) et phosphatidylinositols (PI) représentent moins de 1 % chacun des lipides totaux des HDL (Kontush et al., 2013). Ils sont tous les deux retrouvés majoritairement dans les HDL_3, les plus denses et petites. Comme les PC, les PE sont impliqués dans la respiration mitochondriale car peuvent lier spécifiquement le cytochrome bc1, ou

complexe III de la chaîne respiratoire (Yeagle, 2014). Les PI sont des PL particuliers qui peuvent subir des phosphorylations et déphosphorylations séquentielles rapides, impactant leurs fonctions : les PI monophosphates sont plutôt retrouvés dans les endosomes précoces, alors que les PI biphosphates sont présents dans les endosomes tardifs, lysosomes, vésicules de sécrétion et autophagosomes (De Craene et al., 2017). Selon les besoins cellulaires, la répartition en PI est donc modulée, via un changement d'activité des kinases et phosphatases.

- Autres phospholipides

Enfin, les cardiolipines (<0,2%), phosphatidylsérines (PS, <0,03%), acides phosphatidiques (PA, <0,009%) et les phosphatidylglycérol (PG, <0,006%), bien que largement sous représentés dans les HDL, sont des PL chargés négativement. Une différence de charge sur la membrane plasmique perturbe et modifie sa forme et sa rigidité. Cette propriété pourrait impacter la charge de surface des HDL, et ainsi moduler leurs interactions avec l'ensemble des protéines qui peuvent s'associer aux HDL (lipases, protéines des membranes plasmiques…) (Stace and Ktistakis, 2006). Par exemple, les charges négatives des PA peuvent se lier à des lysines ou des arginines, aa chargés positivement. En effet, le contenu en PS et en PA des HDL, retrouvés préférentiellement dans les HDL_{3c}, a été positivement corrélé à certaines activités biologiques des HDL (Camont et al., 2013).

- Dérivés des phospholipides

Egalement minoritaires, les plasmalogènes sont des structures dérivées des PC (2-3%) et des PE (<1%) dans lesquelles un AG est remplacé par un alcool gras *via* une liaison vinyl-éther. Les plasmalogènes qui dérivent des PE sont suggérés comme efficaces pour réduire l'oxydation du cholestérol dans la bicouche lipidique des membranes plasmiques : ils agissent comme des anti-oxydants endogènes (Maeba and Ueta, 2003).

Les lyso-PL sont des PL qui ont perdu un AG suite à l'action d'une lipase. Les lysophosphatidylcholines (LPC) dérivent des PC suite à l'action de lipases telles que la LCAT ou certaines phospholipases A (PLA), qui hydrolysent l'un des acides gras (AG) d'une PC, en position 1 (PLA1) ou 2 (PLA2). Les LPC sont majoritaires dans les HDL_{3c} et peuvent représenter jusqu'à 8% des lipides totaux des HDL. Les LPC contiennent principalement des chaines d'acides gras (AG) saturés de 16 ou 18 carbones (Lhomme et al., 2012). Les lysophosphatidyléthanolamine, dérivés des PE, sont également retrouvés dans les HDL.

ii. *Sphingolipides*

Les sphingolipides dérivent de la sphingosine (alcool gras) sur laquelle un acide gras peut être fixé (figure 6). Selon le résidu R, la nature du sphingolipide change.

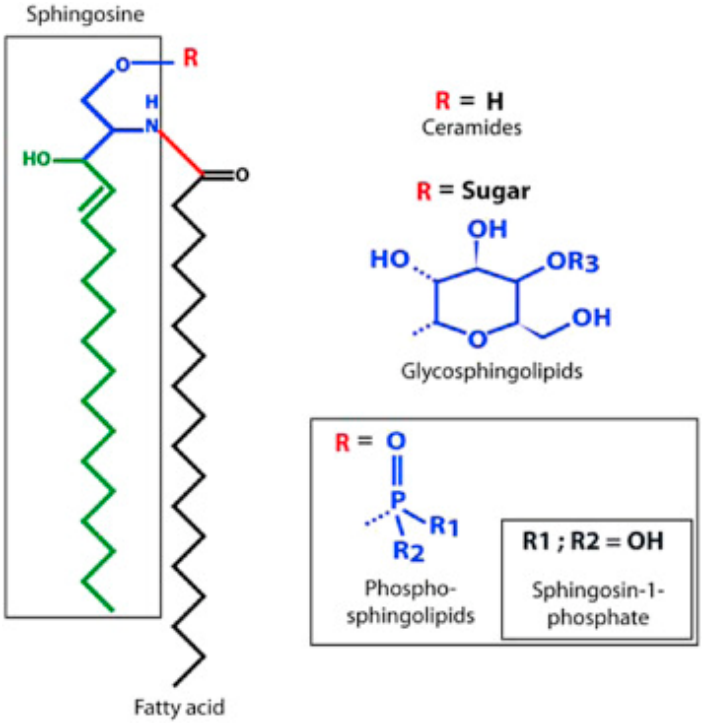


Figure 6 : Structure d'un sphingolipide
Le sphingolipide est constitué à partir d'une sphingosine (en vert), d'une tête polaire (en bleu) et d'un AG (en noir). Le résidu R fait varier la nature du sphingolipide : céramide (R = hydrogène), glycosphingolipide (R = sucre), sphingomyéline (R = phosphocholine) ou phosphosphingolipide (R = groupement phosphate). (Régnier et al., 2019)

La sphingomyéline (SM) est le sphingolipide le plus abondant des HDL (5,6 à 6,6% des lipides totaux contenus dans les HDL) (Wiesner et al., 2009; Camont et al., 2013; Ståhlman et al., 2013). Elle est principalement retrouvée dans les LDL et VLDL plasmatiques, mais peut être transférée dans les HDL_2 *via* la PLTP (Jiang et al., 1999; Nilsson and Duan, 2006). La SM agit alors comme inhibiteur de la LCAT (Rye et al., 1996) et de la LPL (Saito et al., 2000). Elle a un rôle de structuration important car elle est impliquée dans la rigidité de surface des lipoprotéines et des membranes plasmiques.

La sphingosine-1-phosphate (S1P) dérive de la sphingosine, phosphorylée par une sphingosine kinase en présence d'ATP. Les récepteurs de la S1P sont abondants dans les membranes plasmiques des cellules endothéliales : la fixation de la S1P sur ses récepteurs (S1P1 à S1P5) stimule la prolifération, l'angiogenèse et la migration endothéliale (Lucke and Levkau, 2010). Elle protège également les cellules de l'apoptose et contrôle la perméabilité

vasculaire. Majoritairement transportée dans le plasma par les HDL (50-70% de la S1P plasmatique), notamment les HDL_3 (Kontush et al., 2007), par l'intermédiaire de l'Apo M, la S1P a un rôle athéroprotecteur important *via* l'amélioration de la fonction endothéliale.

Enfin, le céramide est un sphingolipide intermédiaire : lorsqu'il est synthétisé *de novo*, il est produit à partir de palmitoyl-coA et de sérine. Les céramides peuvent conduire à la synthèse de SM et de S1P, qui peuvent elles-mêmes les régénérer. Comme la SM, les céramides sont enrichis dans les HDL_2. Ils sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire (apoptose, fonction mitochondriale, sensibilité à l'insuline…) (Lipina and Hundal, 2011).

iii. Stérols et dérivés

Comme les PL, les différentes molécules de stérols sont des lipides de surface des lipoprotéines HDL. Le cholestérol libre (CL), stérol majoritaire représentant de 8 à 13% des lipides totaux, est préférentiellement retrouvé dans les HDL_2. Avec les autres stérols (oxystérols, phytostérols, œstrogènes…) également présents à la surface des HDL, le CL est impliqué dans la fluidité de la particule.

L'estérification du CL par la LCAT génère des esters de cholestérol (CE) hydrophobes (environ 36% des lipides contenus dans les HDL) (Wiesner et al., 2009; Camont et al., 2013; Ståhlman et al., 2013), qui se retrouvent donc enchâssés au cœur de la lipoprotéine. La LCAT transfère l'AG en position 2 d'une PC sur la molécule de cholestérol. L'apo A-I agit comme activateur de cette réaction : elle regroupe PC, CL et LCAT, puis active cette dernière en facilitant l'accès à son site enzymatique. La nature des CE (due à la nature de l'AG transféré) retrouvés dans les particules HDL_2 et HDL_3 (Vieu et al., 1996).

iv. Triglycérides

Les triglycérides (TG) correspondent à la liaison de 3 chaines d'AG sur un groupement glycérol. Dans le plasma, ils sont majoritairement retrouvés sur les lipoprotéines riches en TG (*Triglycerides-Rich Lipoproteins*, TRL), les chylomicrons (90% de leur contenu) et VLDL (>50%). Les LDL contiennent aussi un faible pourcentage de TG (<5%). La CETP échange un TG des LDL et VLDL avec un CE issu des HDL. Les TG hydrophobes se retrouvent donc alors au cœur de la lipoprotéine HDL. Caractéristiques des TRL et des lipoprotéines de faible densité, ils ne représentent qu'environ 3% des lipides des HDL. La majorité des espèces de TG associées aux particules HDL contiennent des acides oléiques (18 :1 n-9), palmitiques (16 :0) et

linoléiques (18 :2, n-6) (Lhomme et al., 2012). De même que pour les CE, la nature des espèces de TG contenues dans les HDL_2 et les HDL_3 est comparable (Vieu et al., 1996).

D'autres lipides comme des molécules de diglycérol ou monoglycérol sont présents dans les HDL mais ne seront pas développés ici.

c. Glycome

Comme toutes les protéines, celles contenues dans les HDL peuvent être soumises à des modifications post-traductionnelles, telle que la glycosylation (Huang et al., 2014). Il a été montré que la glycosylation des HDL pouvait moduler leur activité : par exemple, les capacités d'efflus de cholestérol des HDL natives sont supérieures par rapport à celles modifées par la neuraminidase, enzyme réduisant la glycosylation (Sukhorukov et al., 2019). De plus, le profil de glycomique et protéomique de patients atteints de maladie coronaire est différent de celui de sujets contrôles (Krishnan et al., 2015).

d. miR-nome

Les microARNs sont de petits ARNs non codants qui peuvent être transportés dans le plasma dans des vésicules, des exosomes (Valadi et al., 2007; Moldovan et al., 2013) ou encore dans les HDL (Vickers et al., 2011). Les HDL peuvent ainsi servir de transporteurs pour ces microARNs régulateurs de l'expression génique. Comme nous le verrons ci-après dans une partie dédiée, la nature des microARNs chargés sur les particules HDL impacte leurs métabolisme et fonctions.

2. Métabolisme des lipoprotéines HDL

a. Biogenèse des HDL

Les molécules d'apo A-I libre ou contenant une très faible quantité de lipides ont différentes origines. Elles peuvent être générées par la production et la sécrétion de molécules d'apo A-I par le foie et/ou l'intestin, relarguées suite à la lipolyse des chylomicrons, ou enfin produites lors du remodelage intravasculaire des HDL_2 et HDL_3. Très rapidement, ces particules vont se charger en lipides, notamment *via* le transporteur ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1).

i. La famille des transporteurs ABC

La famille des transporteurs ABC regroupe 48 transporteurs différents chez l'Homme, répartis dans 7 familles (ABCA à ABCG). Les transporteurs ABC sont formés de 4 domaines : deux domaines NBD (*Nucleotide Binding Domain*) intracellulaires, sites de liaison à l'ATP, et

deux domaines TMB (*TransMembrane Domain*), dont les hélices α (6 pour chaque TMB) forment le canal transmembranaire. Il existe des transporteurs complets ou des hémi-transporteurs (avec uniquement 1 NBD et 1 TMB), qui doivent s'homodimériser ou s'hétérodimériser pour former un transporteur fonctionnel (Neumann et al., 2017). Incorporés aux membranes plasmiques cellulaires, ils permettent un transport actif, par hydrolyse de l'ATP, des plus petites molécules organiques ou inorganiques, aux plus grandes structures organiques, comme les hormones, acides aminés, ions, vitamines et lipides. En parallèle, des échanges de nutriments et métabolites se font souvent contre le gradient de concentration à travers la membrane plasmique. Ainsi, les transporteurs ABC permettent un maintien de l'homéostasie cellulaire. En particulier, des mutations dans les gènes codant les transporteurs de lipides sont responsables d'altération de l'homéostasie lipidique et ont un risque accru de développer une maladie associée.

ii. Le rôle du transporteur ABCA1

❖ Généralités

A la fin des années 1990, la découverte de mutations dans le gène ABCA1 comme étant responsables de la maladie de Tangier, aussi appelée hypoalphalipoprotéinémie, met en exergue le rôle d'ABCA1 dans le métabolisme des lipoprotéines. Caractérisée par une baisse drastique de la quantité d'HDL sphériques dans le plasma des individus atteints, elle est due à une mutation dans le gène *ABCA1* (Bodzioch et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999; Rust et al., 1999). Le gène du transporteur ABCA1 est situé sur le chromosome 9q31 et la protéine codée contient 2261 acides aminés (254 kDa). Sa structure secondaire est composée de 2 domaines TMB dont les hélices α sont orientées de façon antiparallèle. Le mécanisme d'action de ce transporteur est alors identifié : la fixation de l'apo A-I sur ABCA1 assure l'efflux (passage du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire) de CL et de PL vers les molécules d'apo A-I faiblement lipidées (Oram et al., 2000). Il a été montré récemment qu'ABCA1 fait un efflux préférentiel vers les lipoprotéines HDL de très petite taille (apo A-I faiblement lipidées et pré-β, environ 10 à 15% d'efflux de cholestérol cellulaire) et les HDL_3, mais qu'elle peut aussi réaliser de l'efflux vers les HDL_2, avec une efficacité moindre (environ 5%) (Du et al., 2015).

❖ Profil d'expression et régulation génique

Bien qu'ubiquitaire chez l'Homme, le rôle spécifique d'ABCA1 dans certains tissus a été étudié. La délétion spécifique d'ABCA1 dans le foie entraîne une diminution significative des concentrations circulantes de HDL-C (12 mg/dL contre 88 mg/dL chez les animaux

contrôles) et une hausse du catabolisme de l'apo A-I par le rein. L'efflux de cholestérol et de PL des hépatocytes primaires isolés des animaux déficients est réduit par rapport aux animaux contrôles (Timmins et al., 2005). Cette étude identifie le foie comme organe clé dans la génération des particules HDL, notamment des pré-β. L'expression hépatique d'ABCA1 est impliquée dans l'athérosclérose, car les souris de fond génétique Apo E KO (qui développent des plaques d'athérome sous régime riche en graisse) déficientes pour ABCA1 dans le foie voient la taille de leur plaque augmentée par rapport aux souris Apo E KO contrôles (Brunham et al., 2009). Dans la même étude, les auteurs montrent que la délétion spécifique d'ABCA1 dans les macrophages n'a pas d'impact sur la taille de la plaque. Enfin, le même groupe a identifié l'intestin comme générant environ 30% du « pool » plasmatique de HDL : les concentrations de HDL-C plasmatiques passent de 75 mg/dL (souris contrôles) à 49 mg/dL (délétion ABCA1 spécifique dans l'intestin). La combinaison des doubles KO intestinal et hépatique montre que l'expression d'ABCA1 dans ces 2 tissus explique environ 90% des concentrations plasmatiques de HDL-C (Brunham et al., 2006).

L'expression d'ABCA1 est notamment stimulée par la voie des récepteurs nucléaires LXR et RXR (*Liver/Retinoid X Receptors*). L'accumulation de cholestérol dans les cellules augmente les concentrations intracellulaires d'oxystérols (dérivés oxydatifs des stérols). Ceux-ci sont des ligands de LXR par exemple, dont ils permettent l'activation. Ainsi activé, LXR peut se fixer sur des éléments de réponse présents dans les régions promotrices de certains gènes, dont *ABCA1* (mais aussi *ABCG1/G5/G8, APO E, LPL Lipoprotein Lipase*…).

- Régulation post-traductionnelle

Le cholestérol étant essentiel aux cellules, l'efflux *via* ABCA1 doit être finement régulé. Le transporteur ABCA1 a ainsi une demi-vie courte, de 1 à 2 heures, pour prévenir une diminution excessive du cholestérol intracellulaire. L'interaction d'apo A-I et ABCA1 peut agir pour limiter sa dégradation, par l'intermédiaire de différentes protéines kinases : PKA, PKC, Janus kinase 2. L'interaction entre ABCA1 et l'apo A-I induit une augmentation des quantités d'AMP cyclique (AMPc, *cyclic Adenosine MonoPhosphate*) et de la phosphorylation d'ABCA1, opérée par l'activation de la PKA (Zhao et al., 2012). De la même manière, l'apo A-I induit l'efflux de lipides et des réarrangements membranaires qui active PKCα, qui elle-même phosphoryle ABCA1. Celle-ci est ainsi protégée d'une dégradation par la calpaïne (Yamauchi et al., 2003). En parallèle, cette dégradation spécifique peut être empêchée par la déphosphorylation de la séquence PEST (séquence riche en proline (P), acide glutamique (E) sérine (S) et thréonine (T)) par l'apo A-I (Martinez et al., 2003). La protéine Janus kinase 2

(JAK2) est activée par autophosphorylation suite à la liaison apo A-I/ABCA1. JAK2 stimule alors l'efflux via ABCA1.

- Mécanisme d'action

ABCA1 est transporté au sein de la cellule par des endosomes et lysosomes, qui lui permettent de rejoindre la membrane plasmique (Neufeld et al., 2001). Le transporteur induit alors des réarrangements membranaires favorisant une liaison avec les apolipoprotéines présentes dans le milieu extracellulaire (Vedhachalam et al., 2007). En effet, lorsqu'il est exprimé à la membrane, ABCA1 est enclin à se lier à des apo A-I, qui le stabilisent. La fixation de l'apo A-I sur ABCA1 requiert de l'ATP, qui peut être fixée et hydrolysée sur les deux domaines NBDs du transporteur. (Nagao et al., 2012)

Les PL, jusqu'alors présents sur les deux couches de la membrane plasmique, sont transloqués par ABCA1 sur la couche externe. Le cholestérol est également déplacé des radeaux lipidiques où il est peu accessible et peut alors être capté par les lipoprotéines. Le déséquilibre de quantité de lipides sur les deux couches de la membrane créé par ABCA1 induit une tension : la membrane forme une courbe. Des exovésicules se forment, restent accrochées à la membrane et possèdent une forte affinité pour l'apo A-I (Vedhachalam et al., 2007). Finalement, la tension créée sur la membrane est telle que l'exovésicule s'en détache, générant des HDL discoïdales. Celles-ci peuvent contenir une ou plusieurs molécules d'apo A-I.

Un transporteur ABCA1 fonctionnel est donc nécessaire pour initier la liaison avec l'apo A-I et l'efflux de cholestérol et PL (Chambenoit et al., 2001; Smith et al., 2004). Cependant, la fixation des deux complexes protéiques n'est pas suffisante comme le montre une étude menée sur le mutant W950S du gène ABCA1, qui maintient la fixation sans permettre l'efflux (Fitzgerald et al., 2004).

- L'efflux de lipides

L'efflux de lipides (principalement cholestérol et PL) par ABCA1 est la fonction première de cette protéine. Il permet la formation de lipoprotéines HDL pré-β à partir d'apo A-I. Chez la souris, la déficience pour Abca1 impacte l'efflux de cholestérol global et le transport inverse (*Reverse Cholesterol Transport*, RCT) de celui-ci, vers le foie, qui assure son recyclage et son élimination, prouvant le rôle prépondérant des HDL dans ce mécanisme, et la nécessité de générer ces particules (Wang et al., 2007).

Deux théories ont été développées quant aux mécanismes cellulaires d'efflux. Le premier suggère un mécanisme extracellulaire sans entrée d'apo A-I dans la cellule. Lorsqu'ABCA1 est exprimé à la membrane, les remaniements induisent une diminution du nombre de radeaux lipidiques. Ceci entraîne une redistribution du cholestérol à la membrane, qui facilite sa mobilisation et son efflux (Vaughan and Oram, 2003). En accord avec cette hypothèse, une étude montre qu'ABCA1, *via* une activité « floppase », stimule le passage de la couche interne à la couche externe de la membrane du PL PIP2 (PI (4,5) bis-phosphate) : ce réarrangement induit une fixation de l'apo A-I et l'efflux de lipides vers cette apolipoprotéine (Gulshan et al., 2016). Le deuxième mécanisme implique la fixation de l'apo A-I sur ABCA1. Après formation de ce complexe, il serait internalisé au sein des endosomes, puis adressé vers les vésicules de stockages des lipides intracellulaires. L'apo A-I est alors lipidée, puis ramenée à la membrane où elle est libérée dans le milieu extracellulaire (Takahashi and Smith, 1999). Cette hypothèse est renforcée par une étude menée *in vitro* sur une lignée de macrophages murins RAW 264.7. Il est démontré qu'un traitement à la cyclosporine A augmente de plus de 2 fois le temps de rétention d'Abca1 à la membrane plasmique). Cela serait dû à l'effet de la cyclosporine sur apo A-I, dont l'endocytose, la resécrétion et la dégradation sont altérées. En impactant la circulation intracellulaire d'apo A-I, la cyclosporine A empêche l'efflux de lipides ABCA1-dépendant (Le Goff et al., 2004). Chez la souris traitée à la cyclosporine A, une baisse des concentrations de HDL-C est observée dans le plasma. Il y a donc bien une partie de l'efflux via ABCA1 qui se fait par une voie d'endocytose.

La souris *Ldl-r* KO, nourrie avec un régime riche en graisse, voit sa plaque d'athérosclérose légèrement augmentée lorsqu'elle subit une transplantation de moelle osseuse issue d'une souris *Abca1* KO. Ceci est notamment dû à une forte diminution de la capacité d'efflux vers les apo A-I et E. Ainsi, Abca1 a un rôle antiathérogène dans les macrophages (Yvan-Charvet et al., 2007). La délétion d'*Abca1* dans le foie de souris *Ldl-r* KO entraîne une baisse drastique des concentrations de HDL-C plasmatiques, entraînant une baisse des concentrations de cholestérol totales. Le plasma des souris déficientes pour Abca1, nourries avec un régime riche en cholestérol, voient leur capacité à faire de l'efflux de cholestérol des macrophages réduites d'environ 24% en comparaison aux souris contrôles. De façon surprenante, le régime riche en graisse réduit également le cholestérol contenu dans les LDL et VLDL, ce qui peut expliquer que les auteurs n'aient pas identifié de diminution de la plaque d'athérosclérose chez ces souris avec délétion spécifique d'Abca1 dans le foie (Bi et al., 2013).

Il est intéressant de noter que l'efflux par ABCA1 peut se faire grâce à l'interaction du transporteur avec d'autres apolipoprotéines, retrouvées minoritaires au sein des HDL. En présence d'ABCA1, les apo A-II, apo C-I, II et III ou encore l'apo E sont des accepteurs de cholestérol (Remaley et al., 2001). Il existe une forte compétitivité entre l'apo A-I et l'apo A-II pour la liaison sur ABCA1 (Fitzgerald et al., 2004). Il est donc suggéré que l'hélice amphipathique, caractéristique commune de toutes les apolipoprotéines, soit le motif structural déterminant la capacité des apolipoprotéines à former un complexe avec ABCA1. L'ensemble de ces mécanismes d'efflux de CL et de PL génèrent des lipoprotéines discoïdales, de type HDL pré-β.

b. Remodelage intravasculaire

Les HDL discoïdales ainsi générées vont alors subir un remodelage dans l'espace intravasculaire. Les différents acteurs impliqués, comme les enzymes ou les transporteurs membranaires, brièvement cités dans l'avant-propos de ce document, vont être largement décrits ci-après (figure 1).

i. Estérification par la LCAT

Le gène qui code pour la LCAT est situé sur le chromosome 16q2 et est très majoritairement exprimé dans le foie. La LCAT est sécrétée dans le plasma et circule associée aux lipoprotéines.

- Mécanisme

La LCAT transfère le groupement acyl (AG) en position 2 d'une PC vers le groupement hydroxyle d'une molécule de CL (Fielding et al., 1972). La réaction peut également se faire avec une PE comme substrat (Pownall et al., 1985). L'apo A-I et l'apo E sont les principaux activateurs de la LCAT (Fielding et al., 1972; Zhao et al., 2005; Zannis et al., 2008). Les transferts par la LCAT ont lieu préférentiellement sur les HDL pré-β. L'estérification du CL entraîne ainsi la conversion des HDL pré-β en HDL sphériques matures (Nakamura et al., 2004).Cependant, il faut noter que la LCAT est également capable d'interagir et d'estérifier le CL à partir de lipoprotéines contenant l'apo B, notamment les LDL (Barter, 1983).

La conformation tridimensionnelle de l'apo A-I peut impacter l'activité de la LCAT en modulant ses interactions avec les particules HDL. Certaines études proposent que les hélices 5 de deux molécules d'apo A-I s'agencent en opposition pour se lier et activer la LCAT : on parle de conformation 5/5. En revanche, la conformation 5/2 (hélice 5 d'une molécule d'apo A-

I en opposition à l'hélice 2 d'une seconde molécule) réduit significativement les capacités d'estérification des PL des HDL par la LCAT, sans empêcher sa liaison (Cooke et al., 2018).

❖ Pathologies associées

Des mutations dans le gène codant la LCAT sont associées à deux phénotypes : la déficience familiale en LCAT (*Familial LCAT Deficiency* FLD) est caractérisée par une incapacité à estérifier le cholestérol des LDL et des HDL, alors que la « maladie des yeux de poisson » (*Fish-Eye Disease* FED) présente les mêmes caractéristiques, mais uniquement pour le HDL. Dans les deux cas, une accumulation importante d'HDL pré-β et de très petites HDL α est observée (Daniil et al., 2011). En conséquence, la capacité d'efflux de cholestérol du sérum *via* ABCA1 de patients porteurs d'une mutation du gène qui code LCAT est augmentée. Elle est au contraire diminuée *via* les autres transporteurs ABCG1 et SR-BI (Calabresi et al., 2009). Récemment, le groupe de Laura Calabresi a étudié les conséquences de la FLD (n=33 patients) et la FED (n=41 patients) sur l'athérosclérose. Les 74 patients ont des concentrations plasmatiques de cholestérol total et de HDL-C diminuées par rapport aux 28 sujets contrôles. En revanche, les résultats divergent sur le lien avec l'athérosclérose : les patients FLD ont une baisse de l'athérosclérose alors qu'elle est augmentée chez les patients FED (Oldoni et al., 2018). La diminution de près de 20% des concentrations de LDL-C chez les patients FLD (par rapport aux deux autres groupes) peut expliquer cette différence. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore caractérisés, mais les auteurs proposent que la LCAT des patients FED puisse toujours estérifier le cholestérol des lipoprotéines contenant l'apo B, notamment les LDL. Cette fonction ne serait plus remplie chez les patients FLD.

ii. Le transporteur ABCG1

❖ Généralités

ABCG1 appartient, comme ABCA1, à la famille des transporteurs ABC. Il a d'abord été identifié chez la drosophile comme transporteur de guanine et de tryptophane, impliqués dans la pigmentation de l'œil (Savary et al., 1996). Son homologue humain a alors été mis en évidence sur le chromosome 21q22 (23 exons).

❖ Profil d'expression et régulation génique

Chez l'Homme comme chez la souris, *ABCG1*, bien que relativement ubiquitaire, est principalement exprimé dans le poumon, la rate, le cerveau, le foie, le cœur et les glandes surrénales (Croop et al., 1997; Klucken et al., 2000). Dans ces tissus, ABCG1 est fortement

exprimé dans les macrophages. Cependant, nous avons mis en évidence un profil d'expression différentiel dans le foie : chez l'Homme, nous avons montré qu'ABCG1 est exprimé dans le foie, dans les macrophages comme les hépatocytes (*Hardy et al., 2019, soumis*), alors qu'il est retrouvé restreint aux macrophages dans le foie chez le rat (Hoekstra et al., 2003). Au niveau cellulaire, ABCG1 peut être retrouvé dans des vésicules (endosomes précoces et tardifs et lysosomes) impliquées dans le transport intracellulaire (Wang et al., 2006), mais aussi à la membrane plasmique (Vaughan and Oram, 2005; Gu et al., 2013).

Les stérols agissent comme stimulateur pour l'expression d'ABCG1, *via* la voie des récepteurs X du foie (LXR, *Liver X Receptors*). De nombreux éléments de réponse LXR sont présents au sein du gène *ABCG1*, sur lesquels des agonistes LXR (notamment des oxystérols) se fixent lorsque la concentration de cholestérol intracellulaire augmente (Kennedy et al., 2001; Sabol et al., 2005).

- Régulation post-traductionnelle

Le transporteur ABCG1 est un hémitransporteur constitué de 6 hélices α constituant le domaine transmembranaire TMD, et d'un domaine NBD intracellulaire (figure 7). Ce domaine NBD contient des motifs appelés Walker A et B, impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, qui fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement d'ABCG1. Il existe deux isoformes du transporteur, qui diffèrent d'un segment de 12 acides aminés sur l'exon 17. La souris n'exprime que la forme courte d'ABCG1(-12) alors que les deux isoformes sont exprimées chez l'Homme (Engel et al., 2006; Gelissen et al., 2010). Comme pour ABCA1, la PKA peut favoriser la dégradation de la forme complète d'ABCG1(+12) en phosphorylant une sérine proche de cette séquence de 12 aa (S389) (Gelissen et al., 2012). Cette sérine, en position 377 dans la forme ABCG1(-12), n'est plus sujette à la phosphorylation. En conséquence, ABCG1(+12) est nettement moins abondant dans les macrophages humains et les cellules vasculaires, car plus dégradé (Gelissen et al., 2010).

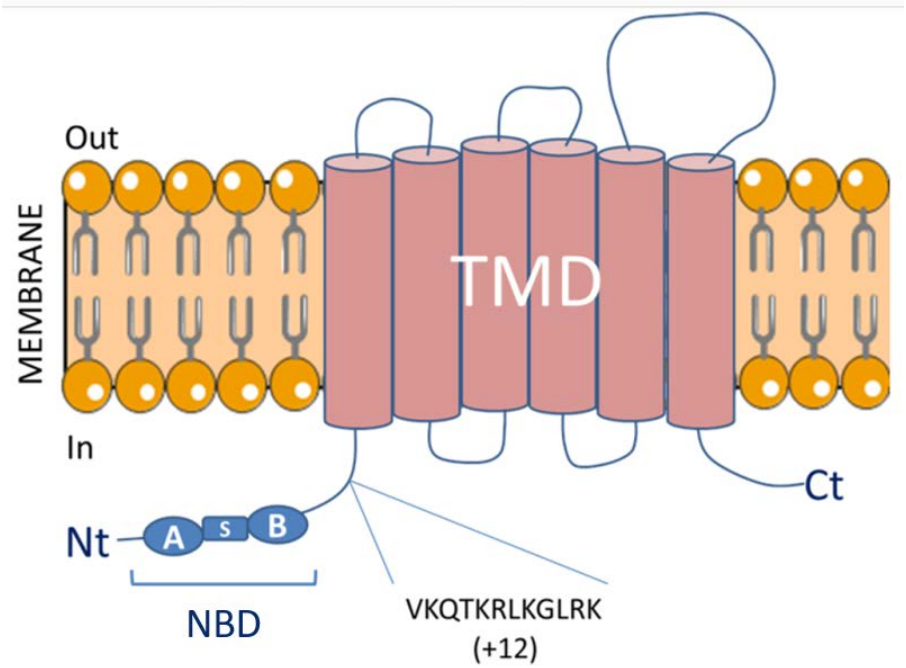


Figure 7 : Structure du transporteur ABCG1
Le transporteur possède un domaine intracellulaire NBD (composé des régions, Walker A, Walker B et Signature) et un domaine transmembranaire TMD, composé de 6 hélices α. La forme complète contient les 12 acides aminés indiqués (+12). Deux transporteurs ABCG1 est un hémitransporteur qui doit s'homodimériser ou s'hétérodimériser pour former un transporteur fonctionnel. (Hardy et al., 2017)

De plus, ABCG1 peut être régulé par la voie de l'ubiquitine protéasomale : l'ubiquitination d'ABCG1 par les ubiquitines ligases E3 HUWE1 (*HECT, UBA, and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase*) et NEDD4-1 (*Neural precursor cell-expressed developmentally down regulated gene 4*) favorise sa dégradation (Aleidi et al., 2015). De façon intéressante, de la même manière qu'il peut réguler l'expression d'ABCG1, la concentration intracellulaire de cholestérol impacte cette ubiquitination (augmentée lorsque les concentrations de cholestérol sont faibles) (Hsieh et al., 2014).

- Mécanisme d'action

ABCG1 doit s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec ABCG4 pour constituer un transporteur transmembranaire complet donc fonctionnel (Cserepes et al., 2004). Le mécanisme d'action d'ABCG1 pour réaliser de l'efflux n'est pas élucidé. Il pourrait agir en redistribuant les lipides membranaires au cours de son cheminement depuis les différentes structures vésiculaires jusqu'à la membrane plasmique (Vaughan and Oram, 2005; Tarling and Edwards, 2011). Dans les vésicules impliquées dans le transport intracellulaire des lipides, ABCG1 pourrait participer à l'homéostasie intracellulaire du cholestérol et de ses dérivés comme les hydroxystérols. Au niveau de la membrane plasmique, il est proposé qu'ABCG1 impacte les flux de lipides entre les couches interne et externe, facilitant ainsi l'accès au cholestérol pour

les différents accepteurs (Neufeld et al., 2014). De façon intéressante, un autre travail de Neufeld et coll. suggère que ce rôle est maintenu lorsqu'ABCG1 est retenu dans les endosomes tardifs et absent de la membrane plasmique (Neufeld et al., 2001). Aucune liaison directe entre ABCG1 et l'apo A-I et les HDL n'a pu être mise en évidence, suggérant que ces remaniements dépendants d'ABCG1 sont indépendants de la présence d'accepteurs (Sankaranarayanan et al., 2009).

- Fonction

Le transporteur ABCG1 est impliqué dans l'efflux de nombreuses molécules variées : cholestérol, PL, SM, oxystérols (7-ketocholestérol, 7β-hydroxycholestérol and 25-hydroxycholestérol) et vitamine E (α- and γ-tocophérol) (Vaughan and Oram, 2006; Engel et al., 2007; Li et al., 2010; Engel et al., 2014; Olivier et al., 2014). Contrairement à ABCA1, il n'a pas été montré de liaison directe entre ABCG1 et l'apo A-I libre. Au contraire, il réalise de l'efflux vers les HDL_2 et $_3$ sphériques, mais aussi vers les HDL pré-β (Favari et al., 2009).

Malgré ce rôle d'ABCG1 dans l'efflux de lipides vers les HDL, sa déficience chez la souris n'impacte pas les concentrations plasmatiques de lipides, notamment de cholestérol associé aux HDL. En effet, les souris Abcg1 KO ou transgéniques pour le gène *ABCG1* humain ne présentent pas de différences dans les concentrations de lipides plasmatiques, qu'elles soient soumises à un régime normal ou à un régime athérogénique, riche en graisse et cholestérol (Kennedy et al., 2005; Out et al., 2007; Burgess et al., 2008). Cependant, son rôle semble prépondérant dans l'accumulation tissulaire de lipides. Lorsqu'elles sont nourries à ce régime athérogénique, les souris C57Bl/6 accumulent des lipides (TC, CE et PL) dans le foie et le poumon, notamment dans les macrophages pulmonaires. Ce phénomène est exacerbé lorsque les souris sont déficientes pour *Abcg1* et inhibé chez les souris transgéniques pour *ABCG1* humain (Kennedy et al., 2005). Ces observations sont une conséquence de la modulation des capacités d'efflux vers les accepteurs HDL.

Grâce à ce rôle spécifique dans le maintien de l'homéostasie lipidique, notamment dans les macrophages, Abcg1 est proposé comme protecteur lors du développement de l'athérosclérose. Cependant, chez la souris soumise à un régime riche en graisse et cholestérol, les résultats sont très contradictoires :

- L'expression d'ABCG1 humain chez des souris Apoe KO ou Ldl-r KO a été montré comme sans effet (Burgess et al., 2008) ou aggravant l'athérosclérose (Basso et al., 2006), respectivement.

- La déficience pour Abcg1 semble aggraver l'athérosclérose chez des souris WT, concluant qu'Abcg1 est protecteur chez ces souris (Out et al., 2007).
- La délétion d'Abcg1 spécifique dans les cellules myeloïdes dont les macrophages (par transplantation de moelle osseuse) chez des souris Apoe KO ou Ldl-r KO ne permet pas de conclure sur son rôle protecteur ou délétère (Baldán et al., 2006; Out et al., 2006; Ranalletta et al., 2006; Tarling et al., 2010).

Ainsi, les conclusions sur le rôle d'Abcg1 dans le développement de l'athérosclérose chez la souris restent difficiles. L'étude de Meurs et coll. propose que le rôle d'Abcg1 dans le développement de la plaque d'athérome chez la souris soit dépendant du stade de progression de la lésion. Dans les phases précoces (10 semaines de régime riche en graisse), les souris doubles KO pour *Abcg1* et *Ldl-r* développent une lésion plus importante que les souris Ldl-r KO. En revanche, après 12 semaines de régime, la délétion pour Abcg1 semble protéger les souris de la progression de la plaque d'athérome (Meurs et al., 2012). Cette étude pourrait expliquer les différences d'interprétation évoquées ci-dessus.

A la différence de chez la souris, il a été montré qu'ABCG1 n'était pas impliqué dans l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL chez l'Homme (Larrede et al., 2009). En revanche, ce transporteur est impliqué dans l'efflux d'oxystérols comme le 7-kétocholestérol depuis les macrophages vers les HDL (Xu et al., 2009). Par ailleurs, dans un environnement riche en TG, ABCG1 peut contrôler l'expression et la biodisponibilité de la LPL. Il favorise alors leur accumulation cellulaire et a un rôle délétère (Olivier et al., 2012).

ABCG1 est un transporteur complexe, dont les fonctions peuvent différer selon l'espèce, le type cellulaire, ou encore selon l'environnement cellulaire dans lesquels il est exprimé.

❖ Polymorphismes génétiques

Chez l'Homme, il existe de nombreuses études s'intéressant aux polymorphismes du gène *ABCG1* (Iida et al., 2002) et de son promoteur et à leur rôle potentiel dans la modulation des lipides plasmatiques, dans des contextes de MCV (Hardy et al., 2017). De nouveau, les résultats sont assez contradictoires. Certaines n'ont pas mis en évidence d'associations entre les polymorphismes d'ABCG1 et les concentrations de lipides plasmatiques, que ce soit dans des populations de volontaires sains (Liu et al., 2014) (n=200) ou de patients atteints de pathologies CV (Furuyama et al., 2009; Xu et al., 2011) (n=109 et n=2034, respectivement). Notre groupe a également identifié deux polymorphismes d'ABCG1 associés (rs1378577, T>G and rs1893590, A>C) à l'activité LPL dans la cohorte REGRESS (*Regression Growth Evaluation*

Statin Study), sans qu'ils n'aient été associés aux concentrations plasmatiques de TG ni au développement de l'athérosclérose (Olivier et al., 2012). D'autres études, menées dans de plus larges cohortes, ont mis en évidence des associations entre certains variants d'ABCG1 et les concentrations plasmatiques de HDL-C (Edmondson et al., 2011; Schou et al., 2012). Cependant, aucune association entre ces polymorphismes et le risque d'infarctus du myocarde ou d'ischémie cardiaque n'a été montrée. De façon surprenante, ce type d'association a été établi concernant d'autres polymorphismes particulièrement peu fréquents du gène *ABCG1* (Schou et al., 2012). La même conclusion a été faite dans une autre étude : le risque de pathologie coronaire est associé à certains polymorphismes du gène *ABCG1*, sans aucune association avec les concentrations de HDL-C plasmatiques (Xu et al., 2011).

Ces associations semblent dépendantes de l'apport en lipides. Une étude reporte en effet une association entre un polymorphisme d'ABCG1 et les concentrations de HDL-C circulantes, uniquement en situation postprandiale (Abellán et al., 2010). De la même manière, les concentrations de HDL-C sont associées à un variant dans le gène ABCG1 chez des individus à jeun avec un apport important d'acides gras polyinsaturés (Abellán et al., 2011).

L'ensemble de ces données contradictoires obtenues par des études GWAS (*Genome-Wide Association Studies)* rendent les conclusions difficiles quant au rôle d'ABCG1 dans la détermination des concentrations plasmatiques de HDL-C et dans le risque de MCV. Le rôle du transporteur ABCG1 semble complexe, dépendant notamment du contexte lipidique et de la pathologie étudiée.

- Coopération ABCA1 – ABCG1

Une coopération séquentielle entre ABCA1 et ABCG1 a bien été décrite, participant respectivement à la biogenèse des particules HDL et à leur remodelage en HDL matures : les HDL pré-β obtenues suite à la lipidation de l'apo A-I par ABCA1 sont ensuite prises en charge par ABCG1 (Gelissen et al., 2006; Vaughan and Oram, 2006). Chez la souris *Ldl-r* KO, la double déficience pour *Abca1* et *Abcg1* dans les cellules myéloides impacte fortement les capacités d'efflux vers l'apo A-I, l'apo E et vers les HDL (Yvan-Charvet et al., 2007). En conséquence, les cellules spumeuses s'accumulent, notamment dans le coeur, et les macrophages péritonéaux ont un contenu en CE et TC augmenté, que ce soit avec un régime normal ou riche en cholestérol. Dans le plasma, une baisse de TC n'est cependant observée que lorsque les souris ont été nourries 16 semaines avec un régime en graisse (Out et al., 2008). Le double KO entraîne également une augmentation de la réponse inflammatoire, majoritairement

due à Abcg1 (Yvan-Charvet et al., 2007). Enfin, les deux transporteurs ABCA1 et ABCG1 et leurs efflux vers les lipoprotéines HDL sont suggérés comme impliqués dans la myélopoïèse : la leucocytose augmente chez les souris double déficientes pour *Abca1* et *Abcg1* dans la lignée myéloïde. Ce phénotype est réversé chez les animaux exprimant le transgène humain *APO A-I*, qui ont des concentrations plasmatiques de HDL augmentées (Yvan-Charvet et al., 2010b).

iii. Autres transporteurs

D'autres transporteurs de la famille ABC ont été montrés comme impliqués dans l'efflux de lipides vers les lipoprotéines HDL. ABCA7 possède une forte homologie de séquence avec ABCA1. Il est majoritairement exprimé dans le cerveau, où sa dysfonction a été montrée comme impliquée dans la maladie d'Alzheimer, grâce à son rôle dans la phagocytose (Iwamoto et al., 2006). Cependant, ABCA7 est exprimé dans d'autres tissus au niveau des membranes cellulaires, où il peut participer à l'efflux de cholestérol et lipides, notamment des PS (Quazi and Molday, 2013), vers des accepteurs tels que les HDL.

ABCG4 est lui un transporteur qui peut se dimériser avec ABCG1, suggérant ainsi des rôles similaires. Il est majoritairement exprimé dans le cerveau. Cependant, comme ABCG1, ABCG4 est aussi retrouvé dans les macrophages et son expression est stimulée par la voie LXR. Il est montré que l'expression d'ABCG4 dans des lignées cellulaires de fibroblates peut participer à l'efflux de cholestérol ABCG1-dépendant vers les HDL_2 et HDL_3 (Wang et al., 2004; Vaughan and Oram, 2006). Dans les mégakaryocytes, Abcg4 favorise l'efflux de cholestérol et diminue la prolifération de ces cellules, réduisant ainsi la production de plaquettes et le risque de thrombose (Murphy et al., 2013).

iv. Le récepteur SR-BI

❖ Généralités

SR-BI (ou SCAR-BI pour *Scavenger Receptor class B type 1*) est un gène porté par le chromosome 12q24, qui code pour un récepteur « scavenger » membranaire glycoprotéique. Il a été identifié par le groupe de Goldstein et Brown en 1979 (Goldstein et al., 1979) et est impliqué dans l'efflux de lipides, ou encore dans leur captation sélective, selon le type cellulaire concerné. SR-BI a une expression ubiquitaire, est majoritairement exprimé dans le foie et les glandes surrénales, mais aussi dans d'autres types cellulaires et tissus, comme les macrophages, les cellules endothéliales, l'intestin... Sa structure est composée d'une large boucle extracellulaire, de deux domaines transmembranaires et deux domaines cytoplasmiques

(Krieger, 1999). Son ligand préférentiel est le HDL (Acton et al., 1996) mais il est également capable de lier d'autres lipoprotéines comme les chylomicrons, LDL, VLDL. En effet, une surexpression hépatique de SR-BI dans les souris C57/Bl6 entraîne une diminution significative des concentrations plasmatiques de HDL, LDL, mais aussi des TRL (VLDL et chylomicrons) (Out et al., 2005). Son expression est stimulée par les ligands des récepteurs LXR et PPARα, et son promoteur possède des éléments de réponse aux protéines SREBP1.

- Mécanisme d'action

Grâce à sa structure en boucle extracellulaire, SR-BI réalise un flux bidirectionnel de CL et de CE entre les lipoprotéines et la membrane plasmique où il est exprimé. L'expression de SR-BI induit un réarrangement lipidique de la membrane, avec formation de micro-domaines riches en cholestérol, appelés *caveolae-like* (Krieger and Herz, 1994). SR-BI réalise des échanges de lipides avec les HDL_2 préférentiellement, et est incapable d'en faire avec l'apo A-I libre. Même si la liaison de SR-BI avec les HDL facilite les flux, son action peut avoir lieu indépendamment d'une liaison avec les HDL (de la Llera-Moya et al., 1999). Il est proposé que la boucle extracellulaire forme un canal hydrophobe qui permet le transit des différents lipides. Cependant, une étude montre que SR-BI induit l'endocytose de la lipoprotéine HDL, entraînant ainsi les échanges de lipides au sein de la cellule, avant qu'elle soit sécrétée de nouveau (Silver et al., 2001).

- Fonctions

SR-BI est largement impliqué dans le RCT : dans les macrophages, il réalise de l'efflux de CL vers les lipoprotéines, et dans les tissus périphériques comme le foie, il permet la captation sélective de CE depuis ces lipoprotéines vers l'intérieur de la cellule. Son action permet le retour vers le foie d'environ 33% des CE des HDL. La direction du flux permis par SR-BI dépend de la composition des HDL circulantes et du contenu en cholestérol de la membrane plasmique. En effet, Yancey et al. a montré, suite à une surexpression cellulaire de SR-BI, une forte augmentation de l'efflux de CL de la cellule vers les HDL lorsque celles-ci sont enrichies en PL, notamment en PC (Yancey et al., 2000). De même, dans la cellule, une augmentation du ratio CL/PL stimule l'efflux de CL. Ainsi, les HDL de grande taille ont une meilleure capacité à faire de l'efflux via SR-BI (Thuahnai et al., 2004). SR-BI entraîne majoritairement un influx de CE, mais peut aussi contrôler l'entrée de PL, TG ou de vitamine E dans la cellule. In vitro, l'incubation de HDL enrichies en CE ou en TG avec des cellules

hépatiques HepG2 ou surrénales Y1 suggère en effet une compétition d'influx cellulaire de ces deux lipides (Greene et al., 2001).

Les études menées chez la souris déficientes pour Sr-bI, qui voient leurs concentrations de cholestérol plasmatique augmentées, confirment son rôle prépondérant dans la clairance des CE chargés dans les lipoprotéines (Rigotti et al., 1997; Out et al., 2004). Plus précisément, l'invalidation spécifique de Sr-bI dans l'hépatocyte augmente les concentrations de HDL-C circulantes et favorise le développement de la plaque d'athérome (Huby et al., 2006). Réciproquement, les souris transgéniques pour Sr-bI voient leurs concentrations de cholestérol diminuées, tout comme le volume de la plaque (Arai et al., 1999). Une étude menée au sein de notre laboratoire montre que l'expression de Sr-bI dans les macrophages de souris susceptibles de développer de l'athérosclérose sous régime riche en graisse et en cholestérol réduit la plaque d'athérosclérose en contrôlant l'apoptose de ces cellules (Galle-Treger et al., 2019). Chez l'Homme, SR-BI semble avoir des fonctions similaires : plusieurs études ont montré que des variants dans le gène *SCARB1* étaient associés aux concentrations de HDL-C plasmatiques (Vergeer et al., 2011; Zanoni et al., 2016; Helgadottir et al., 2018). L'une des études indique que le polymorphisme identifié, peu fréquent, (P376L, proline remplacée par une leucine à la position 376) est associé au risque de pathologie coronaire (Zanoni et al., 2016), alors qu'aucune association n'est mise en évidence dans les autres études (Vergeer et al., 2011; Helgadottir et al., 2018). Il faut noter que les variants étudiés sont différents dans ces analyses.

D'autres rôles ont été prêtés à SR-BI : il a été montré comme impliqué dans la transcytose des lipoprotéines LDL au sein des cellules endothéliales, c'est-à-dire leur passage dans la paroi artérielle au cours de l'athérosclérose (Huang et al., 2019). Ce mécanisme est aussi retrouvé dans le transport des HDL *via* SR-BI, qui peuvent pénétrer dans la lymphe par transcytose (Lim et al., 2013). Enfin, SR-BI semble impliqué dans le catabolisme du cholestérol pour excrétion *via* la bile, les concentrations de cholestérols biliaires étant réduites chez les souris déficientes en SR-BI (Mardones et al., 2001).

L'ensemble de ces travaux soutiennent l'importance du rôle de SR-BI dans le transport inverse de cholestérol. En tant que récepteur favorisant d'une part l'efflux de cholestérol par les macrophages vers les HDL, et d'autre part la captation sélective des CE des HDL par le foie, SR-BI est un acteur primordial du remodelage et du métabolisme des lipoprotéines HDL.

v. La protéine de transfert des esters de cholestérol

❖ Généralités

Le gène de la CETP, localisé sur le chromosome 16q13, code la protéine de transfert des esters de cholestérol, qui réalise un transfert de CE depuis les HDL vers les LDL, IDL et VLDL, en échange d'une molécule de TG transmise des LDL et TRL vers les HDL (Barter and Lally, 1979). Cependant, en cas d'augmentation des concentrations de VLDL, la CETP va préférentiellement transférer les CE vers ces lipoprotéines (Guérin et al., 2001). Elle est toutefois également capable de réaliser un tiers des transferts de PL entre les lipoprotéines plasmatiques (la PLTP assurant le transfert des deux autres tiers) (Hesler et al., 1988). Son rôle est primordial chez l'Homme car la majeure partie des CE est d'abord chargée dans les HDL. De même, dans le plasma, les TG, sont majoritairement portés par les TRL, comme indiqué dans l'avant-propos. Ainsi, la CETP assure un retour indirect des CE contenus dans les HDL vers le foie. La CETP, avec SR-BI qui effectue un retour direct, a donc un rôle clé dans le transport inverse du cholestérol (Barter et al., 2003). Elle agit de concert avec la LCAT : l'estérification du CL par la LCAT génère des lipoprotéines plus grandes et sphériques, rapidement prises en charge par la CETP afin de répartir les CE au sein des lipoprotéines. L'apo A-I peut moduler l'action de la CETP en induisant un réarrangement des PL à la surface des HDL et favorisant l'accumulation de « clusters » de CE proches de la surface (Dergunov et al., 2010).

❖ Mécanisme d'action

En conditions normolipidémiques, l'hétéroéchange se fait principalement entre HDL et LDL. Ainsi, environ 70% des CE des HDL sont transportés vers le foie *via* les LDL (Barter et al., 2003; Chapman et al., 2010). Le taux de transfert par la CETP est d'ailleurs associé aux catabolismes respectifs des HDL et LDL, donc à leurs concentrations plasmatiques (Barter et al., 1982). Deux mécanismes d'action ont été proposés (Barter and Rye, 2012) :

- le premier modèle suggère que la CETP agit comme une navette entre les différentes lipoprotéines. Aléatoirement, en fonction de la lipoprotéine qu'elle lie dans le plasma, elle se charge préférentiellement en CE ou TG. Elle peut ensuite se lier à une lipoprotéine de même nature ou à une autre, réalisant ainsi l'hétéroéchange.
- dans le second modèle proposé, la CETP forme un complexe tertiaire en liant les deux types de lipoprotéines en même temps : elle agit comme un tunnel en transférant simultanément les lipides.

En faveur du premier modèle, la CETP est capable de former des complexes binaires avec chaque classe de lipoprotéine testée seule (HDL, LDL ou VLDL) (Zhang et al., 2012). Cependant, les auteurs montrent que l'incubation de la CETP avec les HDL seules n'impacte pas la taille des HDL, ce qui suggère que leur liaison n'induit pas d'échange. En revanche, lorsque des LDL sont ajoutées, la taille des HDL diminue progressivement au cours des 4 heures d'incubation. Ceci est cohérent avec les observations faites par les auteurs : la CETP peut former des complexes tertiaires avec HDL et LDL ou VLDL. Ces résultats laissent donc penser que les échanges de lipides se font *via* la CETP, agissant comme un tunnel.

Le même groupe a ensuite montré que la liaison entre CETP et HDL se fait indépendamment des apo A-I et apo A-II présentes sur la particule, mais dépendamment de leur contenu en PL et, par conséquent, de la forme et de la taille de la lipoprotéine. Ainsi, les HDL_2, plus grosses que les HDL_3, ont une meilleure affinité pour la CETP (Zhang et al., 2015).

- Fonctions

Grâce à ses propriétés d'échangeuse de lipides, la CETP permet un réarrangement et, de fait, une équilibration des quantités de CE et de TG contenues dans chaque classe de lipoprotéines. Elle est donc fortement impliquée dans le remodelage des lipoprotéines plasmatiques et dans le retour des CE des tissus périphréiques vers le foie (environ 66%). La CETP coopère avec SR-BI pour assurer le retour des CE au foie et leur clairance plasmatique (Collet et al., 1999). Le traitement avec un anticorps monoclonal dirigé contre la CETP chez le lapin provoque une augmentation du contenu en CE des HDL (multiplié par 2 environ) et une baisse réciproque des concentrations de TG associés aux HDL (Whitlock et al., 1989). Le ratio CE/TG des VLDL est lui diminué suite au traitement.

Chez l'Homme, les premières preuves des fonctions de la CETP ont été fournies par des études menées dans la population japonaise : l'absence de CETP plasmatique est identifiée, due à une mutation génétique (Brown et al., 1989). En conséquence, une hausse des concentrations plasmatiques de HDL-C, principalement des HDL_2, est observée. Parallèlement, les HDL pré-β sont retrouvées diminuées (Asztalos and HDL Atherosclerosis Treatment Study, 2004). Par la suite, d'autres mutations sont identifiées, le plus souvent dans la population japonaise (Inazu et al., 1990; Nagano et al., 2002; Maruyama et al., 2003), mais aussi dans la population caucasienne (Teh et al., 1998). Ces déficiences en CETP conduisent à des hyperalphalipoprotéinémie, c'est-à-dire à une hausse des concentrations plasmatiques de HDL_2.

Des preuves de l'implication de la CETP dans la détermination de la taille des particules HDL ont été apportées par une étude menée sur les HDL_3 (Lagrost et al., 1990). Après incubation en présence de CETP pendant 24h, la taille des HDL_3 (8,7nm) est largement augmentée et est de l'ordre de celle des HDL_2 (9,5nm). Les mêmes observations sont faites pour des incubations avec des concentrations croissantes de CETP : à 20 U/mL, la majorité des lipoprotéines HDL ont un diamètre supérieur ou égal à 10nm.

Le lien entre CETP et athérosclérose a également largement été étudié. Les souris, naturellement déficientes pour la CETP, ne développent pas d'athérosclérose, même nourries avec un régime pro-athérogène. Des souris transgéniques pour le gène et les séquences promotrices humains ont été générées : ces animaux présentent une diminution des concentrations circulantes de HDL-C (Agellon et al., 1991) et l'apparition de plaques d'athérome (Marotti et al., 1993). L'expression de la CETP humaine chez le lapin est associée à une baisse des concentrations de HDL-C, une hausse de celles de TG, et des cellules spumeuses s'accumulent dans la paroi artérielle (Gao et al., 2017). Chez l'Homme, certaines déficiences génétiques en CETP ont été identifiées chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (FH, *Familial Hypercholesterolemia*). La déficience en CETP augmente les concentrations de HDL-C de ces patients, mais n'est pas suffisante pour les protéger du risque de maladies coronaires, dû aux concentrations de LDL-C qui restent élevées (Haraki et al., 1997). Dans une autre étude menée chez des patients atteints de FH, les concentrations plasmatiques de CETP sont positivement corrélées à l'épaisseur de l'espace intima-média de la plaque d'athérosclérose. Le traitement aux statines (responsables d'une diminution des concentrations intracellulaires de cholestérol) améliore le profil lipidique des patients FH, mais avec une moindre efficacité pour des patients ayant une forte activité CETP (de Grooth et al., 2004).

Ces différentes fonctions proathérogéniques de la CETP ont mené au développement de molécules inhibitrices, qui ont pour but d'augmenter les concentrations de HDL-C (Tall and Rader, 2018). Plus d'informations sur les inhibiteurs CETP et leur impact sur les MCV seront discutées ci-après.

vi. Les lipases

- La lipoprotéine lipase

La lipoprotéine lipase, LPL, est codée par un gène situé sur le chromosome 8q21 dans le génome humain. Elle est exprimée dans le tissu adipeux, le cœur et le muscle. Sa fonction

première est d'hydrolyser les TG contenus dans les TRL, grâce à sa coopération avec la protéine GPIHBP1 (*Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1*) : celle-ci fixe à la fois la LPL et les chylomicrons, favorisant ainsi le lien avec la LPL au niveau de l'endothélium vasculaire (Birrane et al., 2019). Après son action, la LPL est détachée de l'endothélium par l'héparine. Celle-ci possède le même profil d'expression tissulaire que la LPL et a été identifiée en tant que protéine pouvant se lier aux lipoprotéines HDL (Ioka et al., 2003; Beigneux et al., 2007). En hydrolysant les TG contenus dans les TRL, la LPL les rend instables et induit un réarrangement. Les PL et des apolipoprotéines (principalement l'apo A-I) vont notamment se constituer en HDL pré-β, ou être pris en charge par ce type de HDL naissantes (Miyazaki et al., 2009). L'activité de la LPL a ainsi été associée aux concentrations plasmatiques de HDL-C. De manière intéressante, l'apo A-II retrouvée dans les HDL peut jouer un rôle dans l'activité de la LPL. En effet, l'apo A-II peut être transférée des HDL vers les VLDL et son accumulation inhibe significativement l'hydrolyse des TG par la LPL (Dugué-Pujol et al., 2006). Au contraire, elle peut entraîner le déplacement des apo C et apo E des HDL, renforçant sa propre affinité avec la surface de la particule HDL, et la stabilisant ainsi (Julve et al., 2010). L'apo A-V, portée par les VLDL, chylomicrons, mais aussi les HDL, intervient dans la régulation de la LPL en stimulant son expression (Schaap et al., 2004).

- La lipase hépatique

La lipase hépatique, LH, est codée par le gène *LIPC* présent sur le chromosome 15q21. Produite par les hépatocytes, elle est ancrée (*via* des protéoglycanes) à leur surface et peut aussi être secrétée pour être exprimée au niveau de l'endothélium hépatique. La forte association de la LH avec l'apo A-I des HDL décroche la lipase de la membrane et active son activité d'hydrolyse. La LH est alors transportée dans la circulation au sein des lipoprotéines, notamment HDL : son rôle principal est d'hydrolyser les TG des IDL et des HDL_2. Elle hydrolyse également les PL contenus dans les HDL : la LH possède donc une activité de phospholipase A2 (Duong et al., 2003). Ces activités font des HDL riches en TG produites par la CETP des substrats préférentiels pour la LH. Elle induit une baisse des concentrations de HDL_2 circulantes au profit des HDL_3 et HDL pré-β. L'action de la LH et sa disponibilité à la membrane de l'hépatocyte peuvent être régulées par les HDL elles-mêmes. La structure et la composition de la lipoprotéine HDL sont centrales dans sa capacité à déplacer la LH, et à moduler son activité : les apo A-II et C-I augmentent par exemple le détachement de la LH de la membrane, alors qu'une hausse du contenu en PL, TG et apo E inhibe ce détachement (Rouhani et al., 2008; Young et al., 2009).

❖ La lipase endothéliale

La lipase endothéliale, LE, est codée par le gène *LIPG* (chromosome 18q21) et exprimée dans les cellules endothéliales retrouvées dans de nombreux tissus (foie, thyroïde, poumons, reins…). Son activité majoritaire est l'hydrolyse des PL (activité phospholipase A1), mais elle agit aussi sur les TG des lipoprotéines, principalement des HDL. Comme pour une déficience en LH, la déficience en LE chez la souris augmente les concentrations plasmatiques de HDL-C. L'effet est amplifié lorsque les souris sont double KO (*Knock Out*) LH/LE (Brown et al., 2010). A l'inverse, l'expression du gène *LIPG* humain chez la souris réduit drastiquement les concentrations de HDL-C (Jaye et al., 1999). Ainsi, la LE remodèle les lipoprotéines HDL en favorisant la conversion des grandes HDL_2 en HDL_3 et HDL pré-β.

Les lipases, en interagissant de manière plus ou moins forte avec les différentes apolipoprotéines retrouvées sur les HDL, influent la dégradation de PL ou TG selon leurs affinités, remodelant ainsi le contenu lipidique des particules HDL. Il est intéressant de voir que ce contenu peut directement influer sur l'action de ces lipases.

vii. La protéine de transfert des phospholipides

❖ Généralités

La protéine de transfert des phospholipides, codée par le gène *PLTP* (chromosome 20q13) est impliquée dans le remodelage des lipoprotéines car elle est capable de réaliser un transfert net ou un échange de PL entre les différentes classes de lipoprotéines. Les PL étant les lipides majoritaires des HDL, la PLTP a un fort pouvoir remodelant sur ces lipoprotéines. Son expression est ubiquitaire, mais elle est fortement retrouvée dans le foie, le tissu adipeux (qui contribuent chacun pour 20% de l'activité PLTP plasmatique), le poumon et le cerveau. Elle est également retrouvée dans les macrophages et au cœur des plaques d'athérome (Desrumaux et al., 2003), suggérant un rôle important du remodelage du contenu en PL des lipoprotéines dans la détermination de la pathologie. De plus, l'expression de la PLTP est stimulée par les voies LXR/RXR (Cao et al., 2002).

❖ Fonctions

Dans la circulation, la PLTP participe à la formation de HDL pré-β : elle collabore avec la LPL en transférant les PL libérés suite à la lipolyse des chylomicrons. Il a été montré que la PLTP semblait induire la formation de HDL pré-β (van Haperen et al., 2000) en favorisant l'efflux de lipides ABCA1 dépendant (Ji et al., 2014). Elle peut également fusionner des HDL_3

pour créer des HDL plus grosses de types HDL_2, intemédiaires instables, plus riches en PL. Cette fusion génère également des HDL pré-β (Jauhiainen et al., 1993).

Par ailleurs, la PLTP exprimée dans le foie participe à la biogénèse et la sécrétion des VLDL hépatiques. L'expression de la forme humaine de la PLTP chez le lapin (qui a naturellement une très faible activité PLTP plasmatique) induit une augmentation des concentrations de lipoprotéines contenant de l'apo B (sans conséquence sur celles de HDL-C), corrélée à une hausse de la taille des lésions d'athérosclérose (Masson et al., 2011).

Les conséquences de l'action de la PLTP sur l'athérosclérose sont difficiles à déterminer, car les études mènent à des résultats contradictoires. En effet, malgré un rôle important de la protéine PLTP dans l'efflux *via* ABCA1 identifié *in vitro* (Oram et al., 2008), il semble que l'augmentation de son activité plasmatique affecte les capacités d'efflux de cholestérol dans un modèle de souris transgénique pour la PLTP (Samyn et al., 2009). Le rôle de la PLTP dans l'inflammation, composante importante de l'athérosclérose, est sujet à controverse. Certaines études montrent une diminution des concentrations circulantes d'IL-6 , ainsi que de l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 dans l'aorte des souris PLTP KO (sous régime normal ou riche en cholestérol), suggérant un rôle pro-inflammatoire de la PLTP (Shelly et al., 2008). A l'inverse, lorsque l'inflammation est induite par des lipopolysaccharides (LPS), la mortalité due à un choc endotoxique est augmentée chez les souris PLTP KO (Gautier et al., 2008). La PLTP aurait donc un rôle anti-inflammatoire. Sa liaison avec ABCA1 et l'activation et l'inactivation respectives en cascade des voies JAK/STAT3 et NFκB (*Nuclear Factor kappa-B*) constitue également une preuve de ses éventuelles propriétés anti-inflammatoires (Vuletic et al., 2011).

Enfin, des études menées chez l'Homme associent positivement les concentrations plasmatiques de PLTP et les MCV. Par exemple, Vergeer et ses collaborateurs ont identifié deux polymorphismes du gène codant la PLTP, résultant en une faible activité plasmatique de la protéine, associée à une augmentation du nombre de particules HDL et une diminution du risque d'évènements CV (4 658 cas et 11 459 contrôles) (Vergeer et al., 2010). Des résultats similaires ont été trouvés dans plusieurs autres études, menées sur des populations avec différentes pathologies CV (Jiang, 2018).

Malgré ses diverses fonctions, ces dernières études menées chez l'Homme suggèrent un rôle important de la PLTP dans l'incidence des évènements cardiovasculaires. Dans un but thérapeutique, des inhibiteurs de la PLTP ont été développés. *In vitro*, ces molécules sont

capables de diminuer la sécrétion de lipoprotéines contenant l'apo B (Luo et al., 2010). Cependant, aucune étude *in vivo*, encore moins clinique n'a été initiée pour poursuivre les investigations sur ces molécules.

B. HDL ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES LIEES A L'ATHEROSCLEROSE

Les HDL sont les lipoprotéines protectrices dans des contextes de maladies cardiovasculaires associées à l'athérosclérose (*Atherosclerotic cardiovascular diseases*, ASCVD). Elles sont en effet capables de réaliser de l'efflux de cholestérol et de PL depuis les macrophages spumeux de la plaque d'athérosclérose, et ont des activités anti-inflammatoire, anti-apoptotique, anti-oxydative, anti-infectieuse, anti-thrombotique… Bien que ces fonctions soient partagées par toutes les HDL, l'hétérogénéité du protéome et du phosphosphingolipidome, entretenue par le remodelage constant dû à l'action des différentes enzymes présentées ci-dessus, reflètent des différences de fonctionnalités très importantes selon les populations de HDL.

1. L'athérosclérose : une pathologie lipido-oxydo-inflammatoire

L'athérosclérose est une pathologie chronique, caractérisée par des perturbations lipidiques, oxydatives et inflammatoires de l'endothélium artériel. Les contraintes mécaniques (modifications des forces de cisaillement, du flux…), les dyslipidémies, l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité, le tabagisme et l'abondance de médiateurs inflammatoires sont autant de perturbateurs de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, qui voit sa perméabilité augmentée et sa structure modifiée.

a. Initiation

L'internalisation des LDL dans l'intima (tunique la plus interne) artérielle est augmentée, grâce à l'interaction entre l'apo B-100 des LDL et le collagène, l'élastine ou les protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Les LDL sont alors retenues dans cet espace intimal. Elles vont y subir diverses modifications chimiques et enzymatiques, générées par les cellules endothéliales et les macrophages : l'oxydation, la lipolyse, la protéolyse, l'agrégation, la carbamylation, la glycation ou encore la désialylation les rendent particulièrement pro-inflammatoires et pro-athérogènes (Summerhill et al., 2019).

L'accumulation de LDL modifiées dans la paroi artérielle induit une réponse inflammatoire rapide, avec recrutement de monocytes circulants (figure 9B). En effet, elles

stimulent l'activation des cellules endothéliales en déclenchant l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et la protéine E-sélectine) et la sécrétion de chimiokines (MCP-1 *Molecule Chemoattractant Protein* 1, CCL-2 et CCL-5, *C-C motif chemokine Ligand 2 and 5*, et IL-8). Les lipides relargués par la lipolyse des LDL peuvent aussi activer les cellules endothéliales. La fixation des chimiokines CCL-2 et CCl-5 sur leurs récepteurs respectifs CCR-2 et CCR-5, exprimés à la surface des monocytes, attirent ceux-ci. Ils migrent vers l'espace médian par diapédèse (au travers des jonctions cellulaires), via l'interaction avec les intégrines de surface CD11 et CD18 (Linton et al., 2019; Libby et al., 2019).

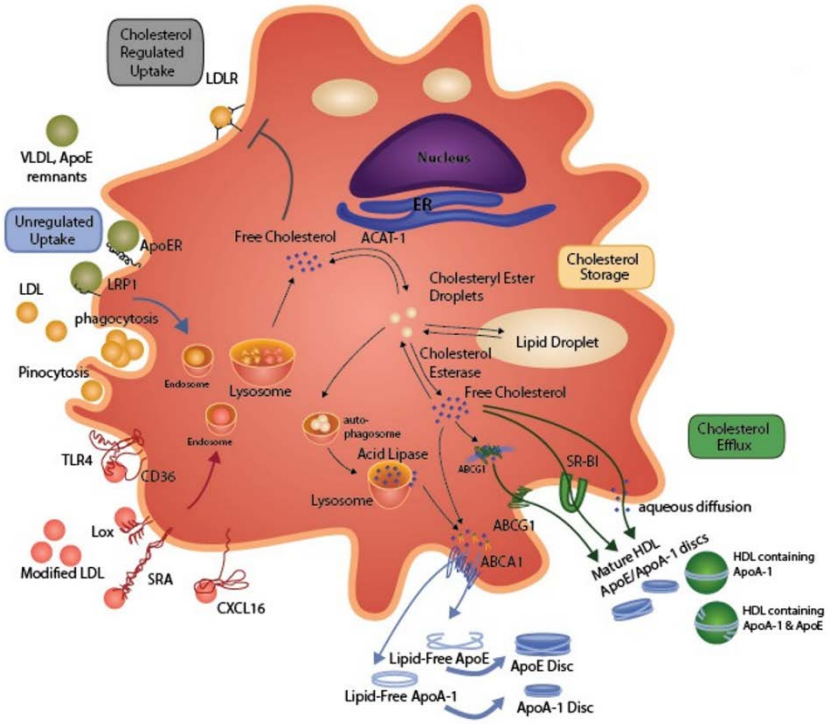


Figure 8 : Rôle clé du macrophage dans le métabolisme du cholestérol
Les LDL natives sont reconnues par le LDL-R (voie régulée), alors que les LDL modifiées entrent dans le macrophage grâce à leur liaison sur les récepteurs de type scavenger SRA, CD36 ou LOX1. Le cholestérol entrant dans la cellule par phagocytose ou via le récepteur aux apo E ou LRP1 (voie non régulée). La protéine ACAT estérifie le choelstérol libre. Le cholesterol est éliminé de la cellule par les différentes voies d'efflux (ABCA1, ABCG1, SR-BI et diffusion passive). SR-BI peut également faire de la captation d'esters de cholestérol (non représentée). (Linton et al., 2019)
SRA : scavenger receptor, LOX1 : lectin-type oxidized LDL receptor 1, CD36 cluster of differenciation 36, TLR4 : toll tike Receptor 4, LRP1 LDL-R related protein 1, ACAT : acyl CoA:cholesterol acyltransferase, ABCA1 : ATP binding cassette A1, ABCG1 : ATP binding cassette G1, : SR-BI : ccavenger-receptor class B type 1.

Cette migration induit une différenciation en macrophages, suite à l'expression de facteurs de croissance comme M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor)*. Le macrophage, à la différence du monocyte, exprime des récepteurs de surface type « scavengers », comme SRA (*Scavenger Receptor*), LOX1 (*Lectin-type Oxidized LDL Receptor 1*) ou CD36 (*Cluster of Differenciation 36*), en association avec TLR4 (*Toll Like Receptor 4*)

(Moore et al., 2013a). Il peut alors internaliser les LDLox, devient gorgé de lipides, notamment de CE : c'est la cellule spumeuse, contributrice de l'inflammation locale. Des VLDL, des LDL non modifiées ou encore des résidus d'apo E peuvent également être internalisés (figure 8).

b. Progression

L'accumulation de ces cellules spumeuses constitue les stries lipidiques. A ce stade, la plaque d'athérome peut encore régresser. En revanche, d'autres acteurs peuvent aggraver la pathologie. C'est le cas des cellules musclaires lisses, les CML. Les macrophages inflammatoires les rendent proliférative et migratoires (de la media artérielle vers l'intima), par la sécrétion de facteurs de croissance et chémo-attractants (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Elles acquièrent également des propriétés sécrétoires, formant une matrice extracellulaire dense et rigide. Elles forment alors la chape fibreuse qui recouvre la plaque d'athérome (figure 9C). Certaines CML peuvent exprimer à leur surface des récepteurs retrouvés habituellement sur les macrophages, internaliser ainsi des lipides et devenir des cellules spumeuses. En parallèle, des monocytes continuent d'être recrutés. En effet, le macrophage peut aussi jouer un rôle pro-inflammatoire en induisant une forte sécrétion des cytokines IL-6, IL-18, IL-1β ou encore TNF-α (Linton et al., 2019). L'inflammasome NLRP3 a été montré comme favorisant l'inflammation, il peut être déclenché par la présence de cristaux de cholestérol (Duewell et al., 2010). L'ensemble de ces facteurs favorisent le grossissement de la plaque et la sténose, c'est-à-dire le rétrécissement du diamètre artériel. Si l'obstruction artérielle est totale, les tissus peuvent être ischémiés.

c. Stabilisation

L'accumulation continuelle de cellules spumeuses est en équilibre avec la mort de certaines cellules inflammatoires, qui entrent en apoptose, relarguant des débris dans l'intima (figure 8C). L'ensemble forme le cœur nécrotique de la plaque. La chape fibreuse constitue l'unique barrière contre un déversement du contenu de la plaque en cas de rupture. Le recrutement des médiateurs de l'inflammation concerne également les lymphocytes T. Les lymphocytes T_{helper} Th1 et Th17 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, comme l'interféron γ. Au contraire, les $T_{régulateurs}$ produisent des cytokines anti-inflammatoires (TGF-β et IL-10) et inhibent l'activation de Th1. Le nombre de lymphocytes $T_{régulateurs}$ diminuent au cours de l'athérosclérose (Tabas and Lichtman, 2017).

d. Rupture

L'accumulation des métalloprotéases et signaux de mort cellulaire au sein du cœur nécrotique induisent une aggravation de l'inflammation, une dégradation de la matrice extra-cellulaire et la mort des CML. En conséquence, la chape fibreuse, inflammée et amincie, voit son épaisseur diminuée, ce qui peut conduire à une rupture de la plaque (figure 9D). Celle-ci peut être dramatique car elle expose les plaquettes sanguines à des facteurs pro-thrombotiques et de coagulation, qui peuvent mener à la formation de thrombose (obstruction) et aux ASCVD (Virmani et al., 2002; Libby et al., 2019).

2. Concentrations plasmatiques de HDL-C et risque cardiovasculaire

L'étude Framingham, initiée avec 5 209 patients en 1948 aux Etats-Unis, a pour vocation d'identifier des facteurs de risque pour les MCV. En 70 ans, la cohorte initiale a été largement supplémentée puisqu'elle contient aujourd'hui plus de 15 000 participants. Les premières conclusions révèlent en 1977 que de faibles concentrations de HDL-C (< 40mg/dl pour les hommes et < 50mg/dl pour les femmes) constituent un facteur de risque cardiovasculaire indépendant (Gordon et al., 1977). En 2009, une revue regroupe 58 études prospectives dont 31 montrent une association inverse entre HDL-C et risque cardiovasculaire quels que soient la pathologie étudiée et les sous-groupes de populations (Chirovsky et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés dans de nombreuses études, et notamment dans un travail mené en 2016, sur plus de 600 000 individus (Ko et al., 2016). Plus précisément, chaque baisse de 1mg/dl de la concentration de HDL-C circulantes est associée à une augmentation du risque de maladie coronarienne de 2 à 3% (Gordon et al., 1989).

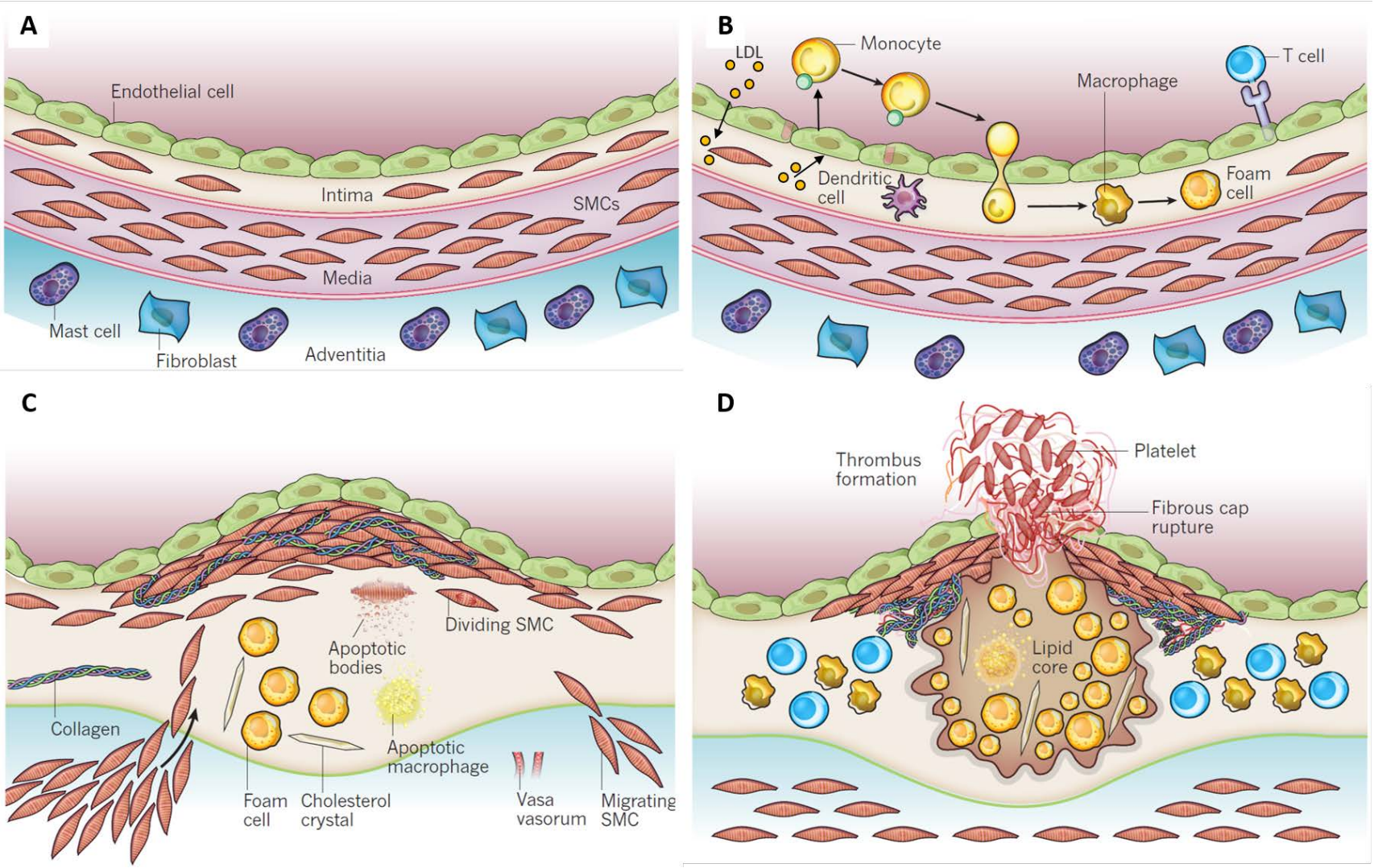


Figure 9 : Etapes de développement de l'athérosclérose

***A**, Artère normale. **B**, L'accumulation de LDL dans l'intima attirent les leucocytes qui adhèrent aux cellules endothéliales de la paroi artérielle, puis migrent et se différencient en macrophages. Ceux-ci peuvent internaliser des lipides. **C**, Les cellules musculaires lisses (CML) migrent depuis la media et prolifèrent avec les CML résidentes de l'intima, formant la chape fibreuse. La matrice extracellulaire se développe, les CML et macrophages entrent en apoptose : la nature de la plaque est modifiée. **D**, La thrombose (rupture de la plaque) survient suite à l'accumulation de lipides et de cellules nécrotiques, qui fragilisent la chape fibreuse. Les éléments coagulants du sang entrent en contact avec le corps nécrotique et forment le trhombus.*

3. Rôle athéroprotecteur des HDL

Ces résultats suggèrent que les lipoprotéines HDL pourraient être clés dans la prévention du risque cardiovasculaire. Cette hypothèse est plébiscitée par les diverses activités biologiques des HDL, qui sont majoritairement athéroprotectrices. En effet, les lipoprotéines HDL peuvent réaliser de l'efflux de cholestérol, et ont également des propriétés anti-inflammatoire, anti-oxydative, anti-thrombotique, anti-infectieuse et vasodilatatrice (Camont et al., 2011). Leur rôle athéroprotecteur s'exerce à différents niveaux, au sein des différentes cellules impliquées dans l'installation de l'athérosclérose.

a. Les monocytes

Impliquées dans la réaction inflammatoire, les cellules monocytaires sont primordiales dans la mise en place et le maintien de la plaque d'athérome. Leur production, puis leur recrutement sur le site d'inflammation et enfin leur interaction et pénétration au sein de l'endothélium sont autant de facteurs qui peuvent impacter la réponse inflammatoire.

i. La monocytose

Il a été montré chez la souris que les HDL sont des lipoprotéines capables d'induire la prolifération des cellules hématopoïétiques pluripotentes (HSPC, *Hematopoietic Stem and multipotent Progenitor Cell*). En effet, les HSPC expriment les transporteurs Abca1 et Abcg1. Des souris Ldl-r KO, déficientes pour Abca1 et Abcg1 dans la lignée myéloïde (par transplantation de moelle osseuse), ont notamment une nette augmentation de la monocytose et de la leucocytose, ainsi que de l'infiltration de cellules myéloïdes dans le cœur, la rate, le foie et l'intestin (Yvan-Charvet et al., 2010b). Ces résultats sont inversés lorsque les souris transplantées sont transgéniques pour le gène humain codant l'apo A-I ou injectées avec des HDL reconstituées (rHDL) (Yvan-Charvet et al., 2010b; Feng et al., 2012). Dans cette étude, il est proposé que la prolifération excessive soit due à l'absence d'efflux de cholestérol par Abca1 et Abcg1 vers les HDL. En conséquence, une accumulation de lipides dans la membrane augmente le nombre de radeaux lipidiques, ce qui favorise l'intégration de la sous-unité β commune des récepteurs à l'interleukine IL-3 et au facteur proliferatif GM-CSF. En se fixant cette sous-unité β, ils activent par phosphorylation la voie ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) *via* l'intermédiaire Ras, et stimulent la prolifération de la lignée myéloïde (Murphy et al., 2012). Des résultats similaires ont été mis en évidence chez des souris de fond génétique Apo E KO (Murphy et al., 2011), soulignant l'importance de cette apolipoprotéine dans l'efflux de cholestérol *via* Abca1 et Abcg1. Ces théories établissant un lien entre monocytose et HDL

ont conduit à l'hypothèse du ratio monocytes/HDL : un ratio élevé suggère une inflammation exacerbée et est révélateur d'un nombre important de monocytes circulants et/ou d'une concentration de HDL basse. Ce ratio peut ainsi être utilisé comme marqueur dans les ASCVD (Ganjali et al., 2018).

ii. Le recrutement

Les lipoprotéines HDL exercent un rôle athéroprotecteur en minimisant le recrutement des monocytes sur le site d'inflammation. En effet, l'injection de molécules d'apo A-I libres est capable de réduire l'expression génique et protéique des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 dans les plaques d'athérome de souris Apo E KO (Bursill et al., 2010). Le plasma des souris injectées avec l'apo A-I présente également des concentrations plus faibles des chimiokines CCL2 et CCL5, par rapport aux souris contrôles. Cependant, il est important de préciser que cette diminution dans la réponse inflammatoire n'est pas suffisante pour induire une régression de la lésion athérosclérotique. L'apo A-I réduit également les chimiokines hépatiques, suggérant un rôle protecteur de l'apo A-I dans l'inflammation du foie.

Dans la même étude, des expériences *in vitro* sont menées. L'incubation de HDL sur des monocytes réduit l'expression des chimiokines CCL2, CCL5 et CX3CL1, et de leurs récepteurs CCR2 et CX3CR1. Les voies de signalisation NFκB et PPARγ semblent être impliquées dans cette régulation par les HDL : l'incubation avec des rHDL inhibent l'activation de ces deux voies de signalisation intracellulaires (Bursill et al., 2010).

iii. L'adhésion aux cellules endothéliales

Etape finale de leur recrutement, les monocytes doivent adhérer aux cellules endothéliales pour pénétrer dans l'espace intimal. Cette interaction se fait notamment via la protéine de surface CD11b. De façon intéressante, il a été montré que les particules HDL étaient capables de bloquer l'activation du monocyte CD11b dépendante (Murphy et al., 2008). Les auteurs identifient l'apo A-I et son interaction avec ABCA1 comme déterminantes. En effet, l'activation de CD11b est plus importante dans les monocytes isolés de patients atteints de la maladie de Tangier, comparée à des monocytes de sujets contrôles. De plus, l'efflux de cholestérol via ABCA1 semble primordial car le traitement des monocytes à la cyclodextrine (qui mobilise le cholestérol des membranes) suffit à diminuer l'activation de CD11b. L'inhibition de SR-BI est sans effet. Cette étude montre donc que l'interaction de l'apo A-I présente sur les HDL avec ABCA1, exprimé à la surface des monocytes, induit un efflux de lipides limitant l'activation monocytaire via CD11b, ce qui réduit l'interaction du monocyte

avec les cellules endothéliales (Murphy et al., 2008). La réduction de l'activation monocytaire par les lipoprotéines rHDL a également été montrée dans un contexte de diabète de type 2 (Patel et al., 2009).

Par ailleurs, le contact direct des cellules T avec les monocytes est un potentialisateur de la production de cytokines par ces derniers. Dans ce contexte, les HDL peuvent inhiber la production et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, en limitant l'activation monocytaire par les lymphocytes T. Pour preuve, des cultures primaires de monocytes humains surexpriment de nombreuses cytokines suite à la stimulation par les lymphocytes T, notamment G/M-CSF, IFNγ, TNF, IL-1β, IL-6, CCL2, CCL5… Parmi celles-ci, les auteurs ont identifié 6 cytokines (IL-1β, TNF, IL-6, IL-8, CCL3 et CCL4) significativement réduites lorsque les monocytes activés sont incubés en présence de HDL (Gruaz et al., 2010).

Enfin, le rôle athéroprotecteur des HDL sur les monocytes s'exerce via une diminution de leur capacité à migrer au sein de la couche de cellules endothéliales de l'intima, la transmigration. Les HDL peuvent en effet moduler l'expression de différentes protéines impliquées dans la transmigration. L'expression de CDC42, une protéine à domaine GTPase qui régule l'organisation du cytosquelette, est diminuée lorsque les monocytes sont traités avec des lipoprotéines HDL_3 ou de l'apo A-I (Diederich et al., 2001). De nouveau, l'efflux de cholestérol par les HDL semble impliqué car le traitement des monocytes à la cyclodextrine réduit de façon similaire l'expression de CDC42. Cette réorganisation du cytosquelette, nécessaire à la transmigration, est normalement induite par l'expression du facteur de croissance M-CSF, lui aussi inhibé par les HDL. La production d'actine, molécule structurale du cytosquelette, est également réduite lorsque les monocytes sont incubés en présence de HDL (Murphy et al., 2008).

b. Les macrophages

Installés dans la plaque d'athérome, les macrophages ont de nombreux rôles : ils favorisent l'inflammation notamment et se différencient en cellules spumeuses, constitutives de la plaque. Cependant, les HDL peuvent agir sur ces macrophages et induire une athéroprotection.

i. L'efflux

Comme décrit précédemment, l'efflux de cholestérol des macrophages est une des fonctions primordiales des lipoprotéines HDL. Elle est la première étape du transport inverse de cholestérol, qui permet son retour vers le foie pour recyclage et élimination par les voies biliaires. Elle permette de limiter l'accumulation de stérols et dérivés dans ces cellules, et réduisent ainsi la formation des cellules spumeuses. Les voies d'efflux via ABCA1, ABCG1 ou encore SR-BI ont été décrites précédemment.

ii. L'inflammation

- La voie TLR4

Pour comprendre comment les HDL limitent l'inflammation au sein des macrophages présents dans la plaque d'athérome, il est nécessaire de connaître les acteurs clés responsables de cette inflammation. Le récepteur TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) est un médiateur majeur de l'inflammation : il reconnait différents agents pathogènes, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), ce qui déclenche différentes cascades de signalisation intracellulaire, c'est la réponse inflammatoire. Les lipopolysaccharides (LPS) sont les ligands préférentiels du récepteur TLR4. Une fois le récepteur activé par la fixation du ligand, TLR4 active ses partenaires intracellulaires : MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response protein*), TIRAP (*3 TIR-domain-containing Adaptor Protein*), TRIF (*Toll Interleukin Receptor-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) et TRAM (*TRIF-Related Adaptor Molecule*) (Roshan et al., 2016). Par différents intermédiaires de signalisation, MyD88 permet l'activation de NFκB, ce qui a pour conséquence la stimulation de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-1, et Il-6. TLR4 peut aussi induire une réponse NFκB, indépendamment de MyD88, *via* la phosphorylation d'IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*). L'expression de TLR4 étant stimulée notamment par les LDL oxydées, il est donc fortement exprimé au sein de la plaque d'athérosclérose. Il est même suggéré qu'il soit nécessaire pour la différenciation des macrophages en cellules spumeuses (Howell et al., 2011). La déficience en Tlr4 ou Myd88 chez la souris Apo E KO réduit le développement de l'athérosclérose en limitant la sécrétion de chimiokines inflammatoires (Michelsen et al., 2004).

L'action athéroprotectrice des HDL se fait principalement par une réduction de l'inflammation TLR4 dépendante, qui peut être modulée par l'efflux de lipides. En effet, il a été montré que des macrophages déficients pour Abca1, Abcg1 ou les deux ont une réponse aux LPS augmentées, ce qui se traduit par une augmentation de l'expression de TLR4 à la

membrane, et une suractivation de la réponse inflammatoire Myd88 et NFκB (Yvan-Charvet et al., 2008). Ces effets semblent dépendants du contenu en cholestérol dans la membrane, notamment le nombre de radeaux lipidiques : le traitement à la cyclodextrine inhibe la réponse inflammatoire due aux LPS. Les HDL, en favorisant l'efflux de cholestérol et autres lipides, inhibent la présence de TLR4 à la membrane et limitent donc une réponse inflammatoire exacerbée.

Les HDL peuvent agir indépendamment de l'efflux et de la voie MyD88 en limitant la réponse IFNβ (Interféron β), en stimulant cette fois les protéines partenaires de TLR4, TRIF et TRAM (Suzuki et al., 2010).

Il faut également considérer que certaines études ont suggéré un rôle pro-inflammatoire des HDL via la voie des TLR4, dans les macrophages : l'apo A-I, en activant TLR4 et MyD88, stimulerait l'activation de la voie NFκB et la production de cytokines pro-inflammatoires (Smoak et al., 2010; van der Vorst et al., 2017).

- La voie JAK2/STAT3

La fixation de l'apo A-I contenue dans les HDL sur ABCA1, stimule non seulement l'efflux de lipides mais active également la protéine JAK2 (*Janus Kinase 2*), qui recrute alors STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). Le recrutement de STAT3 conduit à sa phosphorylation : la voie NFκB produisant IL-1β, IL-6 et TNFα est alors inhibée, la réponse inflammatoire réduite (Tang et al., 2009). Ainsi, dans le macrophage, ABCA1 est un transporteur ayant des fonctions anti-inflammatoires grâce à sa liaison avec les lipoprotéines HDL.

- Autres voies

La protéine S1P présente dans les HDL, en se fixant sur son récepteur S1PR1, est également capable d'inhiber l'activation de la réponse pro-inflammatoire NFκB dépendante (Gonzalez et al., 2017). *In vivo*, elle limite le développement des plaques d'athérome chez les souris *Ldl-r* KO. Il a également été suggéré un rôle direct des HDL sur ATF-3 (*cyclic AMP-dependent Transcription Factor 3*), facteur de transcription qui peut moduler l'expression des cytokines IL-1β, IL-6 et TNFα (De Nardo et al., 2014).

iii. L'apoptose

L'apoptose et l'efferocytose cellulaire, le processus de phagocytose des cellules apoptotiques, sont des mécanismes de régulation importants au cours de l'athérosclérose. A des

stades précoces, ils peuvent en effet limiter la formation des cellules spumeuses ayant pour origine les macrophages, ou réguler l'inflammation au sein de la plaque. A des stades plus tardifs, une apoptose trop importante peut induire une réponse immunitaire exacerbée. De nouveau, les lipoprotéines HDL sont impliquées dans la régulation de l'apoptose cellulaire. C'est *via* leur interaction avec ABCG1 au cours de l'efflux de lipides que les HDL exercent leur rôle athéroprotecteur : l'apoptose de macrophages péritonéaux issus de souris KO pour Abcg1 est augmentée par rapport aux macrophages issus de souris contrôle (Terasaka et al., 2007). En limitant l'accumulation de lipides oxydés dans les cellules, ABCG1 réduit le stress oxydatif du réticulum endoplasmique et protège la cellule. Il faut noter que l'efflux de stérols oxydés est majoritairement responsable de l'activité cytoprotectrice des HDL, en comparaison avec l'efflux de PL oxydés (Yvan-Charvet et al., 2010a). L'augmentation aigue du contenu oxydatif dans les macrophages de souris double déficientes pour Abca1 et Abcg1 entraîne une surexpression de NOX2, qui favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Les ROS, en inactivant les phosphatases de la voie JNK, permettent l'expression des kinases JNK (Kamata et al., 2005). Les macrophages des souris double KO s'orientent alors vers l'apoptose. Ainsi, les lipoprotéines HDL, notamment en favorisant l'efflux de lipides via ABCG1, limitent l'apoptose des macrophages.

iv. L'égression

Les macrophages semblent impliqués dans la réduction du développement de la plaque d'athérosclérose ou dans l'augmentation de sa régression. Dans un premier temps, il a été montré que des cellules dérivées des monocytes, principalement des macrophages, portant le marqueur CD68 (CD68+), étaient capables de migrer depuis la plaque d'athérome vers les tissus lymphoïdes et la circulation (Llodrá et al., 2004). Le même groupe a ensuite mis en évidence que l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 par ces cellules CD68+ est nécessaire pour la régression de la plaque d'athérosclérose (Trogan et al., 2006). Les macrophages acquièrent alors des caractéristiques de cellules dendritiques (exprimant CCR7), qui permettent leur migration. Les lipoprotéines HDL sont à l'origine de ces modifications d'expression des marqueurs CD68 et CCR7 à la surface des macrophages (Feig et al., 2011). La sortie de ces macrophages de la plaque d'athérome est appelée l'égression. Les récepteurs LXR semblent promouvoir l'expression de CCR7 (Feig et al., 2010).

L'hypothèse posée est un changement de polarisation des macrophages de la plaque, qui sont en premier lieu de type M1, pro-inflammatoires. Sur ces macrophages M1, les HDL exercent les différentes fonctions explorées ci-dessus, et favorisent notamment une réponse

anti-inflammatoire et une stimulation de l'efflux de lipides. En changeant le phénotype de ces cellules, les HDL favorisent le passage vers un phénotype M2, qui sont capables du phénomène d'égression.

c. Les cellules endothéliales

Au-delà de la réponse inflammatoire induite par les monocytes et macrophages et le rôle des HDL sur ces cellules, ces lipoprotéines interviennent aussi au niveau des cellules endothéliales pour limiter l'athérogénicité. L'action des HDL sur les lipoprotéines endothéliales passent par leur fixation sur ABCG1, SR-BI et le récepteur de la S1P, S1PR. Les S1PR sont des récepteurs couplés aux protéines G, capables de stimuler ou d'inhiber différentes cascades de signalisation cellulaire. La production de monoxyde d'azote (NO, *Nitric Oxide*) par la protéine eNOS (*endothelial NO Synthase*) est primordiale dans les cellules endothéliales pour maintenir l'intégrité et l'homéostasie vasculaires, en augmentant la vasodilatation, et diminuant l'inflammation et l'apoptose.

i. Vasodilatation

La vasodilatation a été montrée comme impliquée dans la survenue d'évènements CV liés à l'athérosclérose (Halcox et al., 2009; Yeboah et al., 2009). Cela est notamment dû aux lipoprotéines LDL oxydées, qui inhibent la production de NO en inactivant eNOS (Blair et al., 1999).

Le rôle des HDL dans ces effets a été évalué : en se fixant sur le récepteur SR-BI, les HDL stimulent l'activité de la protéine eNOS dans les cellules endothéliales, même en présence de LDL (Yuhanna et al., 2001). L'apo A-I est indispensable pour stimuler cette activité, mais elle doit faire partie d'une HDL : l'apo A-I libre n'est pas capable de médier une réponse eNOS. L'action de la particule HDL *via* SR-BI nécessite le domaine PDZK1 et entraîne une cascade de signalisation intracellulaire : sont activées par phosphorylations successives les kinases SRC (tyrosine kinase), AMPK (*AMP activated Protein Kinase*), PI-3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*), AKT (*protein kinase B*), et ERK 1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). Cette dernière phosphoryle alors les sérines en position 1177 et 1179 de la protéine eNOS, menant ainsi à son activation.

Les récepteurs S1PR1 et S1PR3 sont également impliqués dans la production de NO par eNOS. Ils peuvent, en fixant les S1P portés par les HDL *via* l'apo M, activer la voie PI3K/AKT/AMPK, et ainsi conduire à l'activation d'eNOS comme vu ci-dessus (Levine et al.,

2007). De plus, au niveau de la membrane plasmique endothéliale, S1PR1 et S1PR3 sont maintenus dans une structure stabilisée par la cavéoline (protéine impliquée dans l'endocytose). La cavéoline est également capable de fixer la protéine eNOS, limitant sa phosphorylation, donc son activation. La lipoprotéine HDL induit une mobilisation du calcium Ca^{2+} intracellulaire, et sa liaison sur la calmoduline détache eNOS de la cavéoline : l'inhibition de la phosphorylation d'eNOS est donc levée (Michel et al., 1997).

ABCG1 est également impliqué dans le maintien de l'intégrité endothéliale : l'efflux ABCG1 dépendant de cholestérol et de 7-oxystérols (7-ketocholestérol, 7β-hydroxycholestérol) limite la fixation de eNOS sur la cavéoline (Terasaka et al., 2010).

ii. Apoptose et prolifération

Au cours du développement de l'athérosclérose, des lipides oxydés s'accumulent dans différents types cellulaires. A la fin des années 1970, il est montré *in vitro* : l'incubation de cellules HUVECs avec des concentrations variables de HDL réduit la cytotoxicité due aux lipoprotéines LDL oxydées (Hessler et al., 1979). Ces lipides oxydés conduisent à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, les ROS. Les HDL ont un pouvoir anti-oxydant : comme les macrophages, lorsque les cellules endothéliales sont incubées en présence de HDL discoïdales ou sphériques, la quantité de ROS intracellulaire diminue, ainsi que l'apoptose due à un stress oxydatif (Suc et al., 1997).

Les HDL sont capables d'induire la prolifération et de diminuer l'apoptose des cellules endothéliales par une stimulation des voies de phosphorylation ERK et AKT (toujours *via* les S1PR), respectivement (Kimura et al., 2003). La lipase endothéliale est nécessaire à l'angiogenèse due aux HDL (Tatematsu et al., 2013).

Notre laboratoire a montré que la nature de la lipoprotéine HDL influence ses propriétés anti-apoptotiques : les HDL_3, petites et denses, ont de meilleures capacités à protéger les cellules endothéliales de l'apoptose induite par la cytotoxicité (due à l'accumulation de ROS) que les HDL_2 (de Souza et al., 2010). Ceci peut être dû à l'augmentation du ratio S1P/SM, qui est supérieur dans les HDL_3 par rapport aux HDL_2 (Kontush et al., 2007).

iii. Inflammation

Les cellules endothéliales jouent un rôle clé dans l'inflammation de la plaque d'athérome car elles peuvent sécréter différentes molécules qui recrutent les monocytes, et expriment à leur surface des protéines d'adhésion pour ces mêmes monocytes.

Dans des cultures de cellules HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), les HDL sont capables de réduire l'expression de VCAM-1 induite par TNFα (Baker et al., 1999). De nouveau, les récepteurs aux S1P, S1PR1 et S1PR3, sont fortement impliqués. En effet, la fixation des HDL augmente la concentration de NO suite à l'activation des voies PI-3K/AKT : cette cascade de signalisation inhibe le facteur de transcription NFκB, impliqué dans l'expression des protéines d'adhésion VCAM, ICAM et E-sélectine à la surface des cellules endothéliales (Cockerill et al., 2001; Nofer et al., 2003; Schmidt et al., 2006). En réduisant ainsi les molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, les HDL protègent l'endothélium vasculaire de l'inflammation.

Lorsqu'une lipoprotéine HDL se fixe sur le récepteur SR-BI, une autre voie anti-inflammatoire est activée : l'expression des protéines DHCR24 (*3β-hydroxysteroid-Δ24 reductase*) et HO-1 (*Heme Oxygenase-1*) est stimulée. Ces deux protéines peuvent à nouveau activer les voies PI-3K/AKT et réduire l'expression de molécules d'adhésion NFκB dépendante (Wu et al., 2013).

Enfin, Bursill et coll. ont montré une diminution de la sécrétion de chimiokines CCL2, CCL5 et CX3CL1 lorsque les cellules endothéliales sont incubées avec des rHDL (Bursill et al., 2010).

iv. Transcytose

Les cellules endothéliales permettent la transcytose des lipoprotéines HDL : celles-ci sont endocytées au pôle apical, puis elles transitent à travers la cellule pour rejoindre le pôle basolatéral, où elles sont exocytées. La transcytose est indispensable car elle permet aux particules HDL de rejoindre l'espace intimal de l'artère, et ainsi leur interaction avec les autres cellules comme les monocytes, les macrophages et les cellules musculaires lisses. Les apo A-I libres peuvent être internalisées par l'intermédiaire d'ABCA1, alors que les HDL plus matures sont internalisées suite à leur fixation sur ABCG1 et SR-BI (von Eckardstein and Rohrer, 2009).

d. Cellules musculaires lisses

Les particules HDL exercent également des activités athéroprotectrices sur les cellules musculaires lisses, les CML. Les effets passent majoritairement par les récepteurs de la S1P (S1PR2 et S1PR3) et SR-BI.

En se fixant sur les S1PR, les HDL stimulent l'expression de COX2 (*Cyclooxygenase 2*), suite à l'activation des voies ERK/AKT. La production de PGI_2 (*Prostacyclin*) est ainsi

augmentée, ce qui a un effet vasorelaxant sur les CML (González-Díez et al., 2008). La S1P des HDL est également capable d'inhiber l'accumulation intracellulaire de GMP cyclique, qui peut également moduler la vasorelaxation des CML (Chrisman et al., 2003).

Au cours de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale favorise la production de thrombine (Popović et al., 2012). La thrombine est une molécule circulante capable d'induire l'inflammation en augmentant la concentration intracellulaire de MCP-1. Les HDL peuvent inhiber Rac-1, limitant ainsi la production de ROS induite par la thrombine. L'inhibition de Rac-1 conduit à la baisse de l'activité de MPC-1 intracellulaire, donc à une diminution de l'inflammation (Tölle et al., 2008). Par ailleurs, Rac-1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) favorise la prolifération et la migration des CML (Chen et al., 2016).

e. Autres activités athéroprotectrices des HDL

i. Activité anti-thrombotique

Au cours de l'athérosclérose, lorsque la sténose s'installe, les éléments coagulants du sang, les plaquettes et les fibrines, se déposent au niveau de la plaque. Ils augmentent le risque de thrombose. Les plaquettes sont également des facteurs aggravants dans des étapes précoces de la formation de la plaque car elles participent à l'activation endothéliale en produisant et sécrétant des facteurs de croissance et des chimokines, et recrutent des cellules inflammatoires. Elles modifient les propriétés de l'endothélium afin de favoriser la migration des monocytes et lymphocytes dans l'espace sous-endothélial.

L'action des HDL sur les cellules endothéliales est impliquée dans l'inactivation des voies de coagulation plaquettaire : une méta-analyse regroupant 21 études et plus de 63 000 individus a révélé que les concentrations plasmatiques de HDL-C étaient significativement diminuées chez les patients atteints de thrombose veineuse (Ageno et al., 2008). En effet, la PGI2 produite par les cellules endothéliales suite à l'action des HDL inhibe directement l'activation, donc l'aggrégation plaquettaire (Smith, 1981). En parallèle, l'incubation de lipoprotéines HDL sur des cellules endothéliales inhibe la production du facteur d'activation plaquettaire PAF (*Platelet-Activating Factor*) (Calabresi et al., 2003) et du facteur de coagulation X (van der Stoep et al., 2014). Ce facteur X est notamment impliqué dans la maturation de la thrombine, qui est précurseur de la formation de fibrines. Les cellules endothéliales, sous l'action des HDL_2, diminuent leur production de thromboxane A_2 (TXA_2) (Mineo et al., 2006). TXA_2 est un dérivé de prostaglandine responsable d'une vasoconstriction

et de l'activation des plaquettes. Son inhibition reflète le rôle anti-thrombotique des particules HDL.

Les effets des HDL sur les plaquettes semblent dépendants de l'expresion de SR-BI à la surface de ces cellules : la déficience pour Sr-bI chez la souris favorise l'activation plaquettaire (Korporaal et al., 2011).

Au cours de l'activation plaquettaire, les PL anioniques sont déplacés sur la couche externe de la membrane plasmique et peuvent induire l'activation de facteurs de coagulation. En présence de HDL, l'apo A-I permet un réarrangement des PL à la membrane et au sein de la lipoprotéine, diminuant ainsi l'exposition de ces PL anioniques, et réduisant l'activation des plaquettes et l'aggrégation des facteurs de coagulation (Oslakovic et al., 2009).

Enfin, chez l'Homme, les concentrations des HDL-C ont été inversement associées aux concentrations plasmatiques de PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor type 1*), un facteur de thrombose (Asselbergs et al., 2007). Il est à noter que des modifications sur les HDL, telles que des oxydations de PL, peuvent conduire au contraire à une augmentation de l'activité plaquettaire, *via* une hausse de la production de PAI (Norata et al., 2004).

ii. Activité anti-oxydative

Le pouvoir anti-oxydant des HDL a été évalué chez l'Homme : dans une population d'individus atteints du syndrome métabolique, les concentrations de HDL-C circulantes ont été négativement associées au stress oxydatif mesuré en systémique. De plus, l'activité anti-oxydative des différentes sous fractions de HDL est systématiquement plus faible chez les patients atteints du syndrome métabolique par rapport au groupe contrôle (Hansel et al., 2004).

Ainsi, en plus de la diminution de l'oxydation sur les acteurs cellulaires impliqués dans le développement de la plaque d'athérome,les HDL peuvent également impacter l'oxydation des lipoprotéines LDL circulantes (Brites et al., 2017). Les protéines de transfert des lipides impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines, comme la PLTP ou la CETP, mais aussi l'apo A-IV, sont capables de déplacer les PL oxydés, oxPL, des LDL vers les HDL. De même, les hydrolases associées aux HDL, PON1 (*Paraxonase 1*), LCAT et PAF-AH (*Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase*) contribuent à cet effet anti-oxydatif des HDL, en hydrolysant les oxPL après que ceux-ci aient été chargés sur les HDL. Certaines apolipoprotéines ou autres protéines liées aux HDL sont impliquées dans la réduction des PL hyperoxides en PL hydroxydes : l'apo A-I, l'apo A-II, SAA (*Serum Amyloid A*) et GPX3

(*Glutathione Peroxidase 3*) favorisent ce phénomène. Au contraire, les apo D et E inhibent cette réduction.

f. Lipoprotéines HDL dysfonctionnelles

La composition en PL et protéines des particules HDL est déterminante dans leurs activités athéroprotectrices. Des perturbations du contenu des HDL entraînent leur incapacité à remplir leurs fonctions : on parle de lipoprotéines HDL dysfonctionnelles (Rosenson et al., 2016). Par exemple, l'accumulation d'oxPL (suite au traitement avec la 15-lipoxygénase naturellement exprimé dans la plaque) dans les HDL leur donnent des propriétés pro-inflammatoires et pro-oxydatives vis-à-vis des cellules endothéliales (Pirillo et al., 2008). De même, une forte expression de la myéloperoxidase dans les cellules myéloïdes entraîne une dysfonction des HDL, et impacte notamment leur capacité à réaliser de l'efflux ABCA1 dépendant (Bergt et al., 2004). Il a également été montré qu'une augmentation du contenu de la lipoprotéine HDL en apo C-III était associée avec une hausse du risque de MCV (Jensen et al., 2012).

Plus récemment, une étude lipidomique a corrélé la répartition des lipides dans les différents types de lipoprotéines HDL_2 et HDL_3 avec leurs différentes fonctions (Camont et al., 2013). De façon intéressante, Camont et ses collaborateurs ont montré, sans parler de dysfonction, que la nature et le contenu des lipoprotéines HDL impactaient leurs activités. Les HDL_3, petites et denses, riches en PL chargés négativement (PS et PA principalement), sont ainsi positivement associées à la capacité à faire de l'efflux de cholestérol. De nombreuses autres fonctions des HDL_3 sont améliorées *in vitro* : meilleure activité anti-inflammatoire, anti-oxydative, anti-thrombotique et anti-apoptotique.

L'ensemble des activités des HDL suggèrent un fort pouvoir athéroprotecteur, celui-ci étant directement lié au contenu de la lipoprotéine, que ce soit en apolipoprotéines ou en lipides. Toutes ces fonctions ont favorisé le développement de stratégies thérapeutiques visant à augmenter les concentrations et/ou l'efficacité des lipoprotéines HDL, afin de potentialiser leurs effets.

C. LES THERAPIES PAR LES LIPOPROTEINES HDL : DEFIS PRESENTS ET FUTURS

1. Les stratégies hypolipémiantes

Dans le contexte pathologique de l'athérosclérose et des maladies associées, développer de nouveaux outils thérapeutiques est un enjeu primordial. Les premières stratégies utilisées ont cherché à diminuer les concentrations plasmatiques de LDL-C, lipoprotéines pro-athérogènes : ce sont les stratégies hypolipémiantes.

a. Les statines

Les statines représentent aujourd'hui les principaux outils pharmacologiques hypolipémiants utilisés. Ce sont des inhibiteurs de l'HMG-coA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A) réductase, l'enzyme hépatique limitante de la synthèse de cholestérol (figure 10). La liaison réversible des statines sur le site enzymatique de l'HMG-coA réductase l'empêche d'obtenir sa conformation fonctionnelle. Ce sont des drogues très compétitives car elles ont une affinité de l'ordre du nanomolaire alors que le substrat naturel, l'HMG-coA, a une affinité de l'ordre du micromolaire (Corsini et al., 1999). Elles entraînent donc une baisse de la concentration intracellulaire de cholestérol.

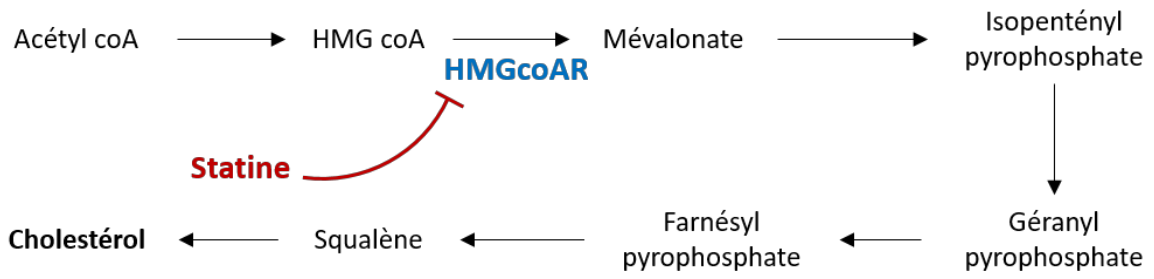


Figure 10 : Synthèse du cholestérol et action des statines
HMGcoAR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase).

Les cellules répondent à cette baisse en activant notamment la voie SREBP : les facteurs de transcription SREBPs sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie lipidique cellulaire. En conditions normales, SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) est maintenu dans le réticulum endoplasmique (RE) dans un état de précurseur inactif par la protéine Scap (*SREBP Cleavage-Activating Protein*). Lors d'une privation intracellulaire en cholestérol, comme c'est le cas suite à l'action des statines, Scap permet la translocation de SREBP vers le Golgi, où il est clivé par deux protéases (S1P et S2P, *site-1/2 proteases*) (DeBose-Boyd and Ye, 2018). Elles libèrent le fragment enzymatique actif de SREBP, qui est alors transloqué vers

le noyau pour stimuler l'expression du LDL-R. L'augmentation résultante de la captation du LDL-C induit une baisse significative de ses concentrations circulantes. L'efficacité de la diminution est largement dépendante du type de statine utilisé (table 2). Les statines sont classées en trois catégories, selon leur structure chimique, leur origine et leur solubilité (Bedi et al., 2016).

Tableau 3 : Efficacité des statines sur la réduction de LDL-C et les conséquences sur le risque cardiovasculaire.
Les effets observés sur les lipides répertoriés ici sont dus à un traitement à la dose la plus forte pour chaque statine différente. LDL-C : Low Density Lipoprotein-cholestérol, TG : Triglycérides, HDL-C : High Density Lipoprotein-cholesterol, CV : cardiovasculaire

	Atorvastatine	**Lovastatine**	**Pravastatine**	**Simvastatine**	**Fluvastatine**	**Rosuvastatine**	**Pitavastatine**
Dose utilisée (mg/dl)	10-80	10-80	10-80	10-80	20-80	5-40	5-20
LDL-C (%)	-60	-40	-34	-47	-24	-55	-43
TG (%)	-29	-16	-24	-18	-10	-43	-18
HDL-C (%)	+6	+8,6	+12	+12	+8	+9,2	+5
Evènements CV (%) (dose en mg/dl)	-37% (10)	-35% (20-40)	-25% (40)	-50% (20-40)	-20% (20-40)	-40% (20)	-20% (20)

Les statines se sont montrées efficaces, en parallèle, efficaces pour augmenter celles de HDL-C. De plus, les statines ont également des effets pléiotropes sur la fonction endothéliale, l'inflammation, l'activation des cellules musculaires lisses ou des plaquettes (Stancu and Sima, 2001; Baigent et al., 2005).

De nombreuses entreprises pharmacologiques ont développé leur statine et des études cliniques comparatives, comme l'essai STELLAR (*Statin Therapies for Elevated Lipid Levels compared Across doses to Rosuvastatin*) ont été menées afin de déterminer la dose optimale pour obtenir une réponse suffisante en termes de réduction de LDL-C, l'objectif thérapeutique premier des statines. Cependant, la réponse aux statines est très différente selon les patients : le sexe, mais aussi l'origine ethnique ou encore la dose de statines reçue impactent la réponse (Jones et al., 2003). Certains patients peuvent recevoir le traitement aux statines sur un long terme. Pour d'autres, l'exposition prolongée peut induire des effets secondaires (diabète, myalgies…). Par ailleurs, malgré des baisses importantes des concentrations de LDL-C plasmatiques, le risque CV résiduel reste très important chez certains patients traités aux statines (Baigent et al., 2005; Fruchart et al., 2008). Enfin, certaines études signalent une absence de diminution de LDL-C malgré le traitement aux statines à haute dose (Boekholdt et al., 2014).

b. Les thérapies de combinaison

i. Statines et niacine

La niacine (acide nicotinique), aussi connue sous le nom de vitamine B_3, est une molécule qui module les lipides plasmatiques et permet une augmentation des concentrations de HDL-C (jusqu'à 35%) dans le plasma. Les premières études ont mis en évidence que le traitement à la niacine limitait la survenue d'évènements cardiovasculaires et la progression de l'athérosclérose (Birjmohun et al., 2005; Bruckert et al., 2010). Lorsque la niacine est prescrite en combinaison avec une statine, les concentrations plasmatiques de LDL-C pro-athérogènes et HDL-C anti-athérogènes sont donc significativement diminuées et augmentées, respectivement. Cependant, les essais cliniques relatant du risque CV lié à cette double thérapie n'ont jamais montré une réelle efficacité. L'essai AIM-HIGH, mené sur 3414 patients, (*Atherothrombosis Intervention in Metabolic syndrome with low HDL/High triglycerides and Impact on Global Health outcomes*) a été prématurément stoppé au bout de 3 ans pour manque d'efficacité de l'association statines/niacines, par rapport aux statines seules (AIM-HIGH Investigators et al., 2011). De même, une méta-analyse récente confirme que la niacine ne renforce pas l'effet dû aux statines lors d'une thérapie de combinaison (35 301 patients répartis dans 11 essais cliniques randomisés) (Keene et al., 2014).

ii. Statines et fibrate

Les fibrates sont des molécules pharmacologiques qui activent les récepteurs nucléaires PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), notamment PPARα, inducteurs de l'expression de gènes du métabolisme lipidique. Les fibrates induisent une augmentation des concentrations plasmatiques de HDL-C, plus modérée par rapport au traitement avec la niacine (Birjmohun et al., 2005). Les TG sont diminués de façon plus importante encore. En conséquence, une baisse significative du nombre d'évènements et de la mortalité CV est observée (Birjmohun et al., 2005; Jun et al., 2010). Cependant, l'étude ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) menée en 2010 sur des patients atteints de diabète de type 2 et traités en double thérapie fibrates/statines ne montre pas de diminution du nombre d'évènements CV plus importante par rapport à un traitement aux statines seules (ACCORD Study Group et al., 2010). Il est alors suggéré que le traitement aux fibrates doit être prescrit pour des patients avec des concentrations circulantes de HDL-C et TG respectivement faibles et élevées.

iii. Statines et ézétimibe

Exprimé sur la face apicale de l'entérocyte, NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like intracellular cholesterol transporter 1*) permet l'absorption de stérols originaires de l'alimentation ou recyclés par l'organisme. L'ézétimibe est une molécule qui, en se fixant sur NPC1L1, entre en compétition avec les stérols et réduit ainsi leur absorption intestinale (Ge et al., 2008). Le foie stimule alors l'expression du LDL-R pour compenser ces apports réduits en cholestérol. En conséquence, les concentrations de LDL-C sont significativement réduites de 15 à 22%. En association avec un traitement aux statines, ce pourcentage de réduction s'ajoute aux 30-60% déjà observés avec la statine en monothérapie (Catapano et al., 2016). Les différents essais cliniques menés sur les doubles thérapies statine/ézétimibe ont mis en évidence un effet bénéfique sur le risque CV, comparé au traitement avec une statine uniquement. Par exemple, l'essai le plus important en terme de nombre de patients (18 144) et de durée (7 ans), IMPROVE-IT (Improv*ed Reduction of Outcomes : Vytorin Efficacy International Trial*), a permis de mettre en évidence une diminution significative de la mortalité CV, et notamment du nombre d'infarctus du myocarde (Cannon et al., 2015).

En conclusion, la diminution des concentrations de LDL-C ne semble pas suffisante pour observer un effet systématique sur la survenue d'évènements CV. Cette limite a conduit au développement de nouvelles stratégies, comme les thérapies de combinaison. Le double traitement statine/ézétimibe est prometteur, suggérant la nécessité de diminuer fortement les concentrations des LDL-C pour obtenir un effet concluant sur le risque CV. De même, la modulation des concentrations circulantes de HDL-C semble prometteuse, mais les effets CV restent discutés. Enfin, les inhibiteurs de PCSK9 (*Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) semblent également être une stratégie prometteuse. PCSK9 est une protéine qui se fixe aux récepteurs aux LDL des cellules et induit sa dégradation par le lysosome, augmentant ainsi les concentrations plasmatiques de LDL-C pro-athérogènes. Les inhibiteurs développés sont capables de diminuer les concentrations de LDL-C d'environ 60%, et de réduire la survenue d'évènements CV (Sabatine, 2019).

Une étude de Barter et ses collaborateurs énonce une hypothèse quant aux variations de réponses observées selon les patients. Ils ont montré que la concentration de HDL-C était un bon prédicteur du risque CV après traitement aux statines, même lorsque les concentrations de LDL-C sont extrêmement basses (<70mg/dl) : parmi ces patients, ceux qui ont les plus fortes concentrations de HDL-C sont aussi ceux qui ont le plus faible risque CV (Barter et al., 2007a).

Cette étude met en lumière la nécessité de stratifier les patients en fonction de leurs caractéristiques propres, afin de leur proposer un traitement unique ou de combinaison adapté.

2. La thérapie par les lipoprotéines HDL

En parallèle des traitements ciblant principalement les concentrations plasmatiques de LDL-C, des recherches ciblant celles de HDL-C ont été développées. Les fonctions athéroprotectrices des HDL étant alors largement démontrées ; les nouveaux outils cherchent à augmenter les concentrations plasmatiques de HDL-C, et/ou à augmenter leur activité. Le pari est notamment de stimuler le transport inverse de cholestérol.

a. Les inhibiteurs de la CETP

Enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines, la CETP module la répartition du cholestérol porté par les lipoprotéines HDL et LDL. Comme décrit précédemment, cette enzyme favorise l'accumulation de cholestérol au sein des lipoprotéines LDL et celle de TG au sein des HDL. Le développement de molécules inhibitrices de la CETP, empêchant les transferts réciproques et maintenant le cholestérol dans la lipoprotéine HDL, a donc semblé très prometteur. Des études sur le gène codant la CETP ont identifié des polymorphismes associés aux concentrations plasmatiques de lipides et au risque CV. Ainsi, deux SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) fréquents dans le gène de la CETP (rs1800775, C (0,51) > A (0,49)) et le gène Taq1B (rs708272, G (0,56) > A (0,44)) en déséquilibre de liaison sont associés avec une réduction de l'activité de la CETP. Lorsque l'activité de la CETP est réduite, les concentrations de HDL-C sont augmentées et les risques d'infarctus du myocarde ou d'ischémies (vasculaires, cardiaques, cérébrale) sont réduits (Johannsen et al., 2012). Les grandes entreprises pharmacologiques ont produit et testé leur propre inhibiteur en essai clinique de phase III (Shrestha et al., 2018).

i. Torcetrapib

Le Torcetrapib est le premier inhibiteur de la CETP développé, par le groupe Pfizer. Il semble agir en augmentant l'affinité de la CETP pour les HDL, et fige le complexe formé dans un état empêchant tout transfert de lipides. Ainsi, il est très efficace pour inhiber les transferts de CE et de TG (Clark et al., 2006). L'essai clinique de phase III ILLUMINATE (*Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events*) a été mené chez 15 067 patients à haut risque cardiovasculaire (Barter et al., 2007b). Pour mesurer les effets du Torcetrapib, il a été associé (groupe Torcetrapib/atorvastatine) ou non (groupe atorvastatine) à une statine. Après 12 mois de traitement, la double thérapie Torcetrapib/atorvastatine a permis

une hausse de 72% des concentrations plasmatiques de HDL-C et une baisse de 25% et 9% de celles de LDL-C de TG, respectivement. De façon surprenante, une hausse du risque d'évènements CV et de la mortalité (toutes causes confondues) ont été observés chez les patients du groupe Torcetrapib/atorvastatine. Par ailleurs, des effets indésirables (hypertension, œdème, maux de tête…) étaient retrouvés plus fréquemment chez les patients recevant la double thérapie que chez les patients traités à l'atorvastatine seule. Concernant l'hypertension, une étude menée chez la souris traitée au Torcetrapib montre une même augmentation de la pression artérielle chez la souris WT et la souris transgénique pour le gène humain codant la CETP. Ceci suggère que l'hypertension due au Torcetrapib est indépendante de l'inhibition de la CETP (Simic et al., 2012). L'absence manifeste d'efficacité et les effets indésirables ont donc contraint Pfizer à stopper l'essai clinique.

ii. Dalcetrapib

Quelques années plus tard, Roche, a développé le Dalcetrapib. Il est suggéré que le Dalcetrapib agisse en induisant un changement de conformation de la protéine CETP, réduisant significativement son activité plasmatique : le transfert de EC est maintenu entre les HDL_3 et HDL_2, mais fortement inhibé entre HDL_2 et LDL (Niesor et al., 2010).

Dans un premier temps, dal-PLAQUE (essai clinique de phase IIb) souhaite déterminer les effets du Dalcetrapib sur la progression de l'athérosclérose et sa nocivité (Fayad et al., 2011b). Les résultats n'ont pas montré d'effet nocif du Dalcetrapib et ont mis en évidence une légère régression de la plaque, pourtant sans conséquence sur le risque CV (Fayad et al., 2011a). Les études sur le Dalcetrapib ont été poursuivies avec l'essai clinique de phase III Dal-OUTCOMES, mené pour étudier l'effet du Dalcetrapib sur les évènements CV, dans un groupe de patients déjà traités avec les statines. Ces patients sont tous à haut risque CV, c'est-à-dire qu'ils ont déjà eu un syndrome coronaire aigu, un infarctus du myocarde, ou encore une ischémie du myocarde avec modifications de l'électrocardiogramme. Le suivi montre dès le premier mois une augmentation de 30 à 40% des concentrations plasmatiques du HDL-C suite au traitement Dalcetrapib/statine, contre 4 à 11% chez les patients traités avec des statines seules (Schwartz et al., 2012). Cette différence est maintenue pendant les trois années de l'étude. Cependant, aucun effet bénéfique ou délétère n'a été observé sur le risque CV et la mortalité totale, ce qui a également conduit à l'arrêt des essais cliniques sur le Dalcetrapib. Ceci peut être en partie expliqué par le fait qu'aucune réduction des concentrations de LDL-C circulantes n'ait été mise en évidence.

Le Dalcetrapib est considéré comme un inhibiteur faible car il entraîne de faibles modulations des concentrations de HDL-C, et n'a aucun effet sur celles de LDL-C. De manière intéressante, aucune corrélation n'a été établie dans cette étude entre les concentrations de HDL-C et le risque d'évènement CV. Ceci suggère qu'en présence de pathologie cardiovasculaire, les HDL ont perdu certaines de leurs fonctions athéroprotectrices. Augmenter leurs concentrations ne suffit alors plus pour protéger du risque CV. Ces dernières hypothèses sont en désaccord avec le travail de Barter et coll., qui montre que le HDL-C est un bon prédicteur du risque CV, même chez des patients avec atteinte CV traités aux statines (Barter et al., 2007a).

iii. Evacetrapib

L'Evacetrapib a été développé par le groupe pharmacologique Eli Lilly. L'essai clinique ACCELERATE (*Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at a High Risk for Vascular Outcomes*) a inclus 12 092 patients, dont 96% étaient traités avec des statines, répartis en deux groupes recevant l'Evacetrapib ou un placebo (Lincoff et al., 2017). Comme pour le Torcetrapib, après seulement un mois de traitement, le traitement à l'Evacetrapib a augmenté de manière spectaculaire les concentrations de HDL-C circulantes (+125%), et diminué celles de LDL-C (-30% environ). De nouveau, ces variations des concentrations de lipides circulants opérées par l'Evacetrapib n'ont pas été suivies par une baisse du nombre d'évènements CV (12,9% des patients avec Evacetrapib contre 12,8% des patients prenant le placebo). En conséquence, ACCELERATE a également été stoppé prématurément, faute de bénéfice réel.

iv. Anacetrapib

L'Anacetrapib a été développé par les laboratoires Merck et est considéré comme l'inhibiteur de la CETP le plus prometteur vis-à-vis des résultats obtenus quant au risque CV. Plusieurs essais cliniques ont été menés avec cette molécule. Le premier, DEFINE (*Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib*), a montré une hausse impressionnante du HDL-C circulant de 138%, et une baisse de près de 40% du LDL-C (Cannon et al., 2010). Aucun effet indésirable n'a été mis en exergue sur la durée de l'essai (environ 18 mois), il a donc donné lieu à un second essai clinique de phase III. REVEAL (*Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid Modification*) a inclus 30 449 patients atteints de MCV liée à l'athérosclérose. Après 4 ans de suivi, les résultats ont montré une baisse significative de la survenue d'évènements CV d'environ 10% pour les

patients recevant l'Anacetrapib (HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group et al., 2017) en combinaison aux statines en comparaison aux patients traités aux statines seules. Les conséquences sur les lipides plasmatiques ont également été confirmées.

Pour les auteurs, l'efficacité de cet inhibiteur est en partie due au nombre d'individus recrutés, plus important que pour les autres essais, ILLUMINATE (n=15 067), dal-OUTCOMES (n=15 871) ou ACCELERATE (n=12 092), mais aussi à la durée de suivi, largement supérieure. En effet, il faut noter que pendant les 2 premières années de suivi de REVEAL, aucune différence n'a été mise en évidence concernant le risque d'évènement CV. L'effet bénéfique apparaît au cours de la troisième année de traitement avec l'Anacetrapib. Ces derniers résultats suggèrent que les inhibiteurs CETP pourraient être efficaces en combinaison avec un traitement aux statines s'ils sont utilisés comme thérapie pendant plus de 2 ans : ACCELERATE (Evacetrapib) d'une durée de 2 ans environ, n'aurait ainsi pas été assez long pour observer des effets chez les patients. Cependant, l'essai clinique dal-OUTCOMES (Dalcetrapib) a été poursuivi pendant 3 ans et n'a pas montré de bénéfice sur le risque CV. Enfin, le bénéfice du traitement avec l'Anacetrapib semble être plus important pour les patients avec des concentrations de LDL-C pro-athérogènes basales élevées, qui connaissent ainsi les plus fortes diminutions. La société Merck, malgré des résultats plus prometteurs que ses concurrents, a décidé d'abandonner ses études sur l'Anacetrapib et son éventuelle mise sur le marché.

v. Nouvelles approches pharmacogénomiques

Ces difficultés à développer une molécule efficace pour réduire le risque CV soulèvent une nouvelle question : comment déterminer la réponse à un traitement d'un patient ? Plusieurs études pharmacogénomiques récentes ont tenté de répondre à cette question. Tout d'abord, une méta-analyse GWAS (*Genome-Wide Association Study*) sur plus de 40 000 individus a cherché des variants génétiques expliquant tout ou partie de la réponse aux statines en termes de réduction de LDL-C (Postmus et al., 2014). L'allèle mineur du rs445925 (localisés dans le gène APO E) est ainsi associé à une bonne réponse aux statines. A l'inverse, les patients porteurs de l'allèle mineur du rs10455872 (LPA lipoprotéine (a)) répondent moins bien aux statines, c'est-à-dire que leurs concentrations de LDL-C sont moins diminuées par rapport aux patients possédant l'allèle fréquent de ce polymorphisme.

De même, une analyse post-hoc de l'essai clinique dal-OUTCOMES a été menée par l'entreprise DalCor Pharmaceuticals afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs qui

permettraient de stratifier les patients en fonction de leur réponse au Dalcetrapib. Les auteurs ont identifié un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) dans le gène codant l'adénylate cyclase 9 (ADCY9) comme modulant la survenue d'évènements CV en réponse au dalcetrapib : les patients AA du rs1967309 (G (0,59) > A (0,41)) ont une réduction du nombre d'évènements CV d'environ 39%, alors que le nombre d'évènements augmente d'environ 27% chez les patients GG traités avec l'inhibiteur de la CETP (Tardif et al., 2015). Dix autres SNPs, localisés dans le même gène et en déséquilibre de liaison avec rs1967309, sont associés avec les effets du Dalcetrapib sur l'épaisseur de l'espace intima-média, marqueur de l'athérosclérose. Toutefois ce SNP ne permet pas de prédire la réponse d'un autre inhibiteur de la CETP, l'Evacetrapib, sur les MCV (Nissen et al., 2018)indiquant que celui-ci est spécifique du Dalcetrapib et non pas de l'inhibition de la CETP.

Ces études suggèrent l'importance de tenir compte des variations génétiques dans le développement de thérapies. La réponse à celles-ci peut être fortement influencée par les polymorphismes des patients sur certains gènes précis.

b. La thérapie par les molécules d'apoA-I

En parallèle de l'échec et/ou l'abandon du développement des inhibiteurs de la CETP faute de bénéfices probants, d'autres stratégies basées sur les HDL ont été explorées. Pour augmenter les concentrations plasmatiques de HDL-C, certaines études se sont concentrées sur la purification d'apo A-I natives, d'autres sur la génération de molécules d'apolipoprotéine A-I de synthèse.

i. Les perfusions d'apoA-I natives

Les premières expériences menées chez le lapin ont permis de montrer que la perfusion d'apoA-I purifiée (après « pool » de 500 plasmas) ralentissait la progression de l'athérosclérose induite par un régime riche en cholestérol (Miyazaki et al., 1995). Très rapidement, ces perfusions ont été testées chez l'Homme par le groupe britannique de Norman E. Miller. Ils ont montré que la perfusion continue d'apoA-I humain chez l'Homme sain conduisait à une augmentation des concentrations de HDL-C circulantes, notamment de HDL de type pré-β (Nanjee et al., 1999). Ces HDL pré-β semblent ensuite largement remaniées : les concentrations des enzymes CETP, LCAT et PLTP varient dans le plasma suite à la perfusion (Kujiraoka et al., 2003). Enfin, les auteurs concluent que l'apoA-I provoque une augmentation de l'efflux de cholestérol (sans que les cellules d'origine ne soient mentionnées), observée par une hausse des concentrations plasmatiques de PL (sur les HDL mais aussi l'albumine) et de CL (sur les HDL

uniquement) plasmatiques (Nanjee et al., 2001). Aucune étude clinique n'a été menée pour évaluer l'effet de la perfusion d'apoA-I native sur la réduction de l'athérosclérose ou le risque CV.

ii. Les perfusions d'apoA-I $_{Milano}$

Les individus porteurs de la mutation apo A-I $_{Milano}$ (AIM, Arg173Cys) étant protégés de l'athérosclérose malgré de faibles concentrations de HDL-C, plusieurs études se sont intéressées à utiliser cette apolipoprotéine particulière en thérapie. Chez la souris déficiente pour l'apoE, l'injection d'apoA-I $_{Milano}$ recombinante réduit significativement le contenu en lipides (-40 à 50%) et en macrophages (-29 à 36%) de la plaque d'athérosclérose (Shah et al., 2001).

Le groupe Esperion Therapeutics a développé des lipoprotéines HDL de synthèse à partir d'apoA-I $_{Milano}$ et de POPC (PC palmitoyl-oleoyl) : ETC-216. Testée chez des patients atteints de syndrome coronaire aigu (n=47), l'ETC-216 permet une réduction du volume de la plaque, mesuré par ultrasons intravasculaires (*IntraVascular UltraSound* IVUS) (Nissen et al., 2003). Plus récemment, une autre étude menée sur des volontaires sains (n=32) a montré une baisse des concentrations de HDL-C plasmatiques, et une hausse de celles de TG, après perfusion avec l'ETC-216. Ce profil similaire à celui retrouvé chez les porteurs de la variation génique AIM, est cependant précédé par une élévation transitoire des concentrations de HDL-C (Bisgaier et al., 2016). Ces deux études menées chez un très faible nombre d'individus n'ont pas été suivies par d'autres investigations sur cette molécule.

En revanche, les recherches se sont poursuivies sur le MDCO-216 (*The Medicines Company*), qui succède à l'ETC-216. L'étude de Kallend et coll teste l'effet de la perfusion de MDCO-216 chez des volontaires sains et des patients atteints de pathologie coronaire. Elle indique qu'une unique perfusion de MDCO-216 entraîne une augmentation de l'efflux de cholestérol via ABCA1, ainsi qu'une hausse des concentrations plasmatiques de HDL pré-β et de PL, maintenues pendant 24 à 48h, dans les deux groupes d'individus (Kallend et al., 2016). Des travaux du même groupe précisent que les HDL pré-β mais aussi les grandes HDL_2 voient leurs concentrations augmenter dans les premières 48h post MDCO-216, alors que celles de HDL_3 sont diminuées (Kempen et al., 2016). Il est à noter que l'apolipoprotéine AIM est retrouvée dans les HDL2. Le MDCO-216 semble donc permettre une hausse des concentrations de HDL pré-β, puis un remodelage de ces lipoprotéines en HDL de taille plus importante, notamment grâce à une stimulation de leur capacité d'efflux de cholestérol ABCA1-

dépendante. Ces études soulignent l'importance du métabolisme des HDL dans l'amélioration de leurs fonctions.

L'essai MILANO-PILOT a testé la perfusion d'une dose hebdomadaire de MDCO-216 pendant 5 semaines, chez des individus avec syndrome coronaire aigu traités avec une statine. Malgré une bonne tolérance des patients, la molécule n'a pas permis une baisse significative du volume de plaque d'athérosclérose (IVUS) (Nicholls et al., 2018b) en comparaison aux patients traités avec la statine seule, ce qui a stoppé les analyses cliniques sur MDCO-216.

iii. Les perfusions d'HDL reconstituées

La CER-001 est produite à partir d'apo A-I humaine exprimée dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), sécrétée dans le milieu de culture, purifiée puis chargée en PL. L'apo A-I produite par les CHO est dite recombinante et elle est lipidée, dans le cas de CER-001, avec de la sphingomyéline et du dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG). *In vitro*, CER-001 stimule l'efflux de cholestérol des macrophages murins J774 et réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (comme IL-6, IL-8 et MCP-1) par les cellules endothéliales HUVECs (Tardy et al., 2014). Elle réduit la plaque d'athérome chez les souris LDL-R KO nourries avec un régime riche en cholestérol pendant 11 semaines. Testé chez l'Homme dans un groupe de patients atteints d'athérosclérose, la CER-001 n'a pas induit de réduction significative du volume de la plaque (IVUS), quelle que soit la dose perfusée (Tardif et al., 2014). Cependant, certaines études présentent des résultats contradictoires : chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (FH, *Familial Hypercholesterolemia*) homozygote, la perfusion de CER-001 deux fois par semaine pendant 12 semaines permet une réduction du volume de la plaque d'athérosclérose (Hovingh et al., 2015). De plus, une étude menée dans une population de patients atteints d'hypoalphalipoprotéinémie familiale montre que CER-001 réduit l'épaisseur de la plaque d'athérome chez les patients traités (Kootte et al., 2015). Kataoka précise que la plaque d'athérome est en effet réduite après traitement avec CER-001 lorsqu'elle a un volume basal d'au moins 30% (PAV, *Percent Atheroma Volume*, calculé par rapport au volume de plaque et à celui de la lumière artérielle) (Kataoka et al., 2017). Lorsque ce PAV est inférieur à 30%, la molécule ne semble pas avoir d'effet. Ces résultats sont réfutés quelques mois plus tard : chez des patients avec syndrome coronaire aigu, inclus dans l'analyse car avec un PAV basal ≥ 30%, CER-001 n'a pas plus d'effet sur la régression de la plaque (Nicholls et al., 2018a). Ces résultats contradictoires sur l'efficacité de CER-001 ne permettent pas de l'utiliser en thérapie actuellement.

Une autre molécule, CSL-111, a été développée à partir d'apoA-I humaine et de phosphatidylcholine issue du soja par le groupe biopharmaceutique CSL Behring. L'essai clinique ERASE (*Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety and Efficacy*) a comparé l'effet de CSL-111 à faible et forte dose (40mg/kg et 80mg/kg, respectivement) sur la plaque d'athérome de l'artère coronaire des patients atteints de syndrome coronaire aigu. La forte dose a été rapidement abandonnée suite à l'intolérance hépatique qu'elle entraînait, malgré son efficacité sur l'activation endothéliale (diminution de l'expression de CD11b) et le contenu en lipides de la plaque, due à une augmentation des capacités d'efflux de cholestérol (Shaw et al., 2008). La faible dose a permis une tendance à la diminution du volume de plaque d'athérome (IVUS), non significative par rapport au groupe placebo (Tardif et al., 2007). Les auteurs ont cependant pu conclure que la perfusion avec CSL-111 amélioraient l'index de caractérisation de la plaque (calcifiée, fibreuse, …) et le score angiographique coronaire.

CSL-112, la molécule qui succède à CSL-111, contient 55 molécules de PC par apo A-I. Elle a prouvé son efficacité chez le lapin, où elle stimule l'efflux de cholestérol dépendant du transporteur ABCA1 (Diditchenko et al., 2013). Chez l'Homme, de la même manière, Gille et coll. ont montré une augmentation de l'efflux de cholestérol *via* ABCA1 (mesuré *ex vivo* sur des macrophages J774) du sérum isolé du sang des patients, après perfusion de CSL-112 chez des individus sains (Gille et al., 2014). Le cholestérol est retrouvé majoritairement dans les particules HDL. Chez des sujets atteints d'athérosclérose recrutés dans le cadre d'un essai clinique de phase II, la perfusion de CSL-112 est suivie d'une hausse significative des concentrations d'apoA-I et de HDL-C. *Ex vivo*, la capacité d'efflux de cholestérol par ABCA1 est également augmentée chez ces patients (Tricoci et al., 2015). Les conséquences sur le risque d'évènement CV n'ont pas été mesurées. Enfin, il a été montré que CSL-112 était remodelé simultanément avec les HDL natives. La fonctionnalité des particules est modulée (quelle que soit leur origine), notamment leur capacité à faire de l'efflux de cholestérol et leur fonctions anti-inflammatoires (Didichenko et al., 2016).

L'ensemble de ces études, souvent contradictoires en terme de résultats, suggèrent que des progrès sont encore à faire dans le cadre des thérapies HDL. Aucune des stratégies présentées ici n'a un effet systématique positif sur les MCV et le risque CV. Par ailleurs, certaines études suggèrent que l'élévation des concentrations plasmatiques de HDL-C n'est pas toujours recommandée : l'étude de Ko et ses collaborateurs indique que le hazard ratio de la mortalité CV en fonction de la concentration plasmatique de HDL-C suit une courbe en U : à de fortes concentrations de HDL-C, le risque CV augmente, comme pour de faibles

concentrations (Ko et al., 2016). Ceci est particulièrement vrai chez les hommes. De même, une méta-analyse regroupant 108 études et 299 310 invididus à haut risque CV conclut que les variations de concentrations de cholestérol associées aux lipoprotéines HDL explique moins de 1% de la variabilité dans les évènements CV (Briel et al., 2009). Enfin, des études conduites chez la femme suggèrent qu'après la ménopause, les concentrations élevées de HDL-C pourraient ne plus être associées à une athéroprotection (El Khoudary et al., 2018).

La prise en compte des données de pharmacogénomiques, ou encore des résultats suggérant une prise en charge des patients selon leur niveau d'atteinte, pourrait permettre d'organiser et stratifier les patients en fonction de leurs besoins et des efficacités attendues des traitements. La prise en compte de ces observations pourrait être primordiale pour optimiser la thérapie par les HDL.

D. LA REGULATION EPIGENETIQUE DU METABOLISME DES HDL

La définition de l'épigénétique (formé à partir du grec epi « au-dessus ») communément acceptée est donnée par Riggs en 1996 : « *the study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in DNA sequence* » (Riggs et al., 1996). Les modifications épigénétiques peuvent intervenir à différents moments de la transcription d'un gène en protéine, et regroupent la méthylation de l'ADN, les microARNs, ou miRs, et les modifications des histones (figure 11). La fixation des facteurs de transcription sur les séquences du génome, favorisée ou non par les éléments cités ci-avant, est également un mécanisme de régulation épigénétique. Tous ces mécanismes affectent l'état de la chromatine. Le niveau de compaction plus (hétérochromatine) ou moins (euchromatine) important de celle-ci impacte l'expression des gènes.

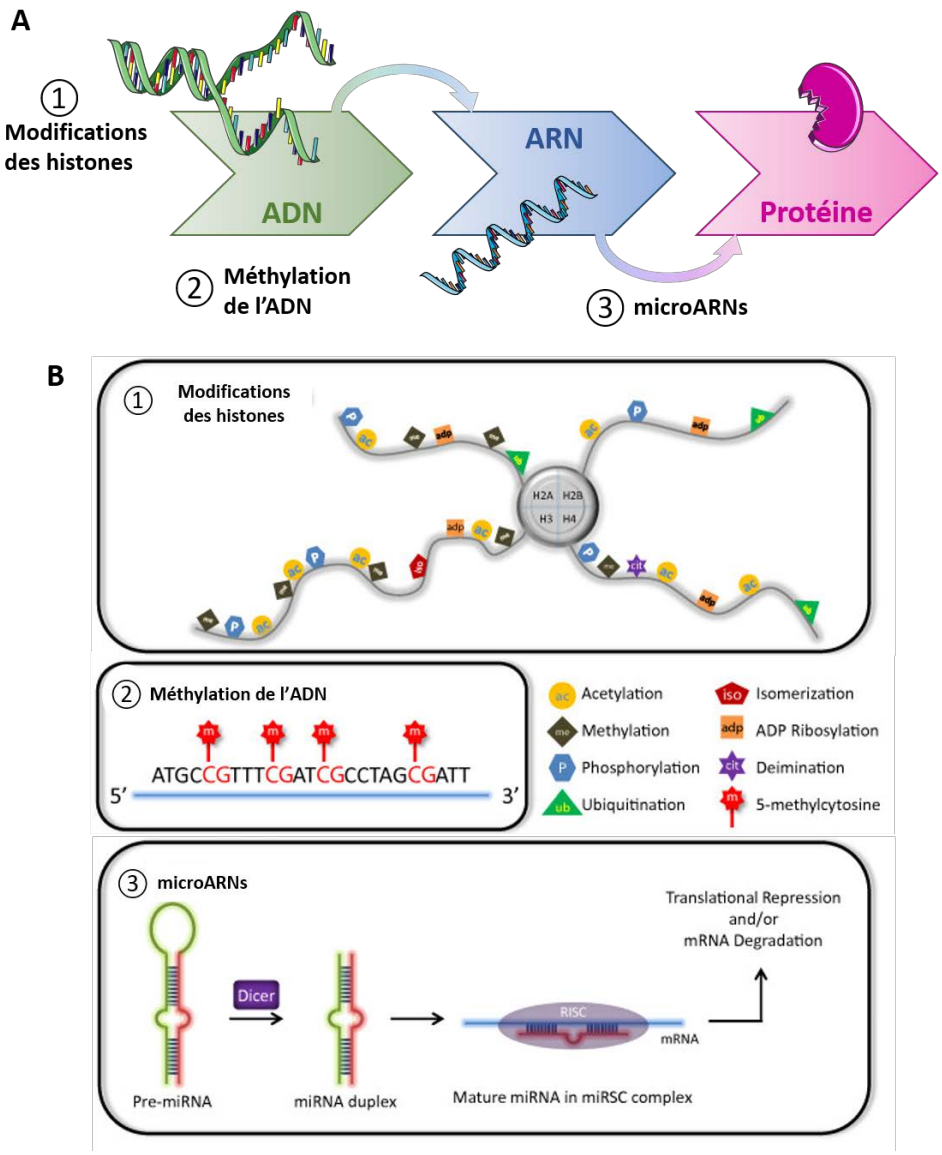


Figure 11 : Les différents mécanismes de régulation épigénétiques
***A**, Sur l'ADN, les histones peuvent être modifiés et la méthylation modulée. Les microARNs interviennent sur l'ARNmessager (ARNm). **B**, Différentes modifications chimmiques peuvent intervenir sur les histones. Les microARNs dégradent l'ANRm ou inhibent sa traduction. (Chow et al., 2013)*

1. Les microARNs et le métabolisme des HDL

Identifiés chez le nématode en 1993, les microANRs, ou miRs (≈ 22 nucléotides) appartiennent à la famille des ARNnc. Ceux-ci ont été identifiés suite au séquençage complet du génome humain, lorsqu'il est apparu évident que plus de 90% des gènes codent pour des transcrits non traduits en protéines. Les ARNnc regroupent également les ARN de transfert, les ARN ribosomiques, et de nombreux autres petits ARN que je ne détaillerai pas plus ici. Quelques années après leur découverte, les miRs ont été montrés comme étant impliqués dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, de la différenciation cellulaire à la régulation des fonctions métaboliques.

a. Biogenèse des microARNs

i. Synthèse nucléaire

Chez l'Homme, les gènes codant les miRs sont localisés sur tous les chromosomes. Ils peuvent être retrouvés dans des régions intergéniques (et possèdent leurs propres régions régulatrices) ou des régions intragéniques, et sont alors sous contrôle des promoteurs de leurs gènes hôtes (Desgagné et al., 2017). Les gènes des miRs peuvent être transcrits en tant qu'unités indépendantes, ou regroupés en cluster, soumis aux mêmes régulations.

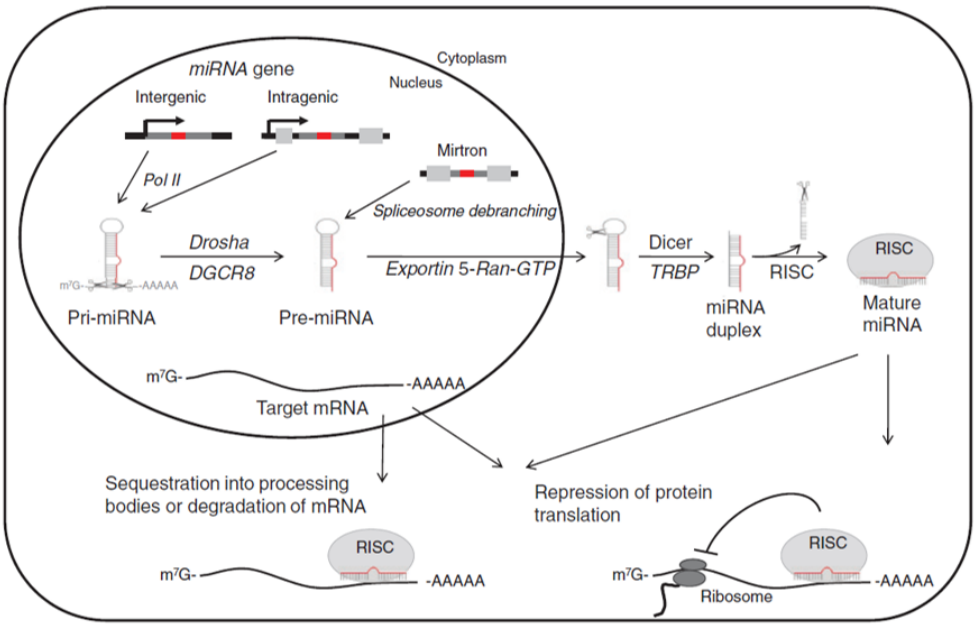


Figure 12 : Synthèse et maturation des miRs
PolII : polymérase II, DGCR8 : DiGeorge Critical Region 8, GTP : guanosine triphosphate, TRBP : TAR RNA-Binding Protein, RISC : RNA Induced Silencing Complex. Issue de (Desgagné et al., 2017)

Dans le noyau cellulaire, les miRs sont majoritairement transcrits par l'ARN polymérase II, et plus rarement par l'ARN polymérase III, sous la forme précurseur d'un ARN de plusieurs milliers de nucléotides. Ce miR primaire, appelé pri-miR, a une structure en « épingle à cheveux », dont l'extrémité 3' possède une coiffe 7-méthylguanosine et l'extrémité 5' une queue poly-A (figure 12) (Kim and Nam, 2006). Le pri-miR est pris en charge par le complexe Drosha/DGCR8 (*DiGeorge Critical Region 8*), appelé « microprocesseur ». Ces deux protéines possèdent des domaines de liaison à l'ADN double brin, mais c'est la protéine Drosha qui exerce l'activité nucléase grâce à deux domaines ribonucléase III (RIIIDa et RIIIDb), L'activité RNase de Drosha libèrent un précurseur de miR, le pré-miR, long d'environ 70 nucléotides. Certains pri-miRs, notamment ceux retrouvés au sein d'un cluster, peuvent être à l'origine de plusieurs pré-miRs.

ii. Maturation nucléaire et export

Très instable dans le noyau, le pré-miR généré est exporté très rapidement vers le cytoplasme. La stabilisation du pré-miR et son transport se font grâce à la protéine exportin-5 (Xpo5), et son cofacteur ran-GTP. C'est la structure en « épingle à cheveux » qui permet la reconnaissance du pré-miR par Xpo5. Le complexe ainsi formé traverse le pore nucléaire et atteint le cytoplasme (figure 12). Le ran-GTP est alors hydrolysé en ran-GDP, qui a une faible affinité pour Xpo5. La dissociation de ran-GDP et Xpo5 déforme cette dernière, ce qui libère le pré-miR.

iii. Maturation cytoplasmique et formation du complexe RISC

Le pré-miR est pris en charge par le complexe protéique Dicer/TRBP (*TAR RNA-Binding Protein*). Dicer possède, comme Drosha, une activité RNase III. Le complexe clive la boucle terminale du pré-miR, générant ainsi un petit ARN double brin, d'environ 22 nucléotides. Enfin, cet ARN double brin est chargé sur une protéine Ago, via un mécanisme ATP-dépendant impliquant le complexe HSC70 (*Heat Shock Cognate*) – HSP90 (*Heat Shock Protein*). C'est le complexe pre-RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Les protéines HSC70-HSP90 vont dégrader l'un des brins d'ARN, le brin *passager* (noté miR*) selon la stabilité des deux extrémités. Le brin avec l'extrémité 5' la plus instable sera préférentiellement conservé, c'est le brin *guide* (Khvorova et al., 2003). Le miR simple brin, mature, transporté par la protéine Ago, formera alors le complexe RISC, qui peut cibler l'ARNm cible du miR et lui permet de remplir ses fonctions biologiques (figure 12).

b. Fonctions des miRs

i. Reconnaissance miR-ARNm

Dans le cytoplasme, la principale fonction des miRs est de réprimer la synthèse protéique. La reconnaissance du miR avec son ARNm se fait par complémentarité entre la région 3' UTR (*untranslated region*) de l'ARNm et les nucléotides 2 à 8 du miR. Plusieurs miRs peuvent avoir le même ARNm cible. Dans ce cas, si leurs sites de complémentarité sont physiquement proches (8 à 40 nucléotides d'écart), les miRs peuvent agir en synergie (Grimson et al., 2007). Il faut également noter qu'un miR peut cibler plusieurs ARNm.

La complémentarité parfaite n'est pas nécessaire, mais des mésappariements diminuent l'efficacité de l'interaction, et orientent le mode d'action du miR. En effet, un degré élevé de

complémentarité entraîne la dégradation des séquences d'ARNm cibles, alors qu'un mésappariement central facilite plutôt une inhibition de la traduction.

ii. Inhibition de la répression et dégradation de l'ARNm cible

Une fois transcrits, les ARNm sont protégés des exonucléases par la présence d'une coiffe en 5' (guanosine méthylée, m^7G) et d'une queue polyA à l'extrémité 3'. Le complexe RISC, lors de sa fixation sur l'ARNm, initie le recrutement des protéines de la famille GW182 (*glycine (G)-tryptophan (W) repeat-containing protein of 182kDa*). GW182 est primordiale pour initier la répression car elle favorise la déadénylation, qui déstabilise l'ARNm et recrute des facteurs de répression. Par ailleurs, GW182 recrute également des facteurs favorisant la décapsulation (suppression de la coiffe m^7G). Brièvement, l'exposition de l'extrémité 5' sans coiffe la rend accessible aux exonucléases (Iwakawa and Tomari, 2015; Jonas and Izaurralde, 2015). De cette façon, il est établi que les miRs sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de plus de 60% des gènes chez l'Homme (Friedman et al., 2009).

c. Stabilité des miRs

Les miRs sont présents dans tous les fluides biologiques (sang, lymphe, urine, fécès, liquide amniotique, lait maternel, larmes, salive…) et sont relativement stables, certains pouvant se maintenir plus de 24h dans les cellules et le plasma. Dans le plasma, l'intégrité des miRs est maintenue grâce aux transporteurs que sont les vésicules, les lipoprotéines ou les protéines de liaison à l'ARN. Il a été montré qu'il fallait environ 100 copies d'un miR mature par cellule pour observer un effet sur la répression du gène cible (Brown et al., 2007). Comme pour les séquences codantes, chaque miR du génome humain possède un profil d'expression préférentiel tissu-dépendant et variable dans le temps, ce qui souligne l'importance des miRs dans la différenciation et le développement cellulaire (Guo et al., 2014). Les miRs sont des régulateurs épigénétiques, mais leur expression peut également être modulée par une modification des histones ou de la méthylation de l'ADN.

d. Impact des miRs sur le rôle athéroprotecteur des lipoprotéines HDL

Dans le contexte des MCV liées à l'athérosclérose, il semble clair qu'une régulation fine des enzymes affectant le métabolisme des lipides est primordiale pour maintenir l'homéostasie lipidique. Il a largement été montré que les miRs pouvaient avoir un rôle régulateur sur le métabolisme du cholestérol, des lipides, et des maladies métaboliques (Desgagné et al., 2017). Ainsi, certains miRs ont été identifiés comme ayant des fonctions importantes dans la

détermination des fonctions athéroprotectrices des lipoprotéines HDL (Rayner and Moore, 2014).

i. miR 33

Les miRs 33a et 33b, premiers miRs ciblant ABCA1 identifiés, respectivement localisés dans les régions introniques des gènes *SREBF2* et *SREBF1*, sont co-exprimés avec leurs gènes hôtes (Najafi-Shoushtari et al., 2010). L'isoforme miR33b est absente chez les rongeurs, alors que la forme mir33a est très conservée entre les espèces. Les gènes *SREBF2* et *SREBF1* codent les protéines SREBP2 et SREBP1, facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol et d'acides gras (ABCA1, HMGcoA réductase, LDL-R, FASN *Fatty Acide Synthase*…). Ainsi, en présence de faibles concentrations intracellulaires de cholestérol, l'expression de *SREBF2* est stimulée pour augmenter la synthèse et l'entrée de cholestérol dans la cellule. Simultanément, l'expression de miR33a, qui a pour ARNm cible ABCA1, empêche l'efflux de cholestérol dans les hépatocytes et les macrophages humains, et les macrophages murins (Najafi-Shoushtari et al., 2010; Rayner et al., 2010; Gerin et al., 2010; Marquart et al., 2010).

Les souris dont l'expression de miR33a est inhibée par injection d'oligonucléotides anti-sens, de lentivirus anti-miR33a ou qui sont déficientes pour le gène miR33a ont des concentrations plasmatiques d'HDL-C augmentées (de 25 à 40% selon les études) et une hausse de l'expression hépatique d'ABCA1 (Najafi-Shoushtari et al., 2010; Rayner et al., 2010; Horie et al., 2010). L'inhibition de miR33 chez des souris LDL-R KO entraîne une diminution du volume de plaque d'athérome et augmente la stabilité de celle-ci, suite à la hausse des concentrations circulantes de HDL-C (Rayner et al., 2011). Ouimet et coll a montré que les macrophages de la plaque adoptent un profil type M2, moins inflammatoire par rapport à ceux isolés des souris exprimant miR33 (Ouimet et al., 2015). Cet effet est cependant observé sans impact sur les concentrations de HDL-C. Ceci suggère que l'effet de miR33 sur l'athérosclérose pourrait en partie être indépendant des concentrations de HDL-C.

mir33 a et mir33b contribuent également à la mobilisation du cholestérol en ciblant NPC1 (Niemann-Pick C1, impliqué dans l'efflux de cholestérol des lysosomes) et ABCG1 dans les macrophages (sauf chez l'Homme). De nombreuses études suggérant le rôle du miR*, simultanément avec le miR, émergent. Concernant miR33, miR33a* et miR33b* sont très conservés selon les espèces, et semblent cibler les mêmes gènes, ce qui indique un rôle

important du duplex miR33/miR33* dans la répression de leurs gènes cibles (Goedeke et al., 2013).

ii. miR144

miR144 est un miR intragénique, qui contrôle l'expression du gène ABCA1. L'expression de miR144 est stimulée dans les macrophages mais aussi les hépatocytes suite à l'activation de LXR ou de FXR (*Farnesoid X Receptor*) (Ramírez et al., 2013). Les études de gain et perte de fonction chez la souris ont montré que miR144 permet une réduction de l'expression d'ABCA1 et une baisse des concentrations de HDL-C circulantes (de Aguiar Vallim et al., 2013; Ramírez et al., 2013). Le gain de fonction de miR144 chez la souris ApoE KO induit une réduction du RCT et une expansion de la plaque d'athérome (Hu et al., 2014). Chez la souris déficiente pour le gène FXR dans le foie spécifiquement, miR144 échoue à diminuer l'expression d'ABCA1 et n'a aucun effet sur les concentrations de lipides plasmatiques, suggérant un rôle spécifique de l'activation de FXR dans le foie sur miR144. En effet, le KO FXR dans l'intestin n'impacte pas le rôle de miR144 (de Aguiar Vallim et al., 2013). De manière intéressante, l'effet de miR144 s'additionne à celui de miR33 et ils coopèrent pour réguler l'expression d'ABCA1.

iii. miR223

miR223 est un microARN exprimé dans les hépatocytes, où il régule la biosynthèse de cholestérol (Vickers et al., 2014):

- il inhibe l'expression de SR-BI, impliqué dans les échanges de lipides et notamment l'influx de CE.
- il inhibe l'expression de l'enzyme HMGCS1 (*HMG-coA synthase 1*), impliquée dans la synthèse de l'HMG-coA, précurseur du cholestérol.
- il stimule l'efflux de cholestérol en augmentant l'expression d'ABCA1, indirectement *via* l'inhibition du facteur de transcription Sp3.

La souris déficiente pour miR223 présente une hausse des concentrations plasmatiques de cholestérol total et de HDL-C, ainsi qu'une augmentation du cholestérol hépatique (Vickers et al., 2014). miR223 a également été identifié comme régulateur de gènes de l'inflammation dans les neutrophiles, monocytes et macrophages, mais aussi les cellules endothéliales. Transporté par les HDL et délivré dans les cellules endothéliales, mir-223 est capable d'inhiber l'expression d'ICAM-1 et CSF2 (*Colony Stimulating Factor 2*), limitant ainsi l'inflammation

(Tabet et al., 2014). Récemment, une étude a suggéré une collaboration hépatique entre neutrophiles et macrophages par l'intermédiaire de miR223 : miR223 produit par les neutrophiles pourrait être transféré aux macrophages où il serait capable de réprimer l'inflammasome NLRP3 (*NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3*), limitant ainsi l'inflammation dans le foie (Calvente et al., 2019).

iv. Autres miR régulateurs du métabolisme des HDL

Il existe de nombreux autres miRs qui sont impliqués dans le métabolisme des HDL, car ils ciblent des gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie des lipides (Desgagné et al., 2017). Les principaux miRs sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Implication des miRs dans le métabolisme des lipoprotéines HDL
C/EBPα : CCAAT/enhancer-binding protein α, ABCA1 : ATP-binding cassette A1, ABCG1 : ATP-binding cassette G1, APO A-I : apolipoprotéine A-I, LDL-R : LDL-récepteur, PPARγ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma, RXRα : retinoid X receptor α, SR-BI : scavenger receptor class B type I, CYP7 : cholesterol hydroxylase, LXR : liver X receptor, SREBP2 : sterol regulatory element-binding protein 2, HDL : high density lipoprotein, Apo B-100 : apolipoprotéine B-100, ML : métabolisme lipidique, KO : knock out, ND : non déterminé.

miR	Régulation de l'expression du miR	Gènes cibles	Voie impliquée	Effets sur les lipides circulants	Référence
miR27a/b	Hyperlipidémie, C/EBPα	ABCA1, ABCG1, APO A-I LDL-R PPARγ, RXRα SR-BI	Biogenèse et remodelage HDL Clairance lipoprotéines Apo B-100 Régulation transcriptionnelle gènes du ML Influx HDL-C	Aucun effet	(Shirasaki et al., 2013; Zhang et al., 2014; Goedeke et al., 2015b)
mir34a	*ND*	ABCA1, ABCG1, CYP7, LXR	Biogenèse et remodelage HDL Inflammation	↑ cholestérol total et volume d'athérome	(Xu et al., 2019)
miR96	SREBP2	SR-BI	Influx HDL-C	*ND*	(Wang et al., 2013)
miR148	Lipides alimentaires, SREBP1c	ABCA1 LDL-R	Biogenèse des HDL Clairance lipoprotéines Apo B-100	↓ LDL-C et ↑ HDL-C	(Goedeke et al., 2015a)
miR185	Stérols, Lipides alimentaires, SREBP1c	LDL-R SR-BI SREBP2	Clairance lipoprotéines Apo B-100 Influx HDL-C Régulation transcriptionnelle gènes du ML	↓ cholestérol total et volume d'athérome (souris apo E KO)	(Wang et al., 2013; Jiang et al., 2015)
miR758	Stérols	ABCA1	Biogenèse des HDL	*ND*	(Ramirez et al., 2011)

2. Modifications des histones et impact sur le métabolisme des HDL

Les histones sont des structures permettant la compaction de l'ADN. Le cœur de l'histone est composé de 4 protéines différentes : H2a, H2b, H3 et H4. Deux cœurs s'associent et sont stabilisés par l'histone H1. L'ADN (environ 145-147pb) s'enroule autour de cette structure stabilisée pour former le nucléosome.

Le nucléosome limite la transcription de l'ADN en le maintenant compacté, empêchant ainsi l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription. Cependant, les protéines constitutives des

histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles, favorisant la décompaction de l'ADN et son accessibilité. Parmi ces modifications, la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation sont les plus fréquentes. Elles sont le résultat d'action de différentes enzymes (acétylases et désacétylases, kinases et phosphatases, etc…) sur des résidus d'acides aminés précis de l'histone concernée. Les modifications ont généralement lieu au niveau de l'extrémité N-terminale des protéines H2a, H2b, H3 et H4 (figure 13) (Lawrence et al., 2016).

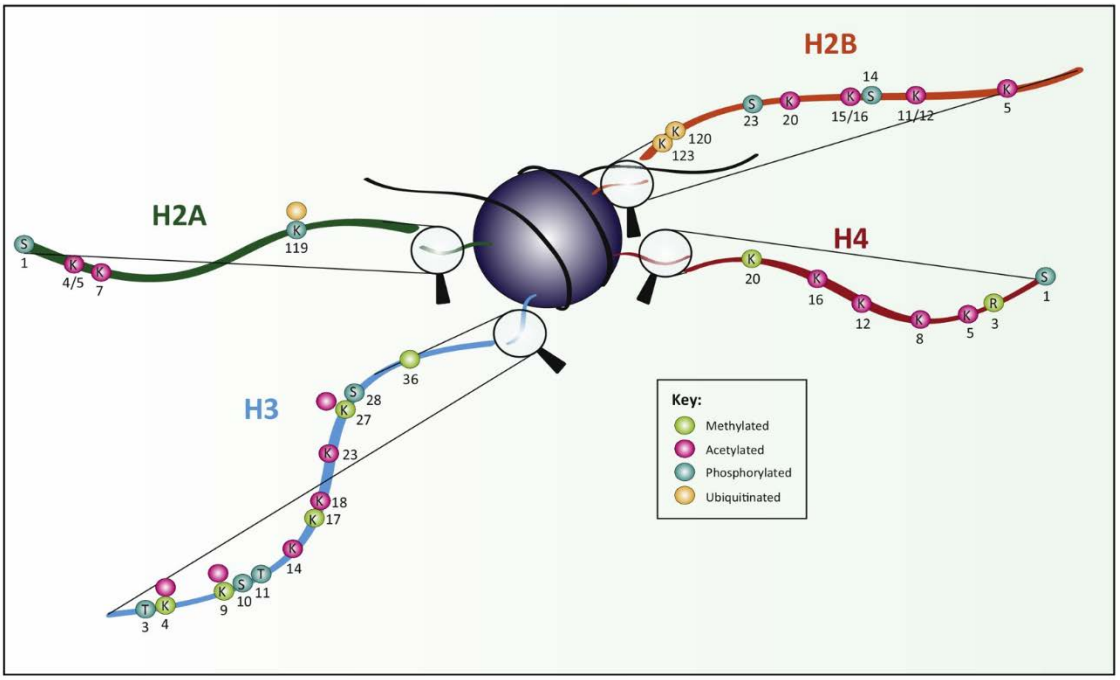


Figure 13 : Modifications des régions N-terminales des histones H2a, H2b, H3 et H4.
(Lawrence et al., 2016)

Le code des histones regroupe toutes les modifications chimiques post-traductionnelles que peuvent subir les histones, et leur impact sur l'accessibilité de la chromatine, donc sur la transcription des gènes concernés.

a. Le code des histones

i. Acétylation

L'acétylation des histones se fait majoritairement par des enzymes HATs (*Histone Acetyltransferases*) : elles ajoutent un groupement acétyl $COCH_3$ (provenant de l'acétyl-coA) sur des résidus lysines (K). En général, elle augmente la distance entre ADN et cœur de l'histone, favorisant l'accès des régions promotrices de l'ADN aux facteurs de transcription (Ferrari et al., 2012). Les HDAC (*Histone Desacetylases*) catalysent la réaction inverse et

limitent l'expression génique. Les HATs et HDACs font le plus souvent partie de complexes protéiques, dans lesquels sont notamment retrouvés des facteurs de transcription. Les modulations du niveau d'acétylation des histones impactent la dynamique transcriptionnelle, et est de fait également impliquée dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN… Des altérations du fonctionnement des HATs et des HDAcs sont retrouvées dans différents cancers.

ii. Méthylation

La méthylation peut avoir lieu sur des résidus lysines ou arginines (R). Elle est contrôlée par les HMTs (*Histone Methyltransferases*), qui peuvent transférer un à trois groupements méthyls. La méthylation des lysines est souvent impliquée dans la formation de l'hétérochromatine (ADN compacté) alors que celle des arginines induit plutôt la décompaction de l'ADN en euchromatine (Zhang and Reinberg, 2001). La méthylation peut être réduite par des protéines KDMs (*Lysine Demethylases*), capables de déméthyler les résidus lysines. Il existe une très grande variété de KDMs, qui possèdent toutes des rôles développementaux et physiologiques importants, soulignant l'influence de la méthylation des histones dans l'homéostasie cellulaire.

iii. Phosphorylation

La phosphorylation des histones est modulée par différentes kinases et phosphatases qui ne seront pas décrites ici. Brièvement, la phosphorylation peut avoir lieu sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine. Le premier rôle décrit de la variation de phosphorylation des histones est son implication dans la réparation de l'ADN double brin ayant subi des cassures. De plus, comme la méthylation et l'acétylation, la phosphorylation impacte la transcription des gènes en affectant le degré de compaction de la chromatine (Rossetto et al., 2012).

iv. Complexité du code des histones

Les différents mécanismes de modification des histones peuvent interférer les uns par rapport aux autres pour influencer l'expression génique. De même, certains résidus peuvent subir plusieurs types de modifications simultanément. C'est le cas de certaines lysines qui peuvent être méthylées et acétylées au même moment. De plus, certaines modifications peuvent en induire ou inhiber d'autres : la phosphorylation sur la sérine H3S10 favorise l'acétylation sur la lysine 14. Ces deux modifications répriment alors la méthylation de la lysine 9. Cette méthylation peut elle-même inhiber la phosphorylation de la sérine 10 (Lacoste and Côté,

2003). Ceci reflète la complexité du code des histones, et les difficultés à associer à chaque modification indépendante un effet unique sur l'expression des gènes concernés. C'est la combinaison des différentes modifications qui entraîne une réponse spécifique.

b. Impact sur les gènes du métabolisme lipidique

L'impact du code des histones sur le métabolisme des lipides a été étudié dans certains cancers : l'inhibition de l'histone méthyltransférase KMT5A diminue l'expression de SREBP1 dans deux lignées de cellules thyroïdiennes cancéreuses (Liao et al., 2018). Dans un contexte non cancéreux, une étude menée chez *C. Elegans* indique qu'une déficience de méthylation sur le site H3K4 favorise l'accumulation des graisses, particulièrement des acides gras mono-insaturés (Han et al., 2017). Chez l'Homme, l'enrichissement en H3K4 méthylées sur les gènes codant notamment LPL, SREBF2, PPARγ ou IL-6 est positivement associé au BMI et à la résistance à l'insuline dans des populations de patients obèses pré-diabétiques (Castellano-Castillo et al., 2019). Aucune analyse précise du métabolisme des HDL n'a cependant été poursuivie dans cette étude. L'importance de la méthylation sur cette lysine H3K4 sur le métabolisme des lipides est également suggérée par une étude menée dans des lignées d'hépatocytes HepG2 et Hep3B. Dans ces cellules, l'expression de gènes du métabolisme du cholestérol augmente fortement suite au Knock Down (KD) du gène codant la protéine LSD2 (*Lysine-Specific Demethylase 2*), impliquée dans la déméthylation du site H3K4 (Nagaoka et al., 2015). Le KD-LSD2 entraîne une accumulation d'acides gras dans les cellules hépatiques, ce qui est contradictoire avec les observations faites chez *C. Elegans*. Cependant, dans des hépatocytes primaires murins, l'accumulation hépatique de lipides altère la méthylation des sites H3K4 et H3K9 sur le gène codant PPARα, ce qui suggère une perturbation du métabolisme lipidique hépatique (Jun et al., 2012).

Les sirtuines sont des protéines ayant une activité de déacétylation. Elles sont impliquées dans le métabolisme des lipides car activent notamment les voies LXR (via la déacétylation de K432) et PPAR, et inhibent la voie SREBP1 (Fiorino et al., 2014). A l'inverse, la voie PPARγ est stimulée dans le foie de souris KO pour la protéine déacétylase Hdac3 (Knutson et al., 2008). L'inhibition des HDACs dans des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse stimule l'expression d'Abcg1 et Abca1, et protège les cellules de l'apoptose. Plus précisément, l'inhibition d'Hdac3 atténue les propriétés athérogènes des macrophages, notamment en diminuant la sécrétion d'Il-6 et de NO (Van den Bossche et al., 2014). La sirtuine

SIRT1 coopère avec l'histone déméthylase JMJD3 et le facteur de transcription PPARα pourréguler l'expression de gènes de la β-oxydation mitochondriale : la délétion de JMJD3 dans le foie entraîne une intolérance au glucose et une baisse de la sensibilité à l'insuline (Seok et al., 2018).

De plus, il faut noter que le métabolisme lipidique peut lui aussi moduler le niveau d'acétylation des lysines des histones : chez la souris C57Bl/6, le régime riche en graisse induit une diminution significative de l'acétylation de la lysine H3K23, ainsi qu'une baisse du ratio acetyl-coA/coA dans le pancréas et le tissu adipeux blanc (Carrer et al., 2017). Dans ce dernier, la quantité d'acetyl-coA est directement corrélée au niveau d'acétylation des histones.

La complexité du code des histones rend délicates les conclusions quant au rôle des modifications sur le métabolisme cellulaire, et des lipides plus précisément. Ces derniers peuvent eux-mêmes interférer sur de nombreuses fonction cellulaires via une modulation du code des histones (Fan et al., 2015; Keating and El-Osta, 2015; McDonnell et al., 2016).

3. La méthylation de l'ADN et les lipoprotéines HDL

a. Méthylation et déméthylation de l'ADN : principes

i. Mécanismes moléculaires de méthylation de l'ADN

Sur l'ADN, les marques de méthylation sont portées par les résidus cytosine, sur le 5ème carbone du cycle pyrimidine de la base (^{5}mC). Elles sont présentes sur les cytosines suivies d'une guanine dans la séquence codante : on parle de site CpG. Chez les mammifères, la méthylation sur un site CpX (où X = A adénosine, T thymidine ou C) peut correspondre à environ 20% de la méthylation globale (Barrès et al., 2009; Yan et al., 2011a). Chez l'Homme, environ 60 à 80% des sites CpG sont méthylés dans les cellules somatiques. Des marques de méthylation peuvent également être retrouvées dans les ovocytes, les cellules pluripotentes embryonnaires, ou les neurones. Certaines régions du génome sont très denses en sites CpG : ce sont les îlots CpG, séquences longues de 1 kilobase en moyenne (Moore et al., 2013b; Wu and Zhang, 2014).

Il est parfaitement établi que la méthylation de l'ADN est un modulateur épigénétique majeur de l'activité génique. Les DNMTs (*DNA methyltransferases*) catalysent le transfert d'un groupement méthyl à partir de donneurs de méthyls, les SAM, (*S-adenyl methionine*) sur la cytosine. Il existe différentes DNMTs. Les enzymes DNMT3a et DNMT3b sont responsables de la méthylation *de novo* : elles ajoutent un groupement méthyl sur une cytosine non modifiée

auparavant (Okano et al., 1999). DNMT1 est au contraire primordiale pour la transmission de la marque de méthylation : au moment de la réplication de l'ADN, elle copie la marque du brin mère au brin fille (figure 14) (Bostick et al., 2007). DNMT1 agit en collaboration avec la protéine UHRF1 (*Ubiquitin-like plant Homeodomain and RING Finger domain 1*), qui reconnaît préférentiellement les sites CpG hémi-méthylés. L'expression des DNMTs est réduite suite à la mitose, suggérant un maintien spontané de la méthylation à l'état post-mitotique des cellules (sauf dans les neurones, où leur expression peut subsister).

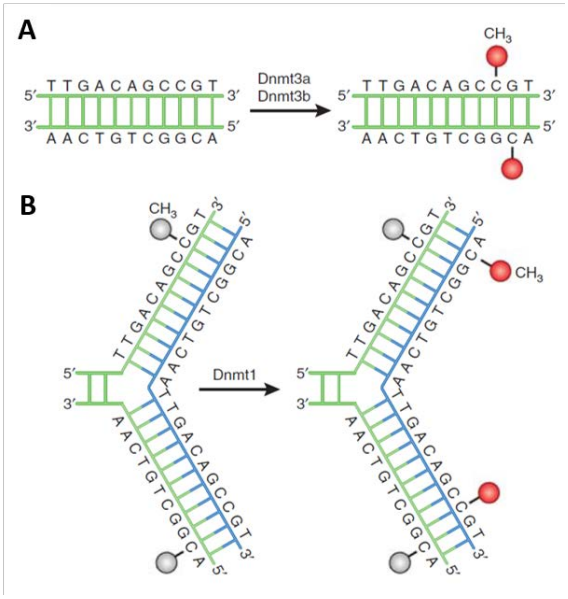


Figure 14 : Rôle des DNA méthyltransférases dans la méthylation de l'ADN.
***A**, Méthylation de novo par DNMT3 a et b. **B**, Transmission de la méthylatino par DNMT1. (Moore et al., 2013b)*

La méthylation de l'ADN génomique est généralement un marqueur de répression de la transcription des gènes. En effet, les marques de méthylation peuvent empêcher la fixation de certains facteurs de transcription, ou recruter des protéines de liaison aux groupements méthyls des cytosines (MBPs, *MethylBinding Proteins*), favorisant ainsi la répression des gènes (figure 15).

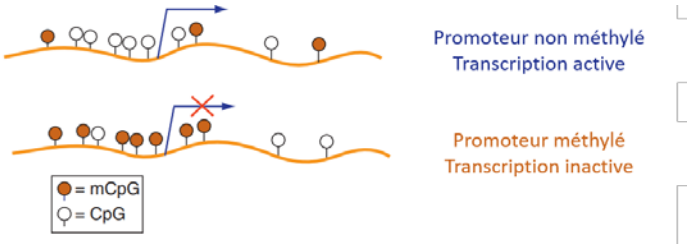


Figure 15 : Impact de la méthylation sur la transcription des gènes.
(Kulis and Esteller, 2010)

ii. Mécanismes moléculaires de déméthylation de l'ADN

Cependant, dans certaines conditions comme l'embryogenèse, il est nécessaire que l'ADN des cellules soit largement déméthylé pour favoriser leur état pluripotent (Wu and Zhang, 2014). Concernant le zygote paternel, la déméthylation survient juste après la fécondation, et concerne tout le génome sauf les gènes soumis à empreinte, les zones proches des centromères ou encore les éléments répétés. La déméthylation se fait passivement dans la cellule germinale maternelle, pendant les cycles de division menant au stade blastocyste de l'embryogenèse. La déméthylation doit être transitoire : des souris portant un allèle KO pour DNMT3a ou DNMT3b ont été développées, et ces mutations sont létales, elles empêchent le développement embryonnaire (Okano et al., 1999).

Il existe aujourd'hui deux modes de déméthylation connus. Tout d'abord, au cours des cycles de réplication de l'ADN, une perte passive de méthylation peut avoir lieu, due à une absence de fonctionnalité du duo protéique DNMT1/UHRF1. De plus, la découverte du mécanisme d'action des protéines TET (Ten-Eleven Translocation) a apporté des informations sur les mécanismes actifs de déméthylation. Les protéines TET peuvent générer, à partir d'une ^{5}mC, une 5- hydroxyméthylcytosine (^{5}hmC), 5-formylcytosine (^{5}fC) and 5-carboxylcytosine (^{5}caC). De telles modifications sur les cytosines peuvent entraîner une perte passive de la méthylation, ou une activation de la protéine TDG (*Thymine-DNA Glycosylase*), qui « répare » la cytosine concernée : celle-ci est alors déméthylée (Ficz, 2015).

b. Méthylation de l'ADN : causes et conséquences

i. Facteurs modulateurs de la méthylation de l'ADN

De nombreux facteurs environnementaux, liés au statut social et au mode de vie, influe sur les niveaux de méthylations (Kader and Ghai, 2017). L'environnement prénatal est un facteur primordial. La méthylation de l'ADN s'instaure pendant les premiers stades de développement ; elle fait suite à la déméthylation massive au sein des gamètes. Ainsi, les conditions de vie au moment de la mise en place de la méthylation *de novo* l'influencent fortement. De plus, il est bien établi que les conditions de vie *in utero* et pendant les premiers mois de vie sont primordiaux pour la détermination de la susceptibilité à différentes maladies métaboliques.

❖ Nutrition

L'alimentation, et plus spécifiquement les nutriments, peuvent modifier le profil de méthylation de l'ADN, de façon globale ou localisée (Altmann et al., 2013; Zhang, 2015). Différents acteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN peuvent être modulés par les nutriments. Les SAM, donneurs de méthyl, ont de nombreux précurseurs fournis par l'alimentation, comme le folate, la choline ou la bétaïne. De façon cohérente, chez les rongeurs, réduire les apports en donneurs de méthyl entraîne une hypométhylation (Pogribny et al., 2006; Mehedint et al., 2010). Chez l'Homme, il a été montré de manière cohérente qu'un régime pauvre en folate réduit la méthylation globale de l'ADN chez la femme ménopausée (Jacob et al., 1998). Cependant, les SAM ne sont pas les seuls modulateurs de la méthylation : un régime riche en folate n'est pas systématiquement associé à une hausse de la méthylation (Farias et al., 2015).

Par ailleurs, certains nutriments présents dans l'alimentation peuvent impacter l'expression ou l'activité des DNMTs. Par exemple, le (-)-épigallocatéchine 3-gallate (EGCG), retrouvé dans le thé, ou encore la génistéine, présente dans les fèves et le soja, sont deux polyphénols avec pouvoir antioxydant puissant (Fang et al., 2007). En inhibant l'activité de DNMT1 dans des cellules issues de carcinomes de la peau, l'EGCG diminue la méthylation dans les promoteurs de gènes normalement silencieux impliqués notamment dans l'apoptose tumorale (Kato et al., 2008). Des effets similaires ont été observés au sein de lignées cellulaires cancéreuses mises en présence de génistéine. L'action directe de ces deux composés sur l'activité des DNMTs fait d'eux des acteurs importants de la modulation de la méthylation de l'ADN.

Enfin, les vitamines B_2, B_6 et B_{12} sont des cofacteurs d'enzymes impliquées dans le cycle du folate et sa conversion en SAM. Ainsi, l'abondance de ces vitamines détermine en partie la biodisponibilité des SAM et module ainsi la méthylation de l'ADN.

De nombreuses études ont été menées depuis la fin des années 1990 sur une cohorte d'adultes nés (n=3307) de mères exposées à la famine de l'hiver 1944-1945 aux Pays-Bas (Lumey et al., 2007). La série d'études a montré que les adultes nées de mères malnutries pendant leur grossesse présentent une augmentation du risque d'obésité, de dyslipidémies, de diabète de type 2 et de schizophrénie (Ravelli et al., 1998, 1999; Lumey et al., 2009). Récemment, le même groupe a montré que, pour un échantillon de cette cohorte, les variations de méthylation (mesurée dans le sang total) sur certains gènes peuvent influencer ces

associations entre santé cardio-métabolique et statut nutritionnel *in utero* (Tobi et al., 2015, 2018). Une autre étude a montré que certaines différences de méthylation observées chez les nouveau-nés peuvent être dues au niveau socio-économique des parents au cours de la période prénatale (King et al., 2015).

L'environnement prénatal peut également influer sur les descendants *via* la reprogrammation épigénétique au sein des gamètes mâles, les spermatozoïdes. De nombreux gènes sont différemment méthylés dans le sperme d'individus obèses par rapport à des individus minces. De même, le sperme d'individus obèses a un profil de méthylation largement remanié suite à la perte de poids induite par une chirurgie bariatrique (Donkin et al., 2016). Ce profil remodelé sera donc transmis à la descendance, ce qui montre l'importance des conséquences d'une obésité pour la génération suivante. Chez le rat nourri avec un régime riche en graisse pendant 12 semaines, des modifications épigénétiques telles que des variations de la méthylation de l'ADN ou des signatures transcriptionnelles de miRs sont observées dans les spermatozoïdes, en comparaison avec un régime normal (de Castro Barbosa et al., 2016). Ces modifications sont transmises aux deux générations suivantes, qui présentent des altérations de leurs fonctions métaboliques, notamment leur tolérance au glucose, sont résistantes à la prise de poids induite par le régime riche en graisse.

- Les différences ethniques et sexuelles

García-Calzón a récemment mis en évidence d'importantes différences de méthylation dans le foie humain entre hommes et femmes. Ces différences sont retrouvées sur des gènes présents sur le chromosome X (9455 sites CpG différemment méthylés) mais aussi sur les autosomes (33 205 sites CpG), et sont associés à des profils d'expression génique également différents (García-Calzón et al., 2018). Lorsque l'ensemble du génome est considéré, les hommes ont un niveau de méthylation faiblement supérieur par rapport aux femmes, toutefois significatif (hommes 50,5% *versus* femmes 50,2%, $p = 0,011$). De façon intéressante, le profil est inverse lorsque l'on se focalise sur le chromosome X, où la méthylation est supérieure chez les femmes sur 5 956 sites CpG, alors qu'elle est sur 3 499 sites dans le groupe des hommes.

En 2011, la méthylation globale a été mesurée dans les leucocytes en fonction du genre et de l'ethnie d'origine de la population « *North Texas Healthy Heart Study* » composée 60 femmes et 101 hommes, âgée de 45 à 74 ans (Zhang et al., 2011). Les résultats indiquent une méthylation globale plus importante chez les hommes par rapport aux femmes : 75% de cytosines méthylées contre 73,2% ($p<0,0001$). De même, cette étude montre que des

différences de niveau de méthylation globale existent selon l'appartenance ethnique : les populations blanches présentent un niveau global de méthylation supérieur (75,3%) par rapport aux populations noires (73,1%) et hispaniques (74%).

Les différences de méthylation dues à l'appartenance ethnique sont retrouvées dès la naissance : plus de 13% des sites CpG sont, de manière significative, différemment méthylés entre les nouveau-nés afro-américains et les caucasiens (Adkins et al., 2011). La méthylation a été mesurée dans le sang de cordon ombilical : environ 68% des sites étudiés sont moins méthylés dans la population afro-américaine, par rapport à la population caucasienne. Les gènes dont la méthylation est variable chez les nouveau-nés sont pour beaucoup impliqués dans des voies de signalisation liées aux cancers (prolifération, l'apoptose ou encore la mort cellulaire programmée). Les auteurs suggèrent que des marques ou niveaux de méthylation mesurés dans le sang de cordon puissent en partie expliquer les différences sur le risque de cancers des différentes populations. Ces données sont en accord avec une autre étude menée sur les populations noire (dont l'ADN est globalement le moins méthylé), hispanique et blanche (ADN le plus méthylé) (Terry et al., 2008). Enfin, une étude similaire a montré que le niveau de méthylation sur le gène IGF1 (*Insulin-like Growth Factor*), impliqué dans les croissances fœtale et placentaire, pourrait expliquer le faible poids de naissance des nouveau-nés de mères afro-américaines, en comparaison des mères d'autres origines (Straughen et al., 2015).

Des données comme la méthylation de l'ADN, mesurée sur sang total, pourrait donc faciliter l'évaluation des facteurs de risque pour différentes pathologies, comme le cancer.

- Tabac

Le tabac est un facteur environnemental qui impacte la méthylation de l'ADN de manière relativement localisée. Le gène AHRR (*Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor*) est un suppresseur de tumeur qui favorise la détoxification des agents carcinogènes présents dans le tabac et associés au cancer du poumon. Plusieurs études ont étudié différents sites CpG au sein de ce gène dont le niveau de méthylation est dépendant du statut fumeur/non-fumeur : le niveau de méthylation sur le site CpG cg05575921, retrouvé dans toutes les études, est largement déméthylé chez les fumeurs (Joubert et al., 2012; Zeilinger et al., 2013; Zaghlool et al., 2015). Une étude a plus spécifiquement associé négativement la méthylation sur ce site CpG avec le niveau d'expression du gène AHRR (Monick et al., 2012). Les conclusions sont similaires quelle que soit l'origine ethnique des populations étudiées.

- Age

La grande majorité des études menées indique une perte progressive des niveaux de méthylation avec l'âge des individus (Kader and Ghai, 2017). Ainsi, la méthylation est peu à peu utilisée pour déterminer l'âge d'individus inconnus dans le cadre de la médecine légale.

- Activité physique

L'activité physique est primordiale pour le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de l'organisme. Elle permet au niveau moléculaire, cellulaire et systémique de limiter notamment les problèmes métaboliques (Hawley et al., 2014).

Chez la souris C56/Bl6, l'exercice physique induit une modification de la méthylation sur 3 692 sites CpG. Les auteurs ont également réalisé des analyses transcriptomiques. Parmi les gènes différemment méthylés et exprimés, 200 avaient une expression inversement corrélée à la méthylation, mesurée par RRBS (*Reduce Representation Bisulfite Sequencing*) sur différents sites CpG des gènes. Ces gènes sont pour la plupart impliqués dans la croissance et la différenciation (notamment musculaire), ou encore dans des voies métaboliques (Kanzleiter et al., 2015).

Plusieurs études menées chez l'Homme ont prouvé les bienfaits de l'exercice physique sur les fonctions des muscles squelettiques (Lindholm et al., 2014) et des adipocytes (Rönn et al., 2013), via une modulation de la méthylation. De plus, une étude menée chez des volontaires sains soumis ou non à un programme de trois mois d'exercice physique indique une variation des niveaux de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes (hyperméthylation ou hypométhylation selon les gènes) après exercice (Denham et al., 2015; Ingerslev et al., 2018). Ceci constitue une autre preuve de l'importance de l'environnement prénatal et de son impact sur la méthylation.

ii. Etudes de la méthylation de l'ADN : limites

Il faut cependant considérer que toutes ces études de corrélation évoquent rarement les mécanismes cellulaires pouvant expliquer les relations entre environnement et épigénétique. Les différences génétiques entre groupes ethniques notamment sont largement connues et peuvent impacter la méthylation de l'ADN : les acteurs de la méthylation peuvent être en effet plus ou moins exprimés et/ou recrutés sur le site CpG à méthyler selon les polymorphismes des gènes les codant. Dans ce sens, des études menées chez l'Homme suggèrent une association

entre certains polymorphismes, localisés à proximité ou non de sites CpG, et la méthylation de ces sites CpG (Zhang et al., 2010; Fraser et al., 2012; Lemire et al., 2015).

Il faut également considérer que l'aspect socio-économique semble déterminant dans la modulation de la méthylation. Les facteurs socio-économiques peuvent notamment interférer avec d'autres facteurs comme la nutrition, l'activité physique, la consommation de tabac… L'exposition à la pollution a également été montrée comme élément modulateur de la méthylation (Ferrari et al., 2019), et peut être directement liée au statut économique. Reconnaître l'impact de chaque facteur indépendamment des autres semble délicat tant ils peuvent être interconnectés. Ces aspects sont à prendre en compte lors de l'étude de la méthylation.

Mozhui et ses collaborateurs ont étudié en 2015 les variations de la méthylation chez les nouveau-nés (sang de cordon ombilical) en fonction de différents facteurs, spécifiquement l'appartenance ethnique et la nutrition au cours de la grossesse (Mozhui et al., 2015). Comme dans les études évoquées ci-dessus, l'ADN issu des participants afro-américains est moins méthylé que celui issu des populations caucasiennes. Cependant, il faut noter dans cette étude que le groupe d'origine afro-américaine a des niveaux plus faibles de vitamine D et de folate plasmatiques. Or, le folate est un nutriment essentiel favorisant la méthylation. Il serait donc intéressant de discerner lequel de ces deux facteurs – la nutrition ou l'origine ethnique – impacte le plus les variations de méthylation.

Enfin, pour des raisons évidentes de praticité et d'utilisation de techniques non invasives, la majorité des mesures de méthylation se fait sur des molécules d'ADN isolées de sang total. Or, l'impact des différents tissus, notamment dans le métabolisme des lipides, peut être très variable selon le tissu concerné. Il conviendrait donc de vérifier à quel point les valeurs de niveaux de méthylation obtenues dans le sang total reflètent celles des tissus d'intérêt. Dans ce but, une étude a comparé les niveaux de méthylation sur 187 sites CpG de l'ADN issu du sang, du tissu adipeux, du foie, du muscle, de la rate ou du pancréas. Les niveaux moyens de méthylation corrèlent plus ou moins fortement selon les tissus (par exemple pour le foie et le sang, $r = 0.5$, $p = 2{,}0.10^{-13}$), ce qui confirme que la méthylation mesurée dans le sang ne peut pas toujours servir de biomarqueur de la méthylation des tissus moins accessibles (Wahl et al., 2017). Il a cependant été suggéré que ces différences de méthylation observées entre tissus soient vraies pour certains gènes, mais pas pour d'autres. Pour ces derniers, la méthylation sanguine pourrait être un bon reflet de la méthylation dans tous les tissus. Cela témoigne

d'autant plus de la difficulté d'utiliser la méthylation du sang comme biomarqueur systématique (Dayeh et al., 2016).

iii. Perturbations de la méthylation : conséquences pathologiques

L'ensemble de ces facteurs environnementaux, qu'ils soient modifiables ou non, peuvent en partie expliquer l'apparition de pathologies dues à la méthylation.

- Cancers

Des perturbations dans les profils de méthylation de l'ADN sont observées dans de nombreuses pathologies, notamment dans tous les types de cancer. Des hypométhylations mais aussi des hyperméthylations globales de l'ADN peuvent être des facteurs favorisant l'apparition de cancer (Kulis and Esteller, 2010). La littérature sur l'association entre niveaux de méthylation sur différents gènes et l'incidence de nombreux cancers (carcinomes, cancers de la prostate, du sein, colorectaux…) est extrêmement riche, témoignant de l'importance de ce type de modulation dans ces pathologies (Feinberg et al., 2016; Koch et al., 2018). Pour preuve, des mutations dans les gènes codant TET2 (Delhommeau et al., 2009) et DNMT3a (Yan et al., 2011b), responsables d'altération des niveaux de méthylation, sont retrouvées dans les leucémies.

- Diabète de type 2

La méthylation a également été montrée comme modulée dans d'autres pathologies, comme le diabète. Chez l'Homme, au sein d'îlots pancréatiques isolés, le profil de méthylation est modifié chez des patients atteints de diabète de type 2 par rapport aux individus contrôles (Volkmar et al., 2012). Chez les patients, 276 sites CpG, associés à 254 gènes distincts, voient leur méthylation modifiée : 96% de ces sites CpG sont hypométhylés. Les auteurs évoquent même l'existence d'un profil de méthylation propre au groupe de diabétiques, qui pourrait être utilisé pour les discriminer des individus contrôles. Ce profil est spécifique des cellules pancréatiques et n'est pas retrouvé dans les leucocytes par exemple. Ces résultats sont contradictoires avec d'autres études menées dans des populations diabétiques, où des altérations de la méthylation de l'ADN ont aussi été retrouvées dans le muscle squelettique (Barrès et al., 2009; Barres et al., 2013), le tissu adipeux (Multhaup et al., 2015) ou le foie (Nilsson et al., 2015). Plus précisément, Chambers et coll. a montré que la méthylation dans le sang sur des sites CpG identifiés de plusieurs gènes, notamment *SREBF1* et *ABCG1*, était associée à l'incidence du diabète de type 2 (Chambers et al., 2015).

Il faudrait néanmoins déterminer si ce profil de méthylation est une cause ou une conséquence de l'apparition du diabète. Pour apporter des éléments de réponse à cette question, les auteurs ont mis des îlots pancréatiques sains en culture : après 72h de traitement avec de fortes concentrations de glucose, le profil de méthylation n'est pas altéré (méthylation globale ou testée sur 16 sites CpG spécifiques) (Volkmar et al., 2012). De même, dans des cultures primaires de cellules musculaires humaines, le traitement au glucose pendant 48h n'induit pas de modification de la méthylation. Ces résultats suggèrent que ce profil altéré ne serait pas une conséquence de l'apparition du diabète. En revanche, la méthylation peut être modulée après 48h d'exposition à des acides gras libres ou au TNF, notamment sur le gène *PGC1α* (*PPARγ coactivator-1α*) (Barrès et al., 2009).

- Autres pathologies

La méthylation a été corrélée à l'incidence de plusieurs autres pathologies, comme certaines maladies auto-immunes (Jin and Liu, 2018). Ainsi, les gènes codant le complexe majeur d'histocompatibilité sont différemment méthylés chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et peuvent servir de biomarqueurs de la réponse au traitement. Dans le cas du lupus, certains gènes responsables de la production des auto-anticorps voient leur méthylation diminuée par rapport aux individus contrôles, suggérant une surexpression de ces gènes. Enfin, la sclérose en plaques est également associée à des perturbations de la méthylation de l'ADN des lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Enfin, de nombreuses études associent méthylation de l'ADN et maladies neurologiques. Par exemple, le gène *MECP2* code une protéine qui se lie aux séquences d'ADN via les sites CpG ou CpX méthylés et régule ainsi l'expression des gènes, notamment dans les neurones. Ce gène, fréquemment muté dans des pathologies comme l'autisme ou le syndrome de Rett (maladie rare – 1 cas/10 000 naissances – provoquant un handicap moteur et mental), est proposé comme déterminant dans les modulations de la méthylation de l'ADN, affectant ainsi des gènes responsables de la maturation neuronale. Dans le cas de l'autisme, l'exposition à certains polluants au cours de la vie utérine peut mener à des perturbations du méthylome maintenues au cours de la vie. Des altérations de la méthylation de l'ADN sont associées à la maladie de Parkinson et de manière plus générale, le développement de la schizophrénie a été associé à la méthylation de l'ADN mais aussi la modification des histones ou les miRs.

c. Impacts sur le métabolisme des HDL

Les techniques expérimentales récentes permettent l'étude de la méthylation de l'ADN à grande échelle, celle des populations : on parle d'EWAS (*Epigenome-Wide Association Studies*). Au cours de la dernière décennie, plusieurs études EWAS clés ont été menées pour analyser l'association entre variations des niveaux de méthylation de l'ADN des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et concentrations plasmatiques de ceux-ci. Nous allons nous intéresser ci-après aux études menées chez l'Homme, qui ont fait état de l'impact de la méthylation de l'ADN sur les concentrations plasmatiques de HDL-C. Dans certains cas, les conséquences sur les désordres métaboliques ou encore sur le risque cardiovasculaire ont été mesurées.

Les travaux de Simon-Pierre Guay sont les premiers à rechercher des liens entre régulation épigénétique des gènes du métabolisme des lipides et leur concentration plasmatique. Dans une population de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, tous porteurs de la même mutation W66G sur le rs121908025 du gène *LDL-R*, la méthylation de certains sites CpG sélectionnés car localisés spécifiquement dans des gènes codant des protéines du métabolisme lipidique a été explorée. Dans cette population, les niveaux de méthylation dans le gène *ABCA1* (8 sites CpG) sont négativement corrélés aux concentrations de HDL-C ($r = -0.20$; $p = 0.05$), mais également aux niveaux de phospholipides associés aux HDL_2 circulantes ($r = -0.43$; $p = 0.04$) (Guay et al., 2012). De plus, chez ces patients, la méthylation des gènes *CETP* (6 sites CpG) et *LPL* (4 sites) est un puissant marqueur des concentrations plasmatiques de HDL-C mais aussi de LDL-C, indépendamment des mutations au sein du gène *LPL* (Guay et al., 2013). Il semble toutefois que ces effets soient plus marqués chez les hommes que chez les femmes, pour lesquelles aucune corrélation entre méthylation dans le gène *CETP* et concentrations de HDL-C n'a été montrée. Cependant, les niveaux de méthylation n'ont été associés ni aux niveaux d'expression (quantification des ARNm) ni, dans le cas de la CETP, à l'activité plasmatique. Enfin, la méthylation d'autres gènes du métabolisme des lipides a été explorée par cette même équipe : certaines variations des niveaux de méthylation dans les gènes *LIPC* et *PLTP* sont associées à des modulations des lipides plasmatiques, notamment des concentrations de HDL-C (Guay et al., 2014).

Plusieurs autres études menées plus récemment dans différentes cohortes ont montré les mêmes corrélations négatives entre la méthylation du site cp06500161 du gène *ABCG1* et les concentrations plasmatiques de HDL-C (tableau) (Pfeiffer et al., 2015; Braun et al., 2017; Hedman et al., 2017). De façon intéressante, la méthylation de ce site CpG est

systématiquement corrélée positivement aux concentrations de TG plasmatiques. La méthylation du site cg11024682, au sein du gène *SREBF1*, est similairement corrélée aux concentrations de HDL-C (et symétriquement à celles de TG). Ces résultats sont cohérents avec les travaux de notre laboratoire qui proposent ABCG1 comme modulateur de l'activité de la LPL (Olivier et al., 2012). La méthylation du site cg17901584 est à l'inverse positivement associée aux concentrations de HDL-C circulantes et négativement à celle de TG (Braun et al., 2017; Hedman et al., 2017). Ce site est localisé dans le gène codant la réductase 24-déhydrocholestérol (*DHCR24*), impliquée dans la biosynthèse du cholestérol.

Petersen et ses collaborateurs ont étudié certaines classes de lipides plus précisément et se sont intéressés aux phospholipides et aux sphingomyélines. Ils ont ainsi montré que la méthylation du site cg06500161 du gène *ABCG1* est inversement corrélée à la quantité de SM (C16 :0) plasmatiques (tableau) (Petersen et al., 2014). Ces travaux sont cohérents avec l'étude de Kobayashi et ses collaborateurs sur le rôle d'ABCG1 dans l'efflux de SM (Kobayashi et al., 2006). De même, la quantité de PC 36 :5 est positivement associée à la méthylation du gène DHCR24, sur le site cg17901584.

L'ensemble des gènes du métabolisme des lipides dont la méthylation de différents sites CpG a été étudiée, ainsi que les études correspondantes, sont répertoriées dans le tableau 5 ci-après.

Tableau 5 : Impact de la modulation de la méthylation des gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique sur le métabolisme des HDL

ABCA1 : ATP-binding cassette A1, ABCG1 : ATP-binding cassette G1, CETP : protéine de transfert des esters de cholestérol, DHCR24 : 24-déhydrocholestérol réductase, LIPC : lipase hépatique, LPL : lipoprotéine lipase, PLTP : protéine de transfert des phospholipides, SREBF1 : sterol regulatory element binding transcription factor 1, FH : hypercholestérolémie familiale, KORA : cooperative health research in the region of Augsburg, InCHIANTI : aging in the chianti area, FHS : Framingham heart study, PIVUS : prospective investigation of the vasculature in Uppsala seniors, SM : sphingomyéline, HDL : high density lipoprotein, PC : phosphatidylcholine, NP : non précisé.

Gène	Site CpG	Position	Cohorte	n	Critère métabolique	Direction	p-value	Référence
ABCA1	8 sites différents (NP)	*NP*	Patients FH (Canada)	97	HDL-C	-	0,05	(Guay et al., 2012)
					HDL_2-PL	-	0,04	
ABCG1	cg06500161	43 656 587	KORA 4	1781	SM c16:0	-	$1,04.10^{-14}$	(Petersen et al., 2014)
			KORA 3, KORA 4, inCHIANTI	2747	HDL-C	-	$9,00.10^{-11}$	(Pfeiffer et al., 2015)
			Rotterdam discovery / replication	725 / 760		-	$9,5.10^{-23}$	(Braun et al., 2017)
			FHS and PIVUS	2306		-	$1,2.10^{-34}$	(Hedman et al., 2017)
	cg27243685		FHS and PIVUS	2306	HDL-C	-	$9,34.10^{-19}$	(Hedman et al., 2017)
CETP	CpG A2	NP	Patients FH (Canada)	97	HDL-C	-	0,006	(Guay et al., 2013)
DHCR24	cg17901584	55 353 706	KORA 4	1780	PC 36:5	+	$3,65.10^{-18}$	(Petersen et al., 2014)
			Rotterdam discovery / replication	725 / 760	HDL-C	+	$2,4.10^{-9}$	(Braun et al., 2017)
			FHS and PIVUS	2306			$5,47.10^{-43}$	(Hedman et al., 2017)
LIPC	CpG A2	NP	Patients FH (Canada)	97	HDL-C	-	0,03	(Guay et al., 2014)
LPL	CpG A3	NP	Patients FH (Canada)	97	HDL-C	+	0,031	(Guay et al., 2013)
PLTP	9 sites différents (NP)	NP	Patients FH (Canada)	97	HDL-C	-	0,05	(Guay et al., 2014)
SREBF1	cg11024682	17 730 094	FHS and PIVUS	2306	HDL-C	-	$4,19.10^{-19}$	(Hedman et al., 2017)

Ces études indiquent que la modulation de la méthylation dans certains gènes clés, voire certains sites CpG clés, peut être primordiale pour la détermination des concentrations plasmatiques de lipides, et de HDL-C notamment. Cependant, parmi toutes ces études, seule celle d'Åsa Hedman a montré que méthylation et expression étaient inversement corrélées (Hedman et al., 2017). Ces données d'expression devraient être prises en compte dans les futures analyses, la méthylation des sites CpG d'un gène donné n'étant pas systématiquement associée à une répression de son expression.

Par ailleurs, d'autres études ont montré un lien entre méthylation de l'ADN et lipoprotéines HDL. Il a ainsi été montré que des variations de la méthylation dans certains sites CpG précis sont associés à la fonctionnalité des particules HDL, mesurée par leur capacité d'efflux de cholestérol et l'index anti-inflammatoire (évalué par mesure des propriétés anti-oxydative des HDL) dans une population d'individus tout-venants (Sayols-Baixeras et al., 2017). La méthylation des sites CpG cg04837231 (du gène *PER3, Period Circadian Clock 3*), cg01964852 (*HOXA3, Homebox A3*), cg22812457 (*PEX5, Peroxisomal Biogenesis Factor 5*), cg08876518 et cg03212183 (*CMIP, c-Maf–Inducing Protein*) est inversement associée à la capacité d'efflux de cholestérol des HDL. De même, la méthylation du site cg25671376 (*GABRR1, γ-Aminobutyric Acid–Type A Receptor, Rho1 subunit*) est positivement corrélée à l'index anti-inflammatoire des HDL. Ces associations sont maintenues après ajustement sur les concentrations plasmatiques de HDL-C. De manière intéressante, des variants génétiques dans les gènes PER3, PEX5 et GRABB1 ont été associés à la maladie coronaire dans la cohorte CARDIoGRAMplusC4D (*Coronary ARtery DIsease Genome wide Replication and Meta-analysis (CARDIoGRAM) plus The Coronary Artery Disease (C4D)*). Ces données suggèrent que l'implication de ces gènes dans la pathologie coronaire pourrait être en partie médiée par la fonctionnalité des HDL (Sayols-Baixeras et al., 2017). Dans ce sens, Hedman et coll. montrent que la méthylation sur le site cg27243685 du gène ABCG1 (tableau), associée à une baisse d'expression, est corrélée positivement à l'apparition d'une pathologie coronaire. De manière intéressante, les auteurs ont identifié un SNP dans le gène ABCG1, lui-même associé au niveau de méthylation sur le site cg27243685 ($p=7,29.10^{-11}$). Cette étude établit un lien direct entre polymorphisme, méthylation, expression génique et concentrations plasmatiques de HDL-C dans un contexte de pathologie cardiovasculaire.

Il faut considérer le fait que ces études sont toutes associatives, et non causales. Dans ce contexte, certaines études discutent des différentes influences de la méthylation de l'ADN sur les lipides plasmatiques, et vice versa. Par exemple, Dekkers et coll. ont développé un outil d'analyse statistique de randomisation mendélienne prenant en compte les facteurs confondants,

basé sur le score polygénique (Dekkers et al., 2016). Le score polygénique est calculé, pour une pathologie ou un critère biologique donné, à partir des variations alléliques d'un ou plusieurs gènes. Dans les six cohortes (n_{total} = 3 296 individus) inclues dans l'étude, la méthylation de l'ADN est mesurée dans le sang total, et la méthylation sur 4 sites CpG est associée aux concentrations plasmatiques de HDL-C. Leur outil permet de conclure que de faibles concentrations de TG, ou de fortes concentrations de HDL-C entraînent une diminution de la méthylation sur les sites CpG cg06500161 et cg27243685, localisés dans le gène *ABCG1*. Ils ont également vérifié que la méthylation sur ces 2 sites était inversement corrélée à l'expression d'ABCG1.

Trouver des moyens de déterminer les influences de chacun des facteurs étudiés les uns sur les autres semble donc important pour les futures méta-analyses de méthylation de l'ADN et de leurs associations avec les lipides circulants, notamment le HDL-C.

4. Collaboration des systèmes de régulation épigénétique

Les avancées dans les techniques d'analyse « omiques » ont mis en lumière de puissantes régulations épigénétiques des gènes. Nous venons en effet de voir que la régulation par les miRs ou par des modulations de la méthylation de l'ADN peuvent avoir des conséquences sur le métabolisme des lipoprotéines HDL, notamment leur concentration plasmatique. Certaines études récentes se sont interrogées sur la coopération entre ces différents mécanismes de régulation.

a. Coopération entre méthylation et modifications des histones

Lors de leur fixation sur les marques de méthylation, les protéines MBPs recrutent des éléments répresseurs en modifiant les histones notamment. Par exemple, DNMT1 et DNMT3a peuvent se lier à la protéine SUV39H1, méthyltransférase qui méthyle le site H3K9 (lysine 9 sur l'histone 3) et réduit l'expression de son gène cible (Fuks et al., 2003a). MeCP2, une MBP, joue un rôle clé dans ce mécanisme (Fuks et al., 2003b). Dnmt1 peut aussi recruter des histones déacétylases *via* la fixation avec la protéine MeCP2, qui favorisent la compaction de l'ADN et limitent sa transcription (Jones et al., 1998; Fuks et al., 2000). De manière générale, les DNMTs coopèrent avec les enzymes modificatrices des histones pour imposer ou non un état répressif sur une région du génome.

Les modifications des histones peuvent à leur tour influencer les profils de méthylation de l'ADN : la triméthylation du site H3K4 limite la fixation des DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L (méthylation de novo responsable de l'empreinte maternelle) et réduit ainsi la méthylation (Ooi et al., 2007).

Ces études montrent que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones coopèrent pour réguler l'expression des gènes.

b. Coopération avec les miRs

Comme toutes les séquences d'ADN du génome, celles codant les miRs sont sujettes à la méthylation, qui régule donc leur expression. Les études sur la coopération entre ces deux mécanismes sont très majoritairement menées dans des modèles de cellules cancéreuses (Konno et al., 2019) ou chez des patients atteints de cancer (Shivakumar et al., 2017; Oltra et al., 2018). Dans une lignée de cellules du cancer du côlon, le double KO des gènes DNMT1 et DNMT3b entraîne une altération d'environ 10% de l'expression globale des miRs : parmi les 135 miRs dont l'expression a été détectée, celle-ci était modifiée pour 13 d'entre eux (7 miRs surexprimés versus 6 sous-exprimés) (Han et al., 2007). Ces études constituent des preuves que les marques de méthylation peuvent altérer l'expression du ou des miR(s) concerné(s), probablement *via* une modulation son expression (figure 16 A et B).

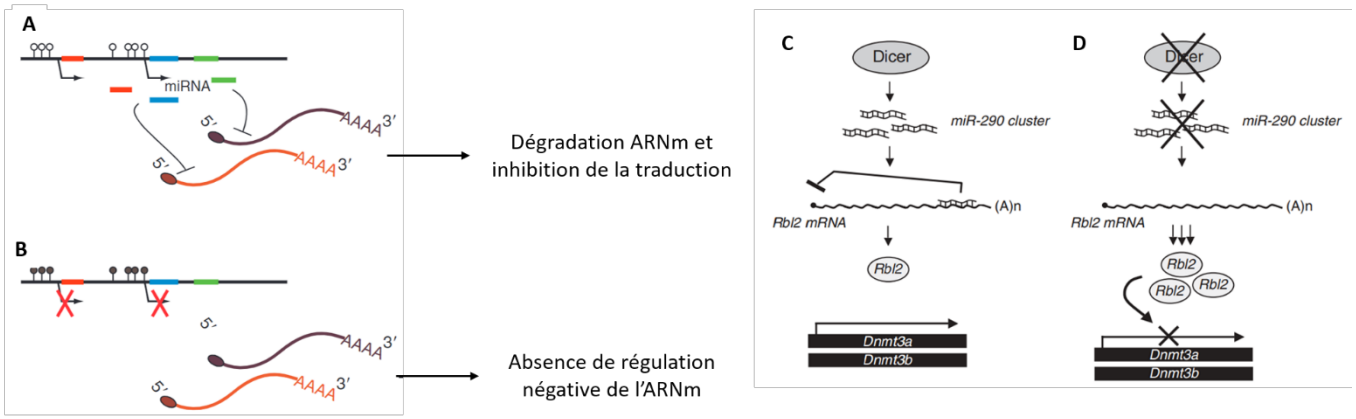


Figure 16 : Régulation de l'expression des miRs par la méthylation de l'ADN.
A*, Les régions de l'ADN codant les miRs ne sont pas méthylées : les miRs sont exprimés et leurs ARNm cibles sont dégradés, ou leur traduction est inhibée.* ***B****, L'expression des miRs est inhibée par la méthylation de l'ADN : les gènes cibles ne sont plus inhibés. (Kulis and Esteller, 2010). C, Dicer permet la maturation de miR290, qui réprime l'expression de Rbl2 et favorise celle des DNMTs. D, En l'absence de Dicer, l'inhibition de miR290 réprime les gènes DNMTs. (Benetti et al., 2008)*

La régulation inverse de la méthylation de l'ADN par les miRs est également vraie : le KO du gène Dicer (impliqué dans la maturation du miR) dans des cellules souches embryonnaires de souris provoque une réduction de l'expression du miR-290, des DMNT1, 3a et 3b, mais aussi des niveaux de méthylation de l'ADN. La protéine Rbl2 (retinoblastoma-like 2 protein) semble être impliquée dans l'expression des méthyltransférases de l'ADN en tant que protéine régulatrice (Benetti et al., 2008). Ainsi, miR-290, via le contrôle de l'expression de Rbl2, régule celles des DNMTs (figure 16C et D).

c. Les facteurs de transcription

Au-delà des régulateurs épigénétiques, les facteurs de transcription sont les acteurs majeurs de la modulation de l'expression du génome. Leur activité doit être la plus précise possible pour permettre une expression ou une inhibition de leur(s) gène(s) cible(s) correcte selon le stade cellulaire et le tissu ou le type cellulaire concerné. Elle est donc finement régulée par l'épigénétique. Le code des histones et le niveau de méthylation des sites CpG de l'ADN impactent fortement la compaction de la chromatine, régulant ainsi son accessibilité aux facteurs de transcription et à leurs partenaires. Par exemple, les HATs et HDACs peuvent faire partie des complexes protéiques constitués autour des facteurs transcriptionnels.

Il est classiquement accepté que l'accessibilité des facteurs de transcription (*Transcription Factor*, FT) à l'ADN dépend de la méthylation de celui-ci : l'interaction entre les FTs et l'ADN se fait généralement sur des régions non méthylées, où la chromatine est ouverte. Au contraire, de hauts niveaux de méthylation sont généralement synonymes de faible accès aux FTs. Cependant, il existe des protéines possédant des domaines MBDs (*Methyl-Binding Domains*), permettant la liaison aux sites méthylés (Yin et al., 2017). Les FTs sont nombreux à posséder des domaines MBDs : une base de données développée récemment recense 731 FTs humains et murins capables de se lier aux séquences méthylées de l'ADN (http://medreader.org) (Wang et al., 2018). Une étude précise que la séquence d'ADN a également son importance : certains FTs se lient à l'ADN en fonction de la méthylation mais aussi en fonction de la position de la cytosine méthylée au sein de la séquence liant le FT (Kribelbauer et al., 2017).

Pour ce qui est de la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines HDL, les travaux d'Hedman et ses collaborateurs fournissent des hypothèses quant à ce genre de coopération. En effet, son étude montre que les niveaux de méthylation du gène *GATAD2B* (*GATA zing finger Domain containing 2B*) sont négativement associés aux concentrations plasmatiques de HDL-C ($p = 3.81.10^{-8}$) (Hedman et al., 2017). GATAD2B est un facteur de transcription. Il fait partie du complexe protéique MeCP1, impliqué dans la répression transcriptionnelle, notamment via l'action de HDACs qui appartiennent également au complexe.

NFκBIε (*NFκB Inhibitor ε*) est capable de maintenir le facteur de transcription NFκB (*Nuclear Factor-κ B*) dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'agir sur la transcription des gènes. Hedman et coll. mettent également en évidence une association positive entre les niveaux de méthylation du gène NFκBIε et les concentrations de HDL-C circulantes.

Enfin, ces concentrations sont directement associées négativement à la méthylation du gène *KLF13*. Ce facteur de transcription contient trois domaines de liaison à l'ADN en doigts de zinc (de type C_2H_2), et est fortement impliqué dans la régulation de la transcription.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

L'athérosclérose est un déterminant majeur du risque cardiovasculaire. Son développement est notamment intrinsèquement lié au métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Plus particulièrement, les lipoprotéines HDL possèdent des fonctions athéroprotectrices importantes : elles peuvent agir à différents niveaux cellulaires et plasmatiques pour réduire la progression de la plaque d'athérome.

Le transporteur ATP-Binding Cassette G1 (ABCG1) participe au maintien de l'homéostasie lipidique : il est en effet capable de réaliser de l'efflux de lipides vers les lipoprotéines HDL. Cependant, son rôle dans les maladies cardiovasculaires reste difficile à établir, tant les études menées montrent des résultats contradictoires. Le contexte cellulaire et plasmatique semble important dans la détermination des fonctions d'ABCG1. Par ailleurs, de nombreux autres acteurs protéiques potentialisent ou non les fonctions des HDL (protéine de transfert des esters de cholestérol, CETP, protéine de transfert des phospholipides, PLTP, ATP-Binding Cassette A1…). Les statines, premières thérapies développées, restent aujourd'hui très utilisées car elles sont efficaces pour diminuer le risque cardiovasculaire, malgré un risque résiduel non négligeable. Aucune autre thérapie ayant montré une efficacité chez l'intégralité des patients à haut risque cardiovasculaire n'est, à l'heure actuelle, disponible sur le marché.

Mon travail de thèse s'est porté sur l'identification de nouveaux acteurs permettant une régulation de l'homéostasie des lipoprotéines HDL, dans le but de permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et favoriser le développement de thérapies efficaces sur le risque cardiovasculaire. Deux travaux de recherche ont été menés en parallèle. Le premier s'intéresse au rôle d'ABCG1 dans la modulation du phospholipidome des HDL, et son impact sur leurs fonctions athéroprotectrices. La seconde étude a permis d'identifier un nouveau facteur de transcription, qui semble jouer un rôle clé dans la régulation épigénétique (*via* la modulation de la méthylation de l'ADN) de protéines impliquées dans le métabolisme des lilpides.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Etude n°1

Remodeling of the HDL phospholipidome by ABCG1 contributes to its atheroprotective properties

Lise M. Hardy, Marie Lhomme, Lucie Poupel, Isabelle Guillas, Maharajah Ponnaiah, Eric Frisdal, Maryline Olivier, Petra El-Khoury, Elise F. Villard, Jean-François Franetich, Hervé Durand, Yuri V. Bobryshev, Philippe Lesnik, Emmanuel L. Gautier, Thierry Huby, Wendy Jessup, Alain Carrié, Eric Bruckert, Maryse Guérin, Anatol Kontush and Wilfried Le Goff

Soumis pour publication

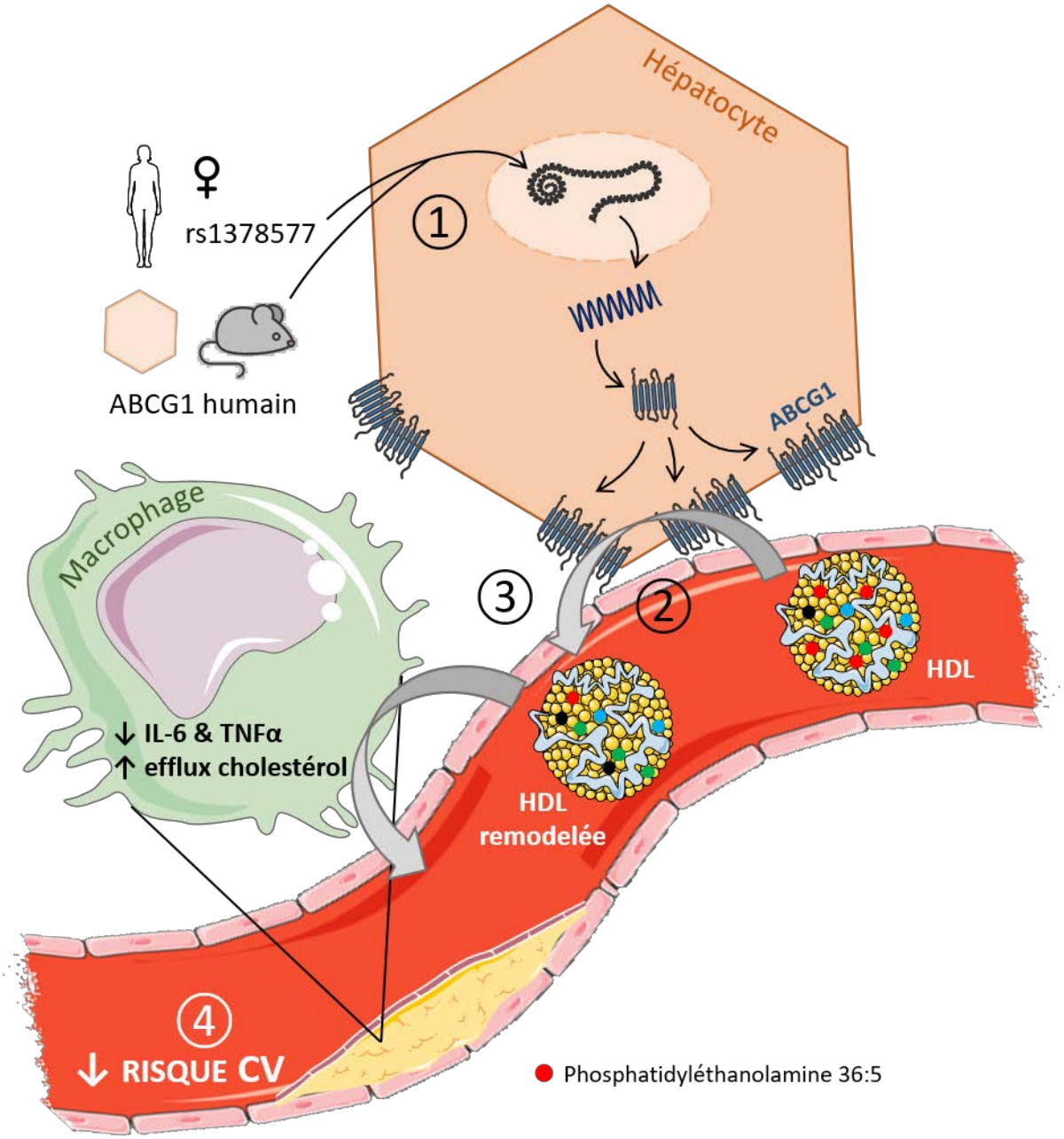


Schéma bilan 1

① L'expression d'ABCG1 est stimulée chez l'Homme (rs1378577 T>G), in vitro et in vivo dans l'hépatocyte. ② Dans l'hépatocyte, ABCG1 entraîne un remodelage du phospholipidome des lipoprotéines HDL, en déplétant notamment PE (36:5). ③ Les HDL remodelées possèdent de meilleures activités anti-inflammatoires, et voient leur capacité à faire de l'efflux de cholestérol depuis les macrophages augmentée. ④ En conséquence, le risque CV associé à l'athérosclérose est diminué.

REMODELING OF THE HDL PHOSPHOLIPIDOME BY ABCG1 CONTRIBUTES TO ITS ATHEROPROTECTIVE PROPERTIES

Lise M. Hardy[1], Marie Lhomme[2], Lucie Poupel[1], Isabelle Guillas[1], Maharajah Ponnaiah[2], Eric Frisdal[1], Maryline Olivier[1], Petra El Khoury[1*], Elise F. Villard[1], Jean-François Franetich[3], Hervé Durand[1], Yuri V. Bobryshev[1], Philippe Lesnik[1], Emmanuel L. Gautier[1], Thierry Huby[1], Wendy Jessup[4], Alain Carrié[1,5], Eric Bruckert[1,5], Maryse Guerin[1], Anatol Kontush[1] and Wilfried Le Goff[1].

Affiliations

[1]Sorbonne Université, Inserm, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), UMR_S1166, Hôpital de la Pitié, Paris, F-75013, France

[2]ICANalytics lipidomic, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France

[3]Sorbonne Université, Inserm, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), UMRS_1135, Hôpital de la Pitié, Paris, F-75013, France

[4]Atherosclerosis Group, ANZAC Research Institute, University of Sydney, Australia.

[5]AP-HP Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière, Paris, France

*Current address : Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics, Faculty of Pharmacy, Pôle Technologie- Santé, Saint Joseph University, Beirut, Lebanon; INSERM LVTS U1148, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

Corresponding author

Wilfried Le Goff, PhD.

INSERM UMR_S1166

Faculté de médecine Sorbonne Université

91, boulevard de l'Hôpital

75013 Paris

France

Email : wilfried.le_goff@sorbonne-universite.fr

Words : 8345

Subject codes

Lipids and cholesterol, metabolism, Atherosclerosis, Cardiovascular Diseases

Short title

Modulation of HDL phospholipidome by ABCG1

Abstract.

Rationale. Circulating concentrations of cholesterol associated with high-density lipoproteins (HDL) are negatively correlated with atherosclerotic cardiovascular diseases. The capacity of HDL to promote macrophage cholesterol efflux is considered to underlie the atheroprotective function of HDL. Phospholipidome of HDL is a critical determinant of their function, however mechanisms controlling both HDL phospholipidome and function are unknown.

Objective. To determine if the ATP-binding cassette G1 (ABCG1) transporter could modulate atheroprotective functions of HDL through the remodeling of their phospholipidome.

Methods and Results. *In vitro* remodeling of HDL2 by ABCG1 led to an enhancement of its anti-inflammatory property and capacity to promote cholesterol efflux in primary human macrophages. Immunodetection of ABCG1 in human liver biopsies revealed that ABCG1 is highly expressed in hepatocytes and ABCG1 knockdown (KD) in primary human hepatocytes (PHH) significantly decreased cholesterol efflux to HDL (-26%, $p<0.0005$). Transient hepatic expression of human ABCG1 in complementary mouse models induced a modification of the phosphosphingolipidome of HDL and enhanced its capacity to promote human THP-1 macrophage cholesterol efflux (+38%, $p<0.05$). Analysis of a frequent polymorphism of the *ABCG1* gene (rs1378577, T/G) in normolipidemic women confirmed the ABCG1-mediated remodeling of the HDL phosphosphingolipidome together with the impact on human THP-1 macrophage cholesterol efflux (TT>GG, +31%, $p<0.005$). In addition, analysis of the phosphosphingolipidome of human HDL2 following incubation with control or ABCG1 KD PHH indicated that the ABCG1-remodeling of PL in HDL2 mainly occurs at the hepatic level. Finally, the abundance of PE 36:5 in HDL2, which was reduced by ABCG1, was strongly correlated with carotid and femoral intima-media thickness ($r=0.61$, $p=0.03$ and $r=0.82$, $p=0.001$, respectively) in women.

Conclusions. We uncovered a mechanism under the control of ABCG1 that modifies the phospholipidome of HDL and enhances its atheroprotective function. Such an ABCG1-remodeling of HDL might protect from atherosclerosis in women.

Abbreviations.

ABCG1 : ATP-Binding Cassette G1

Apo : Apolipoprotein

ASCVD : Atherosclerotic cardiovascular diseases

CCA : Common carotid artery

Cer : Ceramide

CETP : Cholesteryl ester transfer protein

CFA : Common femoral artery

HDL : High-density lipoproteins

HMDM : Human monocyte-derived macrophages

KC : Kupffer cells

KD : Knockdown

LPC : Lysophosphatidylcholine

LPE : Lysophosphatidylethanolamine

PA : Phosphatidic acid

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidylethanolamine

PG : Phosphatidylglycerol

PHH : Primary human hepatocyte

PI : Phosphatidylinositol

PL : Phospholipid

pPE : plasmalogen PE

PS : Phosphatidylserine

RNAi : RNA interference

SM : Sphingomyelin

TC : Total cholesterol

TG : Triglyceride

Introduction.

Atherosclerotic Cardiovascular Diseases (ASCVD) are the leading cause of morbidity and mortality in Western countries. It is well established that circulating concentrations of cholesterol associated with high-density lipoproteins (HDL-C) are negatively correlated with ASCVD incidence, rending HDL-C a key component for predicting cardiovascular risk[1–3]. Multiple biological activities are displayed by HDL including cellular cholesterol efflux, antioxidative, anti-inflammatory, anti-infectious and vasodilatory activities[4]. Among them, HDL capacity to promote cholesterol efflux from macrophages in the early step of reverse cholesterol transport, a process through which cholesterol returns to the liver for biliary secretion, is proposed to underlie the association between HDL-C and ASCVD. Indeed, the capacity of HDL to promote macrophage cholesterol efflux is inversely associated with atherosclerosis development[5], incident CV events[6] and mortality in patients with myocardial infarction[7] independently of HDL-C levels. Those studies paved the way to the notion that HDL functionality could represent a better indicator of ASCVD risk than HDL-C levels[8].

Structure (size and shape) and composition (lipid and protein content) of HDL particles are highly heterogeneous[4,9], with such a heterogeneity being intimately linked to their biological functions[10]. By contributing up to 30% of total lipid mass, phospholipids (PL) are the predominant lipid class composing HDL particles; we previously reported that the HDL phospholipidome is an important modulator of atheroprotective property of HDL[11,12]. Alterations of both the phospholipidome and biological functions of HDL are detected in ASCVD patients suggesting that the abundance of PL molecular species within HDL is associated with the CVD risk[13–16].

The membrane ATP binding cassette G1 (ABCG1) transporter is able to promote the export of numerous molecules, mostly lipids[17], which include PL[18,19] through the cellular membrane. Although ABCG1-mediated efflux to non-specific acceptors such as albumin may occur, large HDL particles (but not lipid-free apolipoprotein A-I (ApoA-I)) are major lipid acceptors for ABCG1[19,20]. Through this mechanism, ABCG1 was reported to control tissue lipid homeostasis[21,22] but there is still no evidence for a direct role of ABCG1 in HDL function[17]. In familial hypercholesterolemia, ABCG1-mediated cholesterol efflux to large HDL2 was reported to be inversely associated with carotid intima-media thickness[23]. The HDL2

particles are the predominant cholesterol acceptors for cellular cholesterol efflux in normolipidemic women[24] and we previously reported that the genetic variation of *ABCG1* contributes to a higher proportion in the capacity of plasma to promote macrophage cholesterol efflux in women than in men, an effect that is independent of circulating HDL-C concentrations[25].

In the present study, we addressed the hypothesis that ABCG1 could modulate HDL function through the remodeling of their phospholipidome. Using a translational approach, we demonstrated that hepatic human ABCG1 impacts the abundance of specific PL species in HDL particles and enhances their capacity to promote macrophage cholesterol efflux. Moreover, our findings led us to propose that such a compositional rearrangement mediated by ABCG1 might protect against atherosclerosis in women with the identification of PL species underlying this effect.

Methods.

Isolation and characterization of plasma HDL

Human HDL2. Human HDL2 were isolated from human plasma or culture medium by a multistep ultracentrifugation procedure. Briefly, the density of plasma was increased to 1.063 g/ml by addition of dry solid potassium bromide. Apolipoprotein (apo)B-containing lipoproteins (d < 1.063 g/ml) were removed from cell culture medium or plasma after a first ultracentrifugation at 45,000 rpm for 24 h at 15°C using a Beckman 50.4 rotor in a Beckman XL70 ultracentrifuge. The density of the d<1.063 g/ml fraction was adjusted to 1.125 g/ml by addition of dry solid potassium bromide. Then HDL2 lipoproteins (d 1.063- 1.125 g/ml) were obtained following a second ultracentrifugation at 45,000 rpm for 48 h at 15°C using a Beckman 50.4 rotor in a Beckman XL70 ultracentrifuge. Study population was part of the normolipidemic population previously described[25] consisted of women homozygous carriers for either the TT (n=40) or the GG (n=28) genotype of the frequent functional rs1378577 (ABCG1 c. -134 T>G) single nucleotide polymorphism. Major clinical and biochemical characteristic of the study population are presented in the Supplemental Table 1. Carotid and femoral ultrasonography was performed in a subset of individuals (n=12) by high-resolution B-mode ultrasound of the common carotid artery (CCA), the carotid bifurcation, the internal carotid artery, and the common femoral artery (CFA) as previously described[26]. The study was performed in accordance with ethical principles outlined in the declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients.

Mouse HDL. ApoB-containing lipoproteins (d < 1.063 g/ml) were removed from mouse plasma by ultracentrifugation at 120,000 rpm for 3 h at 15°C using a Beckman TLA 120.2 rotor in a Beckman Optima Max TL ultracentrifuge. Then, total HDL (d 1.063–1.21 g/ml) was isolated from ApoB-depleted plasma by ultracentrifugation at 120,000 rpm for 5 h at 15°C using a Beckman TLA 120.2 rotor in a Beckman Optima Max TL.

Purified HDL fractions of human or murine origin were dialyzed using Spectrapor membrane tubing against Phosphate Buffer Saline at pH7.4 before analysis for their lipid and protein content and used in functional assays.

Biochemical analysis. Human HDL2 and mouse HDL lipid and protein levels were analyzed using routine enzymatic methods on an autoanalyzer Konelab 20 (Thermo Scientific, Cergy Pontoise, France). Commercial kits were used for the determination of total cholesterol, phospholipid (Diasys, Grabels, France), triglycerides and protein (Thermo Scientific, Cergy Pontoise, France) concentrations. Human. ApoB-depleted plasma from hApoB/CETP mice was obtained following dextran sulfate-magnesium precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins (Biomérieux, Craponne, France).

Human ABCG1-mediated remodeling of HDL lipoproteins.

Remodeling of HDL2 by human ABCG1 was achieved by incubating isolated human HDL2 with either control cells or cells in which human ABCG1 expression was stably expressed (CHO-K1 cells[20]) or knocked down by RNAi (Human hepatocytes) in serum-free media for 16h at 37°C. Subsequently, media containing remodeled HDL2 were centrifuged at 1,500 rpm for 5 min in order to discard cell debris and HDL2 were reisolated by ultracentrifugation as described above.

Lipidomic analysis of high-density lipoproteins.

All internal standards were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). LC/MS grade or UPLC grade solvents were used without further purification and obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Human HDL2 and mouse HDL (30µg PL) were extracted using a modified Bligh and Dyer protocol. Briefly samples supplemented with a mixture of internal standards were mixed with 1600 µL of acidified methanol:0.1N HCl (1:1 v/v) and 800 µL chloroform as described elsewhere[11,12]. The lower organic phase was dried, lipids were reconstituted into 40µL of LC/MS compatible solvent and lipids quantified by LC-ESI/MS/MS. Quantification of phospholipids, sphingolipids and neutral lipids was performed in positive-ion mode. Sample was injected to a Kinetex HILIC 2.6µm 2.1x150mm column (Phenomenex, CA, USA). Mobile phases consisted of water and acetonitrile containing ammonium acetate and acetic acid. Lipid species were detected using scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) and quantified using thirty-seven calibration curves specific for the 16 individual lipid subclasses and up to 12 fatty acid moieties. More abundant lipid species were quantified from a 10-fold diluted sample. An in-house

developed R script was used to correct for isotopic contribution to MRM signals as adapted from Ejsing CS et al[27].

Human macrophages

Blood monocytes were isolated from healthy normolipidemic donors (Etablissement Français du Sang, EFS) by Ficoll gradients (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) and subsequently differentiated into human macrophages 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, 2 mmol/L glutamine, 80 U/mL penicillin/streptomycin and 20 ng/mL human macrophage colony-stimulating factor. Inflammation was triggered in HMDM by incubation with 50ng/mL lipopolysaccharides for 8h and cytokine secretion was quantified in the culture media as previously described[28]. 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 mmol/L glutamine and 100 U/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 for 48h.

Human hepatocytes

Human hepatocytes were isolated from liver fragments obtained from adult patients undergoing partial hepatectomy. All hepatocytes were isolated using collagenase perfusion as previously described[29]. Human primary hepatocytes were cultured in William's Medium E (Life Technologies) supplemented with 10% FCS (Perbio), 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate (Upjohn Laboratories SERB, France), 5 µg/ml insulin (Sigma), 2 mM L-glutamine and 200 U/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin (Life Technologies, Courtaboeuf, France). The human hepatocellular carcinoma cell line Hep3B was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 1% non-essential amino acids and 100 U/mL penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO_2.

Transient expression of human ABCG1 in mice.

Mouse models. *Atp-binding cassette g1 (Abcg1)*$^{-/-}$ mice were generated at the Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France). Abcg1 mutant ES cell clones from C57BL/6 N mice were purchased from

the European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM). The Abcg1 targeting vector was constructed following the insertion of a gene-trap LacZ cassette downstream the exon 4 of the *Abcg1* gene (Supplemental Figure 1). Human ApoB/human CETP (ApoB/+;CETP/+) double transgenic mice were generated by breeding human CETP transgenic mice (line 5203) with mice transgenic for the human apoB gene as previously described[30].

Experimental procedure. Twelve-week aged female mice fed a standard chow diet were retro-orbitally injected with 40µg of either hABCG1 expression vector[20] or control parent pcDNA4.0 vector using an in vivo transfection reagent (PepJet DNA In Vivo Transfection Reagent, SignaGen Laboratories, injected volume 200µl) under isoflurane anesthesia. Seven days following the injection, blood samples were collected in Microvette tubes (Sarstedt, Marnay, France) by retro-orbital bleeding under isoflurane anesthesia. Mice were weighed, euthanized and their livers were isolated. Plasma samples were analyzed with an Autoanalyzer (Konelab 20) using reagent kits from Roche for TC and ThermoElectron for HDL-C. A liver piece was excised, minced and digested in Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 2.5 mg/mL collagenase D (Roche, Boulogne Billancourt, France) for 30 min at 37°C under shaking at 125 rpm and dissociated through a 100 µm pored cell strainer (Franklin lakes, NJ, USA). Hepatocytes were isolated following a brief centrifugation for 1 min at 1,000 rpm and stored at -80°C until use.

RNAi-mediated silencing of human ABCG1 expression

ABCG1 knock-down (KD) cells were obtained by transfection of siRNA oligonucleotides (Dharmacon) targeted to the cDNA sequence of the human ABCG1 gene using lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) as previously described[31]. After a 24-h incubation at 37°C, ABCG1 KD and control cells were used for subsequent experiments.

RNA extraction, retrotranscription and real-time quantitative PCR

Total RNAs from cell cultures or tissues were extracted using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and real-time qPCR using a LightCycler LC480 (Roche) were performed as previously described[31]. Human mRNA levels were normalized to those of human non-POU domain-containing octamer-binding housekeeping gene

(NONO), human alanine (*ALA*), human α-tubulin (*TUBA*) and human heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (*HSP90AB1*), human hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), and human 18S ribosomal RNA (18S rRNA). Mouse mRNA levels were normalized to those of mouse hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*), mouse non-POU domain-containing, octamer-binding housekeeping gene (*Nono*), mouse heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (*Hsp90ab1*) and mouse cyclophilin A (*CycA*). Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control values.

Cellular cholesterol efflux

Cells were labelled for 24h in serum-free media supplemented with 0.2% BSA containing either 50µg/mL acetylated LDL (human macrophages) or 10% serum (human hepatocytes) labelled with 1µCi/mL [^{3}H]cholesterol. The labeling medium was removed and the cells were washed twice with PBS and incubated with serum-free media supplemented with 0.2% BSA for additional 16h. Afterwards, cells were washed twice with warm serum-free media supplemented with 0.2% BSA and incubated with either 15 µg/mL HDL-PL (total HDL or HDL2) or 1% plasma for 4h. Radioactivity content was determined in the media and cells following extraction in hexane-isopropanol (3:2) by liquid scintillation counting (Wallac Trilux 1450 Microbeta, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). The percentage of free cholesterol efflux was calculated as 100 x (medium cpm) / (medium cpm + cell cpm). Cholesterol efflux to exogenous acceptors was determined by subtracting free cholesterol efflux measured in the absence of exogenous acceptors.

Western blotting analysis

Cell proteins were extracted using NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Pierce) containing protease inhibitors and were subsequently separated on a 4-12% Bis-Tris gel (Life Technologies). Proteins (25 to 50 µg per lane) were transferred to nitrocellulose and the membrane was blocked with Casein blocker solution for 1h. Membranes were subsequently incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-ABCG1 antibody (NB400-132; Novus) at 1:2500 and goat anti-rabbit/HRP antibody (Dako) at 1:5000. Quantification of Western blots was performed using a Kodak Image Station 440 CF with Kodak 1D Image Analysis Software (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France).

Human liver ABCG1 detection by immunohistochemistry

Immunohistochemistry of human liver biopsies was performed as previously described[32]. Briefly, following paraffin embedding, 3-5 pm thick sections were cut and tested by the ABC (avidin-biotin complex) immunoperoxidase method. Deparaffinised sections were soaked in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 3% hydrogen peroxide for 5 min at room temperature in order to eliminate endogenous peroxidase activity. After washing and incubation with normal goat serum (ABC kit, Vector Laboratories) at 1:200 for 30 min, each section was incubated at 4°C with the anti-ABCG1 antibody from Novus (NB400-132) at 1:100 for 12h followed by incubation with biotin-labelled secondary antibody (ABC kit) at 1:200 for 30 min. Kupffer cells were visualized with anti-CD68 from Dako (CD68, Clone PG-M1) using a Fast red substrate kit. After washing, the ABC complex (ABC kit) was applied for 45 min. Brown staining was produced by 5 mm treatment with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 50 mg in 100 ml PBS, pH 7.4, containing 0.01% hydrogen peroxide). Counterstaining was performed with Mayer's haematoxylin. In negative controls carried out in all single and double immunostaining experiments, each primary antibody was replaced with an immunoglobulin fraction of non-immune serum.

Statistical analyses

Data are shown as mean ± SEM. Experiments were performed in triplicate and values shown represent a mean of at least three independent experiments. Comparisons of two groups were performed by a 2-tailed Student's t-test and comparisons of three or more groups by ANOVA with Newman–Keuls post-hoc test. All statistical analyses were performed using Prism software from GraphPad (San Diego, CA, USA). For lipidomics, normalized mean-center data were drawn as a clustered lipidomic array (heat map) using Multi Experiment Viewer (MeV) software version 4.9 (https://sourceforge.net/projects/mev-tm4/)[33]. Metabolites considered to vary significantly between two respective subjects were identified using Wilcoxon-Mann-Whitney non-parametric test, with $p<0.05$ as a significance threshold. The Benjamini−Hochberg correction was applied to control for false discovery rate[34] (FDR). Analysis of variance (ANOVA) was done using MeV 4.9 with a threshold of $p<0.05$. When the non-parametric test and ANOVA returned an overall level of significance of $p<0.05$

between the subjects, a Hierarchical Clustering tree (HCL) was subsequently built. Lipid features were clustered using complete linkage over the samples using Pearson correlation distance matrix.

Results.

Enhanced atheroprotective functions of HDL remodeled by human ABCG1.

In order to assess the hypothesis that ABCG1-mediated lipid remodeling of HDLs impacts their functionality, large human HDL2, the preferential lipid acceptor for ABCG1, were incubated with either CHO cells expressing the human form of ABCG1 (hABCG1)[20] or control cells for a 16h-period at 37°C and then tested for their biological activities (Figure 1A). As shown in Figure 1B, HDL2 remodeled by hABCG1 exhibited significantly elevated capacity to promote free cholesterol efflux (+15%, $p<0.05$) from primary culture of human macrophages (HMDM) as compared to HDL2 incubated with control cells. In addition, anti-inflammatory activity of HDL2 was greatly enhanced following the remodeling by ABCG1 as testified by the marked decrease of the secretion of pro-inflammatory cytokines interleukin-6 (-60%, $p<0.01$; Fig. 1C) and tumor necrosis factor-α (-60%, $p<0.05$; Fig. 1D) for 8 hours in the media of LPS-treated HMDM in comparison to control HDL2. Taken together, these results indicated that the remodeling of large HDLs by human ABCG1 improves their atheroprotective properties.

Functional ABCG1 is expressed in human hepatocytes

Liver is a key organ in HDL biology since it contributes to HDL biogenesis and metabolism through the hepatic expression of specific transporters, receptors and plasma enzymes. Previous studies reported poor hepatic expression of Abcg1 in rodents, which was apparently restricted to Kupffer cells (KC)[21,35]. Analysis of the expression of Abcg1 in hepatocytes and KC isolated from the liver of C57BL/6 mice fed a chow diet in the present study confirmed previous observations as we observed 19-fold higher *Abcg1* mRNA levels in KC relative to hepatocytes (Figure 2A). No data are however available in the literature about the ABCG1 expression in human liver. Using immunohistochemistry experiments from biopsies of human livers, we were able to detect a strong expression of ABCG1 in hepatocytes as well as in macrophages identified by CD68 staining (Figure 2B), thereby contrasting to what was observed in mice. Next, to determine if ABCG1 was functional in human hepatocytes, lipid efflux experiments were conducted in primary human hepatocytes (PHH) in which ABCG1 was knocked down (ABCG1 KD), or not (Control), by RNAi (Figure 2C-D). We observed that cholesterol efflux to HDL was significantly reduced in ABCG1 KD PHH as compared to control cells (Figure 2C). Similar results were obtained using

the human hepatocellular carcinoma cell line Hep3B (Supplemental Figure 2). As a whole, these data demonstrated that ABCG1 was robustly expressed and exhibited a functional lipid efflux activity in human hepatocytes.

Hepatic expression of hABCG1 in mice enhances the cholesterol efflux capacity of HDL

To assess whether the hepatic expression of ABCG1 may improve the functionality of HDL, human ABCG1 was transiently expressed through systemic injection of a hABCG1 coding plasmid in double transgenic mice expressing human ApoB and cholesterol ester transfer protein (CETP; hApoB/CETP mice) who display plasma lipoprotein profile similar to that of normolipidemic humans[36]. As shown in Figure 3A, high amounts of human *ABCG1* mRNA levels were detected in livers of hApoB/CETP mice 6 days following the injection of the hABCG1 coding plasmid as compared to mice injected with the control plasmid. Isolation of hepatocytes (Fig. 3B) and KC (Fig. 3C) from murine livers indicated that hepatic expression of hABCG1 mostly reflected hABCG1 expression in hepatocytes whereas the latter was undetectable in KC. Analysis of plasma lipid levels indicated that hABCG1 expression in hApoB/CETP mice was without significant effect on both total cholesterol (Fig. 3D) and HDL-C (Fig. 3E) levels when compared to animals injected with the control plasmid. Interestingly, plasma from mice expressing hABCG1 exhibited significantly higher capacity to promote cholesterol efflux from human THP-1 macrophages than that from control animals (+36%, $p<0.05$; Figure 3F). A similar effect was observed when plasma depleted in ApoB-containing lipoproteins was used indicating that the enhanced macrophage cholesterol efflux to the whole plasma was attributable to HDL (Figure 3G).

To explore accurately the impact of the specific hABCG1 expression on HDL remodeling and functionality, a similar experimental approach was employed in *Abcg1*$^{-/-}$ mice who do not express endogenous Abcg1. Analysis of hepatic *Abcg1* mRNA levels confirmed the predominant expression of Abcg1 in KC in *Abcg1*$^{+/+}$ mice, which was drastically reduced in littermate *Abcg1*$^{-/-}$ mice (Figure 4A). It is of note that plasma TC levels as well as the capacity of plasma to promote macrophage cholesterol efflux were unchanged between *Abcg1*$^{+/+}$ and *Abcg1*$^{-/-}$ mice (Figure 4B-C). As observed in ApoB/CETP mice, retro-orbital injection of the hABCG1 coding plasmid in *Abcg1*$^{-/-}$ mice resulted in a strong expression of human *ABCG1* mRNA in hepatocytes in comparison to mice injected with the control

plasmid (figure 4D), without affecting residual mRNA levels of endogenous murine *Abcg1*. In addition, plasma cholesterol levels (which mainly reflect those of HDL-C in C57BL/6 mice) were not altered following the expression of hABCG1 in *Abcg1*$^{-/-}$ animals (Figure 4E). Such hABCG1 expression resulted in significantly elevated capacity of plasma to promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages (+33%, $p<0.05$; Figure 4F). Taken together, these results demonstrated that the expression of human ABCG1 in hepatocytes was accompanied by subsequent enhancement of the capacity of HDL to promote macrophage cholesterol efflux.

Expression of human ABCG1 affects the phospholipidome of HDL

To assess whether the expression of human ABCG1 impacts the HDL phospholipidome, we performed LC-ESI/MS/MS analysis on total plasma HDL isolated from *Abcg1*$^{-/-}$ mice 7 days following the injection with either the hABCG1 coding vector or the control plasmid. Analysis of total lipid and protein composition (Figure 5A) as well as proportions of major phospholipid and sphingolipid classes (Figure 5B) in HDL did not reveal significant changes as a result of the expression of hABCG1 even if the abundances of both total PS and SM tended to be elevated (+24% and +14%, respectively). However, quantification of 247 lipid molecular species in HDL including 17 LPC, 12 LPE, 8 PA, 25 PC, 16 pPE, 21 PE, 15 PG, 17 PI, 19 PS, 25 ceramides (dihydro- and ceramides), 15 SM and 57 TG species (Supplemental Table 2) led us to identify 10 lipid species significantly altered in HDL isolated from mice injected with the hABCG1 plasmid as compared to control mice (FDR corrected at <0,05; Figure 5C and Supplemental Figure 3). Among them, the abundances of 3 lipid species (PI (38:6), PE (16:0p/20:4) and PS (32:0)) were increased, whereas those of 7 lipid species (PA (36:2), PI 36:2), PE (36:5), PG (36:1), PG (36:2), PC (36:2) and Cer (d18:0-24:0)) were reduced in HDL from mice expressing human ABCG1. Herewith, we demonstrated that the expression of human ABCG1 in hepatocytes was accompanied by a modification of the HDL phospholipidome in mice.

Impact of the functional rs1378577 *ABCG1* polymorphism on the phospholipidome and macrophage cholesterol efflux capacity of HDL

In order to translate our findings in the context of human physiopathology, we took advantage of the functional rs1378577 *ABCG1* SNP located in the promoter region, which was reported by us to

modulate *ABCG1* expression[22,37]. Indeed, the transient transfection of human HepG2 cells revealed that the expression of the human *ABCG1* promoter containing the T allele of the rs1378577 was significantly increased as compared to that containing the G allele (Figure 6A). In addition, we previously genotyped the rs1378577 SNP in a population of 396 normolipidemic individuals[25] and females homozygous for either the frequent T (T/T, n=40) or the rare G (G/G, n=28) allele were selected for the study. No difference in plasma lipid levels, including HDL-C, was observed between subjects carrying either the T/T (n=40) or the G/G (n=28) genotype (Supplemental Table 1). In agreement with our *in vivo* data obtained in different mouse models, the capacity of plasma of T/T carriers (displaying high *ABCG1* expression) to promote macrophage cholesterol efflux was significantly elevated (+15%, $p<0.05$) relative to plasma of G/G carriers (featuring low *ABCG1* expression; Figure 6B). The capacity of HDL2 isolated from women subjects carrying the T/T genotype was higher than that from their counterparts carrying the G/G genotype (Figure 6C). To determine if this increase was associated with ABCG1-mediated remodeling of the HDL2 phospholipidome, abundances of 10 lipid species specifically altered in mouse HDL by human ABCG1 (Figure 5C) were quantified by LC-ESI/MS/MS in HDL2 particles from T/T and G/G individuals. In agreement with what was observed in mice, the abundances of 6 (PA (36:2), PI (38:6), PI (36:2), PE (36:5), PG (36:1), PG (36:2)) out of 10 species (with PE (16:0p/20:4) and PS (32:0) being not detected) were significantly reduced in subjects exhibiting high ABCG1 expression (T/T carriers) as compared to those with low ABCG1 expression (G/G carriers; Figure 6D-K). These data led us to conclude that elevated expression of ABCG1 in healthy normolipidemic women remodeled the HDL2 phospholipidome in parallel with enhancement of HDL capacity to promote macrophage cholesterol efflux.

Modulation of the HDL phospholipidome by human ABCG1 mostly results from its expression in hepatocytes

Our *in vivo* findings in both mice and humans revealed a close link between the human ABCG1 expression and the phospholipidome of circulating HDL, identifying several lipid species whose HDL abundance was altered by ABCG1. However, it was not clear at this stage whether this alteration directly resulted from the action of ABCG1 at a cellular level, probably in hepatocytes, or reflected

further remodeling of HDL particles in the intravascular compartment. To address this question, human HDL2 were incubated with both control and ABCG1 KD PHH for a 16h period at 37°C and the abundance of 10 lipid species specifically altered in mouse HDL by human ABCG1 was quantified in remodeled HDL2 by LC-ESI/MS/MS. In agreement with what was observed in both mice and humans, the abundances of 5 out of 10 lipid species (with PE (16:0p/20:4) and PS (32:0) being not detected) were either elevated (PI (38:6), PA (36:2), PI (36:2), PE (36:5)) or reduced (PG (36:1)) in ABCG1 KD PHH relative to control PHH, whereas those of 3 lipid species were not altered (PG (36:2), PC (36:2) and Cer (d18:0-24:0); Figure 7). Taken together, these results strongly suggest that the ABCG1-dependent remodeling of the HDL2 phospholipidome predominantly resulted from the activity of ABCG1 in hepatocytes.

ABCG1-mediated remodeling of HDL and atherosclerosis

Finally, to assess whether the ABCG1-mediated remodeling of HDL2 particles might have an effect on atherosclerosis development, the amount of 6 lipid species (PI (38:6), PA (36:2), PI (36:2), PE (36:5), PG (36:1) and PG (36:2)) whose abundance was altered in HDL2 according to the rs1378577 *ABCG1* SNP and/or the hepatic ABCG1 expression was correlated with the measure of IMT of either common carotid artery (CCA-IMT) or common femoral artery (CFA-IMT). In a subset of individuals for which carotid and femoral ultrasonography was performed (n=12), strong and significant positive correlations were found between HDL2 content of PI (38:6) and PE (36:5) (which were both reduced by human ABCG1 expression) and CCA-IMT (PI (38:6) : $r=0.65$, $p=0.02$ and PE (36:5) : $r=0.61$, $p<0.03$) and CFA-IMT (PE (36:5) : $r=0.82$, $p=0.001$) (Figure 8). These results support the notion that remodeling of the HDL2 phospholipidome operated by ABCG1 might contribute to their antiatherogenic action.

Discussion.

The phospholipidome of HDL particles is closely linked to their biological activities and alterations of both the phospholipidome and atheroprotective functions of HDL are features of ASCVD patients[13–16]. Although mechanisms determining the composition of HDL in PL species are largely unknown, a growing body of evidences supports the notion that variations in the HDL phospholipidome may contribute to CVD risk. We herein identified membrane ABCG1 transporter as being an important determinant of the HDL phospholipidome and functions with potential implications in atherosclerosis.

Beyond its known role in cellular cholesterol efflux to extracellular acceptors such as HDL, ABCG1 was equally reported to promote the export of other classes of lipids including phospholipids and sphingomyelin[14]. Using complementary *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrated that the expression of hepatic ABCG1 led to significant modifications of the content of phospholipid and sphingolipid molecular species in HDL, with the identification of a set of molecules which represents a signature of such ABCG1-mediated remodeling. Unexpectedly, PC content of HDL was not affected by ABCG1 expression even if several studies reported that ABCG1 promoted cellular PC efflux to HDL. However, Kobayashi et al. reported using HEK293 cells stably expressing ABCG1 that human ABCG1 preferentially secretes SM in extracellular media[18]. In addition, a similar comment can be made regarding the cholesterol content of HDL which was not affected by ABCG1 expression while its role in the export of cholesterol from numerous cell types, including hepatocytes as investigated in the present study, was frequently demonstrated. In addition, the expression of ABCG1 in both humans and mice was without effect on circulating HDL-C levels[21,37]. Thus, although PC was the most abundant PL class in HDL, we herein demonstrated that ABCG1-mediated remodeling of HDL predominantly involves less abundant PL classes. Taken together, these findings indicate that lipid efflux activity of ABCG1 leads to subtle changes in the lipid composition of HDL without any major alteration of their lipid content. Interestingly, analysis of the HDL lipidome by LC-ESI/MS/MS revealed that the HDL remodeled by ABCG1 largely revealed a relative loss of molecular lipid species rather than their gain as expected from the ABCG1-mediated PL efflux. Indeed, only 3 lipid species of plasmalogens, PS and PI were detected at a higher abundance in HDL following human ABCG1 expression, whereas the abundance of 7 lipid

species from PC, PG, PI and PE was decreased. These observations suggest that the incorporation of the three species of PS (32:0), PI (38:6) and PE (16:0p/20:4) at the HDL surface leads to the displacement of other lipid species, including PC (36:2), PA (36:2), PI (36:2), PG (36:2), PG (36:1), PE (36:5) and Cer (d18:0-24:0). Such a remodeling of HDL likely occurs at the cellular level in interaction with ABCG1 rather than in the intravascular compartment under the action of plasma enzymes, since most of these modifications were equally observed following HDL incubation with primary human hepatocytes in which ABCG1 expression was manipulated. Strikingly, lipidomic analysis of HDL in both mouse and human models revealed that the remodeling of the HDL phospholipidome by ABCG1 does not occur randomly but rather involves specific PL species containing monounsaturated or polyunsaturated medium-chain fatty acid residues of 16 to 20 carbon atoms, with a predominance of 36:2-containing species.

In the present study, the modification of the HDL phosphosphingolipidome by ABCG1 was accompanied by enhancement of its biological functions, including anti-inflammatory activity and capacity to promote macrophage cholesterol efflux; the latter is robustly associated with ASCVD[5–7]. Although it is difficult to univocally conclude without conducting appropriate structure-function studies that such a modification of the HDL phosphosphingolipidome could fully account for the observed effect of ABCG1 on HDL function, the PL remodeling of HDL induced by ABCG1 is however consistent with its elevated biological activity. Indeed, we previously demonstrated that enrichment of HDL particles in PS was positively correlated to all metrics of HDL functionality, including HDL capacity to promote macrophage cholesterol efflux[11]. Moreover, we demonstrated that PS-supplemented reconstituted HDL (rHDL) exhibited enhanced macrophage cholesterol efflux activity and anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo*[38]. Plasmalogens are known to be potent antioxidant and antiapoptotic molecules and the plasmalogen content of HDL was reported to be inversely associated with the occurrence of stable and acute coronary artery disease[14]. Finally, the modification of the HDL content in PI molecular species induced by ABCG1 might equally impact the functionality of HDL particles, including their role in macrophage cholesterol efflux and reverse cholesterol transport[39]. Interestingly, reduced content of plasmalogen PE together with increased content of PI are features of

HDL from patients with metabolic syndrome[40], diabetes and dyslipidemia[41]. More strikingly, studies conducting lipidomic analyses of HDL from patients at high CV risk support the hypothesis that modifications of the HDL phosphosphingolipidome by ABCG1 plays an important role in their functionality. Thus, dysfunctional large HDL from ApoA-I deficient patients were enriched in Cer (d18:0-24:0), PI (36:2), PA (36:2), PG (36:1) and PG (36:2)[16], the lipid species being specifically depleted by human ABCG1 in our study. Moreover, PA (36:2), the common precursor of PI (36:2), PC (36:2), and PG (36:2), was enriched in large HDL from patients with myocardial infarction relative to control normolipidemic HDL[42]. Although the analysis of the frequent functional *ABCG1* SNP rs1378577 in a population of normolipidemic women did not reveal its effect on PC (36:2) content of HDL2 in the present study, it is noteworthy that PC (36:2) is one of the most abundant PC species found in human atherosclerotic lesions and that the distribution of PC (36:2) in plasma reflects that in the human lesions[43].

Among the molecular species of PL specifically targeted by ABCG1 in HDL, our *in vitro* and *in vivo* experiments led us to uncover that the loss of PE (36:5) in HDL consecutive to the remodeling induced by hepatic ABCG1 might contribute to the atheroprotective function of HDL. Indeed, PE (36:5) content in large HDL was strongly and positively correlated with atherosclerosis development assessed by both CCA-IMT and CFA-IMT in normolipidemic women. The observation that the abundance of PE (36:5) in HDL was increased following incubation with ABCG1 KD PHH in comparison to control cells indicates that PL efflux mediated by hepatic ABCG1 reduces (PE 36:5) content of HDL. Consistent with this conclusion, we observed that HDL isolated from mice expressing human ABCG1 in the liver or from human TT carriers for rs1378577 (associated with high ABCG1 expression) were depleted in PE (36:5). Interestingly, the deleterious role of PE (36:5) in CVD is supported by previous lipidomic analyses of plasma from control individuals and patients with CVD. Thus, plasma concentrations of PE (36:5) were significantly higher in patients with stable CAD than in control individuals when 305 lipids were quantified in 220 individuals using LC-ESI/MS/MS[13]. Even more strikingly, quantification of 135 lipids in 685 plasma samples from the prospective population-based Bruneck Study identified PE (36:5) among only three lipid species displaying the strongest predictive value for CVD. Moreover, inclusion of PE

(36:5) on top of traditional risk factors resulted in improved risk prediction and classification in this cohort[44]. Taken together, these findings suggest that PE (36:5) content of HDL, which is modulated by ABCG1 expression, might contribute to the development of ASCVD. Because functionally defective HDL is typically observed in patients at high CVD risk[45], we propose that an elevation in PE (36:5) content in HDL particles might alter their functionality by affecting receptor-dependent or independent cell-HDL interaction and/or intracellular signaling cascades triggered by HDL[46]. In addition, it is noteworthy that PE (36:5) may contain arachidonic acid (AA, 20:4) which is a key bioactive lipid species involved in inflammatory processes. As a result, PE (36:5) carried by HDL may constitute a source of AA in inflammatory cells such as macrophages, thereby contributing to the intra-lesion inflammation, through the production of prostaglandins and leukotrienes, and atherosclerosis development[47]. Interestingly, ABCG1 expression predominantly depleted HDL in 36:2 molecular species of PA (36:2), PI (36:2), PG (36:2) and PC (36:2) containing the essential linoleic acid (18:2), a precursor of AA. Future investigations are needed to assess potential impact of PE (36:5) on biological activities of HDL and to determine as to whether PE (36:5) content of HDL could represent a biomarker of ASCVD.

As a whole, our findings lead us to propose that hepatic ABCG1 expression induces selective redistribution of PL molecular species in HDL and, through this pathway contributes to antiatherogenic function of HDL. As a corollary, it can be anticipated that stimulation of ABCG1 expression in the liver could enhance the atheroprotective function of HDL, such as its capacity to promote macrophage cholesterol efflux, and thereby prevent or limit the development of atherosclerosis especially in women. Although these observations need to be confirmed in larger cohorts of women and transposed to men, our findings are of major interest since the ASCVD risk is underestimated in women and that important sex differences exist in the relation between HDL and atherosclerosis[48,49].

Although recent studies suggested that variations in the HDL phospholipidome might contribute to CVD risk[13–16], the present study uncovers a pathway governed by ABCG1 that plays important role in the PL remodeling of HDL with consequences for their functionality and atherosclerosis. In addition, our study identifies molecular lipid species in HDL that can serve as

biomarkers of HDL-mediated atheroprotection and ASCVD, providing new insights into the formulation of reconstituted HDL for therapeutic use[50].

Acknowledgements.

None.

Sources of funding.

This work was financially supported by INSERM, Sorbonne Université and the Fondation de France. L.M. Hardy, M. Olivier and E.F. Villard were recipients of a doctoral contract from Sorbonne Université.

Disclosures.

None.

References.

1. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*. 1977;62:707–714.

2. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*. 1986;256:2835–2838.

3. Ko DT, Alter DA, Guo H, Koh M, Lau G, Austin PC, Booth GL, Hogg W, Jackevicius CA, Lee DS, Wijeysundera HC, Wilkins JT, Tu JV. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cause-Specific Mortality in Individuals Without Previous Cardiovascular Conditions: The CANHEART Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2073–2083.

4. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011;17:594–603.

5. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, Rader DJ. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364:127–135.

6. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, Neeland IJ, Yuhanna IS, Rader DR, de Lemos JA, Shaul PW. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2014;371:2383–2393.

7. Guerin M, Silvain J, Gall J, Darabi M, Berthet M, Frisdal E, Hauguel-Moreau M, Zeitouni M, Kerneis M, Lattuca B, Brugier D, Collet J-P, Lesnik P, Montalescot G. Association of Serum Cholesterol Efflux Capacity With Mortality in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72:3259–3269.

8. Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014;384:618–625.

9. Davidson WS, Thompson TB. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 2007;282:22249–22253.

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

11. Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Calzada C, Lagarde M, Chapman MJ, Kontush A. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2715–2723.

12. Rached F, Santos RD, Camont L, Miname MH, Lhomme M, Dauteuille C, Lecocq S, Serrano CV, Chapman MJ, Kontush A. Defective functionality of HDL particles in familial apoA-I deficiency: relevance of alterations in HDL lipidome and proteome. *J Lipid Res*. 2014;55:2509–2520.

13. Meikle PJ, Wong G, Tsorotes D, Barlow CK, Weir JM, Christopher MJ, MacIntosh GL, Goudey B, Stern L, Kowalczyk A, Haviv I, White AJ, Dart AM, Duffy SJ, Jennings GL, Kingwell BA. Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2723–2732.

14. Sutter I, Velagapudi S, Othman A, Riwanto M, Manz J, Rohrer L, Rentsch K, Hornemann T, Landmesser U, von Eckardstein A. Plasmalogens of high-density lipoproteins (HDL) are associated with coronary artery disease and anti-apoptotic activity of HDL. *Atherosclerosis*. 2015;241:539–546.

15. Horter MJ, Sondermann S, Reinecke H, Bogdanski J, Woltering A, Kerber S, Breithardt G, Assmann G, Von Eckardstein A. Associations of HDL phospholipids and paraoxonase activity with coronary heart disease in postmenopausal women. *Acta Physiol Scand*. 2002;176:123–130.

16. Zakiev E, Rached F, Lhomme M, Darabi-Amin M, Ponnaiah M, Becker PH, Therond P, Serrano CV, Santos RD, Chapman MJ, Orekhov A, Kontush A. Distinct phospholipid and sphingolipid species are linked to altered HDL function in apolipoprotein A-I deficiency. *J Clin Lipidol*. 2019;13:468-480.e8.

17. Hardy LM, Frisdal E, Le Goff W. Critical Role of the Human ATP-Binding Cassette G1 Transporter in Cardiometabolic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2017;18.

18. Kobayashi A, Takanezawa Y, Hirata T, Shimizu Y, Misasa K, Kioka N, Arai H, Ueda K, Matsuo M. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res*. 2006;47:1791–1802.

19. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1310–1316.

20. Gelissen IC, Harris M, Rye K-A, 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;26:534–540.

21. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*. 2005;1:121–131.

22. Frisdal E, Le Lay S, Hooton H, Poupel L, Olivier M, Alili R, Plengpanich W, Villard EF, Gilibert S, Lhomme M, Superville A, Miftah-Alkhair L, Chapman MJ, Dallinga-Thie GM, Venteclef N, Poitou C, Tordjman J, Lesnik P, Kontush A, Huby T, Dugail I, Clement K, Guerin M, Le Goff W. Adipocyte ATP-binding cassette G1 promotes triglyceride storage, fat mass growth, and human obesity. *Diabetes*. 2015;64:840–855.

23. Bellanger N, Orsoni A, Julia Z, Fournier N, Frisdal E, Duchene E, Bruckert E, Carrie A, Bonnefont-Rousselot D, Pirault J, Saint-Charles F, Chapman MJ, Lesnik P, Le Goff W, Guerin M. Atheroprotective reverse cholesterol transport pathway is defective in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1675–1681.

24. Catalano G, Duchene E, Julia Z, Le Goff W, Bruckert E, Chapman MJ, Guerin M. Cellular SR-BI and ABCA1-mediated cholesterol efflux are gender-specific in healthy subjects. *J Lipid Res*. 2008;49:635–643.

25. Villard EF, EI Khoury P, Frisdal E, Bruckert E, Clement K, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Le Goff W, Guerin M. Genetic determination of plasma cholesterol efflux capacity is gender-specific and independent of HDL-cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:822–828.

26. Gall J, Frisdal E, Bittar R, Le Goff W, Bruckert E, Lesnik P, Guerin M, Giral P. Association of Cholesterol Efflux Capacity With Clinical Features of Metabolic Syndrome: Relevance to Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2016;5.

27. Ejsing CS, Duchoslav E, Sampaio J, Simons K, Bonner R, Thiele C, Ekroos K, Shevchenko A. Automated identification and quantification of glycerophospholipid molecular species by multiple precursor ion scanning. *Anal Chem*. 2006;78:6202–6214.

28. Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T, Guerin M, Le Goff W. Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem*. 2011;286:30926–30936.

29. Silvie O, Rubinstein E, Franetich J-F, Prenant M, Belnoue E, Rénia L, Hannoun L, Eling W, Levy S, Boucheix C, Mazier D. Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat Med*. 2003;9:93–96.

30. El Khoury P, Waldmann E, Huby T, Gall J, Couvert P, Lacorte J-M, Chapman J, Frisdal E, Lesnik P, Parhofer KG, Le Goff W, Guerin M. Extended-Release Niacin/Laropiprant Improves Overall Efficacy of Postprandial Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:285–294.

31. Larrede S, Quinn CM, Jessup W, Frisdal E, Olivier M, Hsieh V, Kim M-J, Van Eck M, Couvert P, Carrie A, Giral P, Chapman MJ, Guerin M, Le Goff W. Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1930–1936.

32. Bobryshev YV, Lord RS. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res*. 1995;29:689–696.

33. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*. 2003;34:374–378.

34. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57:289–300.

35. Hoekstra M, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJC. Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J Biol Chem*. 2003;278:25448–25453.

36. Grass DS, Saini U, Felkner RH, Wallace RE, Lago WJ, Young SG, Swanson ME. Transgenic mice expressing both human apolipoprotein B and human CETP have a lipoprotein cholesterol distribution similar to that of normolipidemic humans. *J Lipid Res*. 1995;36:1082–1091.

37. Olivier M, Tanck MW, Out R, Villard EF, Lammers B, Bouchareychas L, Frisdal E, Superville A, Van Berkel T, Kastelein JJ, Eck MV, Jukema JW, Chapman MJ, Dallinga-Thie GM, Guerin M, Le Goff W. Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2223–2231.

38. Kontush A, Tubeuf E, Le Goff W, Dauteuille C, Guillas-Baudouin I, Lhomme M, Patel M, Huby T, Chapman MJ, Rye KA, Lesnik P. Phosphatidylserine potently enhances anti-inflammatory activities of reconstituted HDL. *Atherosclerosis*. 2015;241:e30.

39. Burgess JW, Boucher J, Neville TA-M, Rouillard P, Stamler C, Zachariah S, Sparks DL. Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport and excretion. *J Lipid Res*. 2003;44:1355–1363.

40. Denimal D, Nguyen A, Pais de Barros J-P, Bouillet B, Petit J-M, Vergès B, Duvillard L. Major changes in the sphingophospholipidome of HDL in non-diabetic patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2016;246:106–114.

41. Ståhlman M, Fagerberg B, Adiels M, Ekroos K, Chapman JM, Kontush A, Borén J. Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: impact on small HDL particles. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:1609–1617.

42. Zakiev E, Ma F, Rached F, Lhomme M, Sukhorukov V, Serrano CV, Santos RD, Chapman MJ, Orekhov A, Kontush A. Unsaturated, low-abundant species of HDL (Lyso)phospholipids are most affected by ST segment elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2018;275:e56–e57.

43. Stegemann C, Drozdov I, Shalhoub J, Humphries J, Ladroue C, Didangelos A, Baumert M, Allen M, Davies AH, Monaco C, Smith A, Xu Q, Mayr M. Comparative lipidomics profiling of human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:232–242.

44. Stegemann C, Pechlaner R, Willeit P, Langley SR, Mangino M, Mayr U, Menni C, Moayyeri A, Santer P, Rungger G, Spector TD, Willeit J, Kiechl S, Mayr M. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation*. 2014;129:1821–1831.

45. Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, Kontush A, Tall AR, Webb NR. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:48–60.

46. Nofer J-R. Signal transduction by HDL: agonists, receptors, and signaling cascades. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:229–256.

47. Bäck M, Yurdagul A, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:389–406.

48. El Khoudary SR, Ceponiene I, Samargandy S, Stein JH, Li D, Tattersall MC, Budoff MJ. HDL (High-Density Lipoprotein) Metrics and Atherosclerotic Risk in Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38:2236–2244.

49. Fan AZ, Dwyer JH. Sex differences in the relation of HDL cholesterol to progression of carotid intima-media thickness: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Atherosclerosis*. 2007;195:e191-196.

50. Darabi M, Guillas-Baudouin I, Le Goff W, Chapman MJ, Kontush A. Therapeutic applications of reconstituted HDL: When structure meets function. *Pharmacol Ther*. 2016;157:28–42.

Figures.

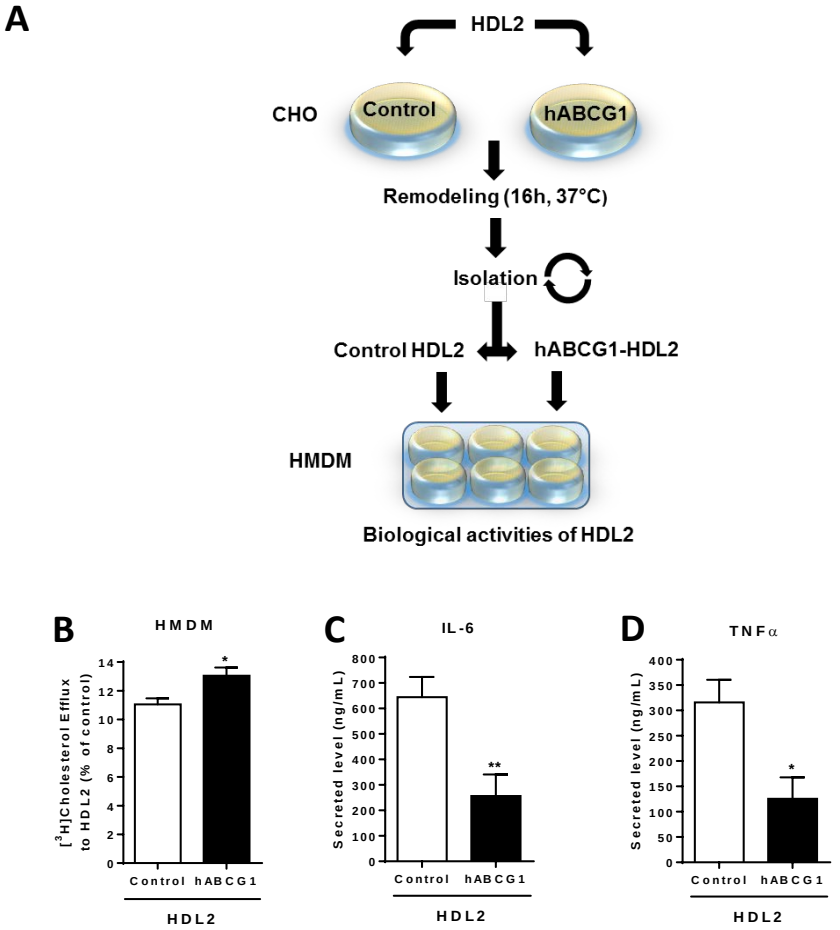


Figure 1. **Human ABCG1 expression enhanced atheroprotective functions of HDL.** A. Remodeling of HDL by ABCG1 was achieved by the incubation of large human HDL2 with CHO cells stably expressing (hABCG1) or not (Control) the human *ABCG1* gene. Following the incubation with CHO cells, HDL2 (Control or remodeled by ABCG1; hABCG1) were reisolated from the culture media by ultracentrifugation and tested for their capacity to promote free [^{3}H]cholesterol efflux (B) and to inhibit LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokines IL-6 (C) and TNFα (D) from human macrophage-derived monocyte (HMDM). Data are means ± SEM, *p<0.05 and **p<0.01 vs controls.

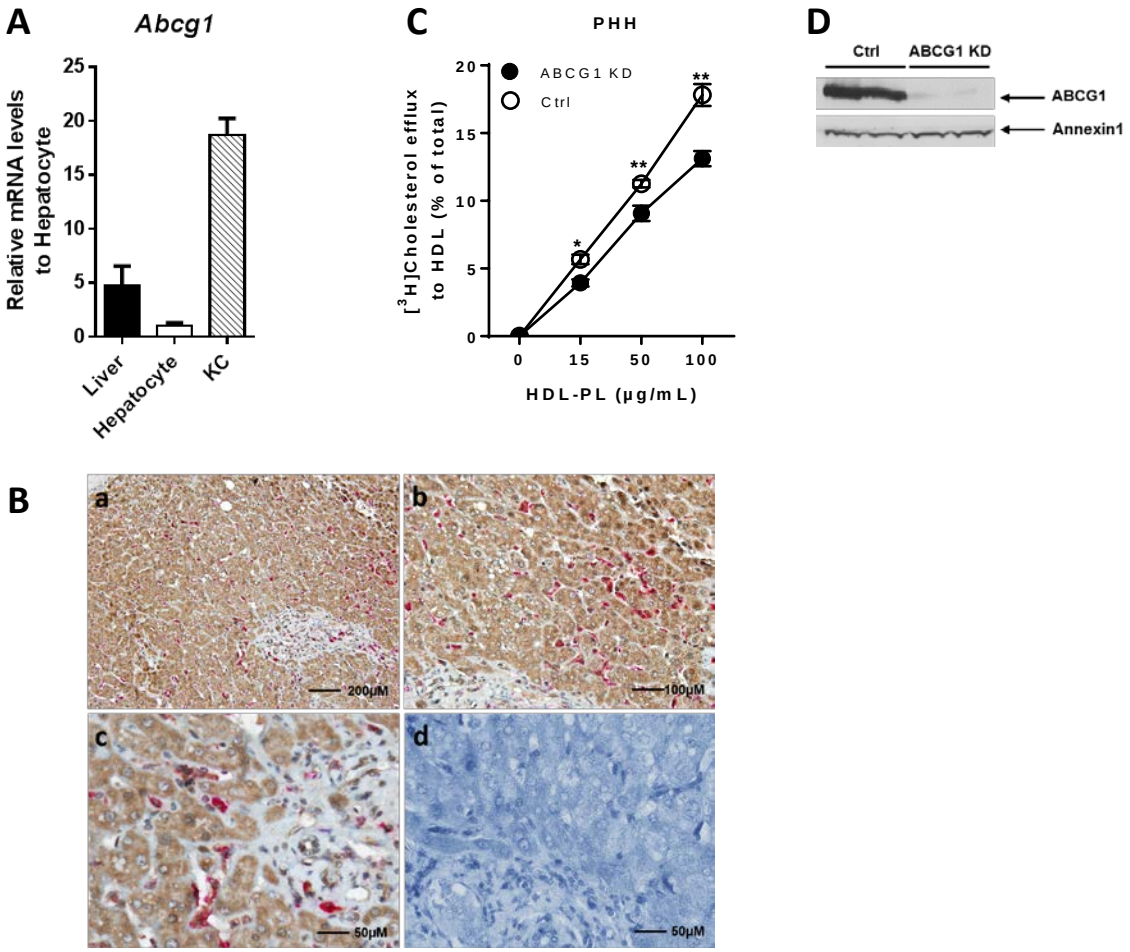


Figure 2. **Functional ABCG1 was robustly expressed in human but not in mouse hepatocytes.** A, Quantification of *Abcg1* mRNA levels in the whole liver, hepatocytes and isolated Kupffer cells (KC) from C57BL/6 mice. B, Low (a) and higher (b, c) magnification images of double immunostaining showing patterns of ABCG1 and CD68 in a human liver specimen. ABCG1 was visualized using ABC immunoperoxidase reaction (brown reaction product) while CD68 antigen was visualized using a Fast red substrate kit (rose reaction product); (d), negative control. (a-d), Counterstaining with Mayer's haematoxylin. Scale bars equal 200 µm (a), 100 µm (b) and 50 µm (c, d). C, Cellular free [^{3}H]cholesterol efflux to HDL from control (Ctrl) and ABCG1 knockdown (KD) primary human hepatocytes (PHH). D, Quantification of ABCG1 protein levels in control or ABCG1 KD PHH. Data are means ± SEM, *$p<0.05$ and **$p<0.005$ vs controls. PL, phospholipid.

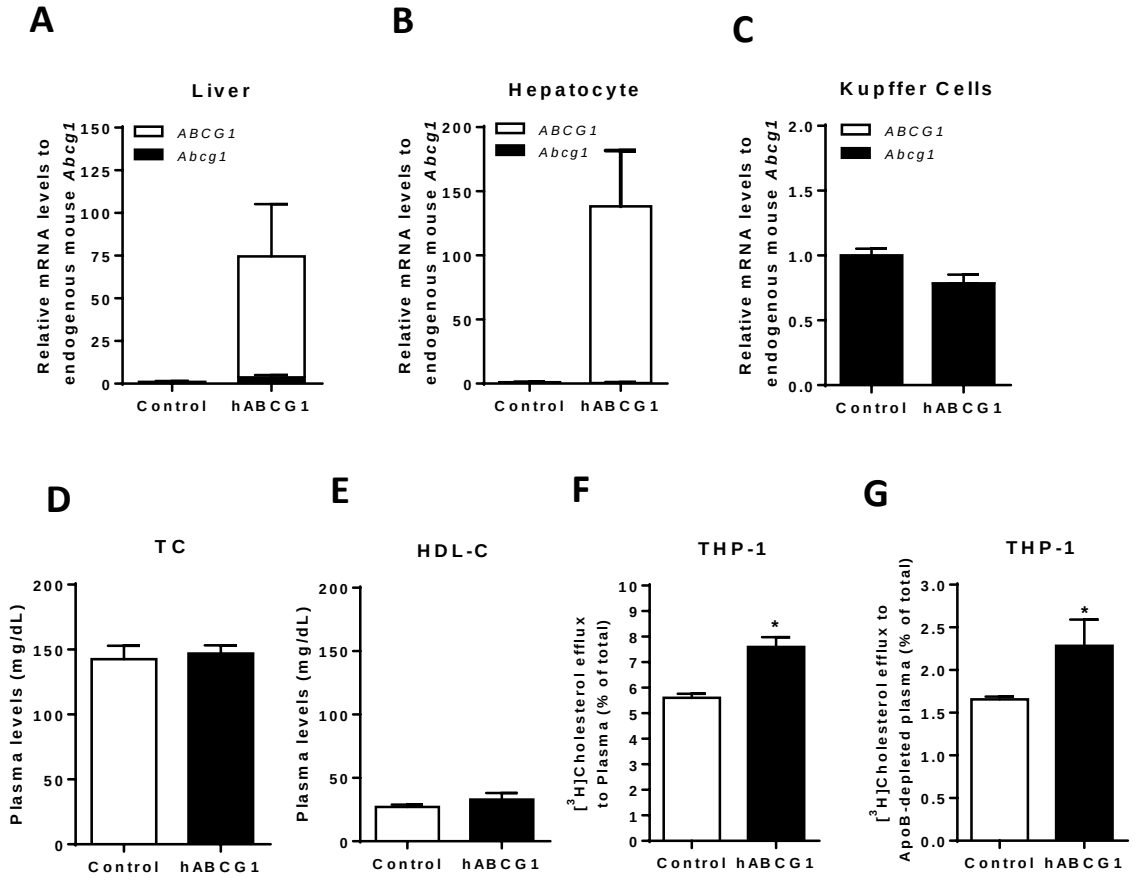


Figure 3. Enhanced capacity of HDL to promote macrophage cholesterol efflux in ApoB/CETP mice expressing human ABCG1. Quantification of mouse *Abcg1* and human *ABCG1* mRNA levels in the liver (A), hepatocytes (B) and isolated Kupffer cells (C) from ApoB/CETP mice following the injection with either a control or expressing human ABCG1 (hABCG1) vector. Plasma TC (D) and HDL-C (E) levels in control and hABCG1 ApoB/CETP mice. Capacity of whole (F) and ApoB-depleted (G) plasma from control and hABCG1 ApoB/CETP mice to promote [^{3}H]cholesterol efflux from THP-1 human macrophages. Data are means ± SEM for female mice (n=8), 10 days following the injection with either a control (Control) or expressing human ABCG1 (hABCG1) vector, *$p<0.05$ vs controls. TC, total cholesterol.

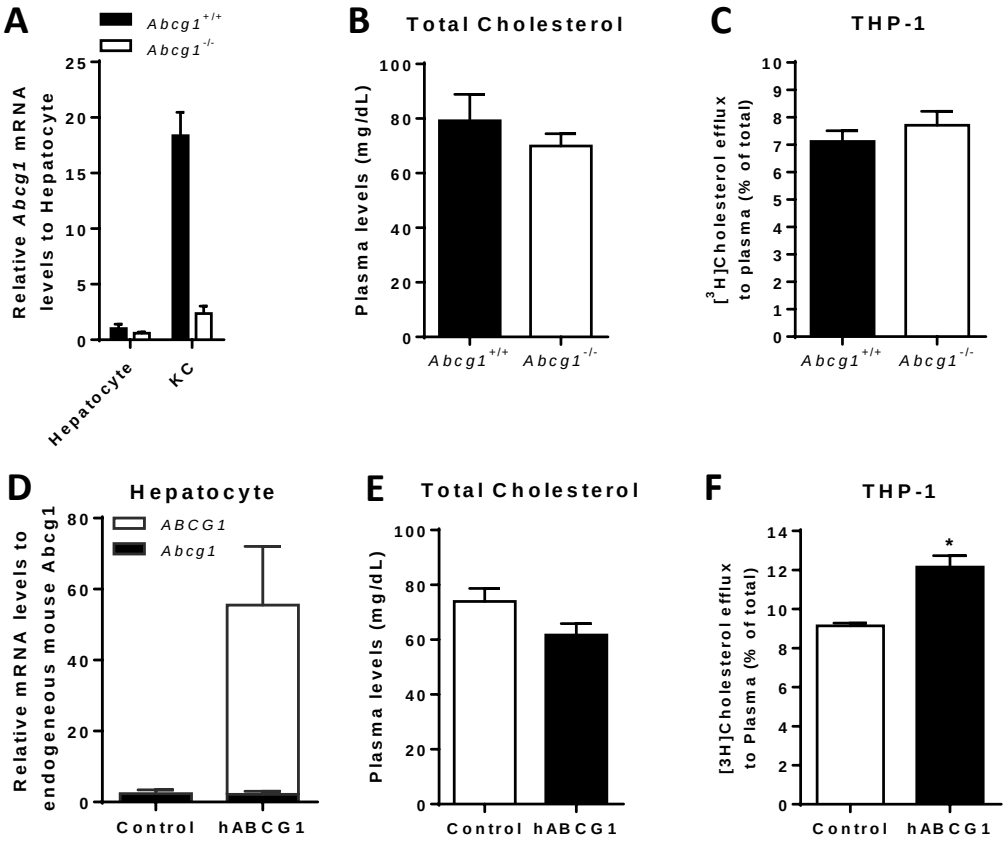


Figure 4. **Enhanced macrophage cholesterol efflux capacity of plasma from Abcg1-deficient mice expressing human ABCG1 in hepatocytes.** A, Quantification of *Abcg1* mRNA levels in hepatocytes and isolated Kupffer cells from *Abcg1*$^{+/+}$ or *Abcg1*$^{-/-}$ mice. Total cholesterol levels (B) and the capacity of plasma isolated from *Abcg1*$^{+/+}$ and *Abcg1*$^{-/-}$ mice to promote [^{3}H]Cholesterol efflux from human THP-1 macrophages (C). *D,* Quantification of murine *Abcg1* and human *ABCG1* mRNA levels in hepatocytes from *Abcg1*$^{-/-}$ mice following the injection with either a control or expressing human ABCG1 (hABCG1) vector. Total cholesterol levels (E) and the capacity of plasma obtained from control and hABCG1 *Abcg1*$^{-/-}$ mice to promote [^{3}H]Cholesterol efflux from human THP-1 macrophages (F). Data are means ± SEM for female mice (n=9) 10 days following the injection with either a control (Control) or expressing human ABCG1 (hABCG1) vector, *p<0.05 vs controls.

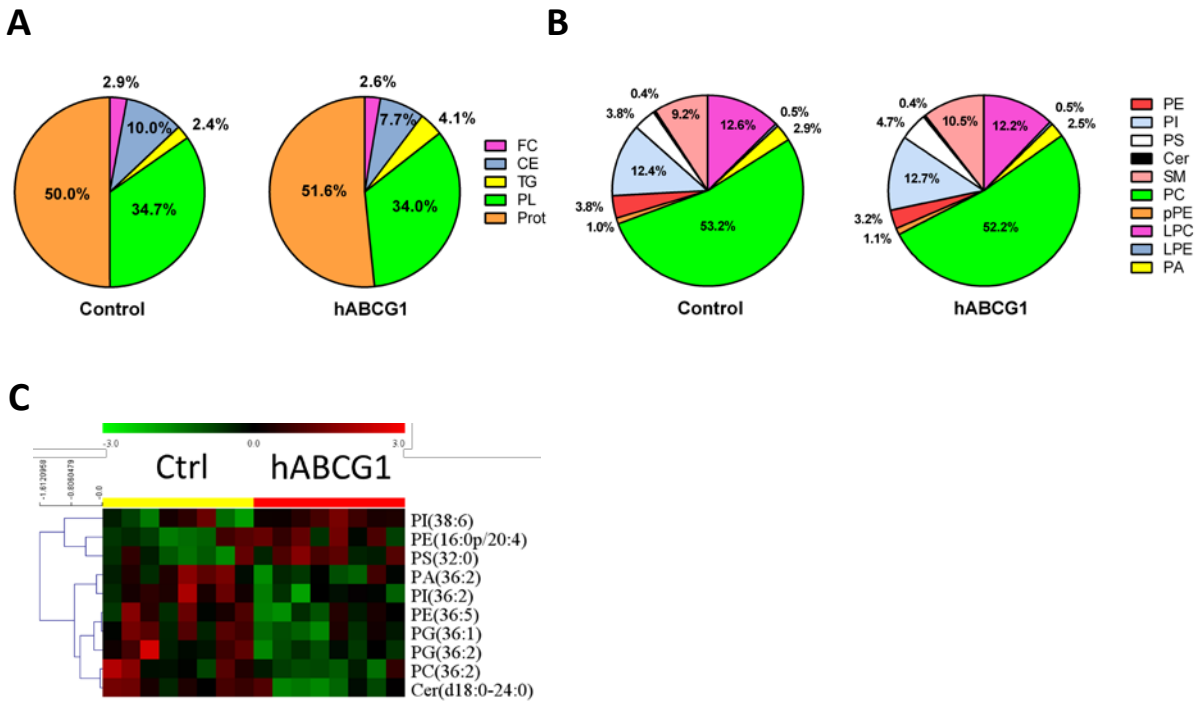


Figure 5. **Remodeling of the HDL phospholipidome following the expression of human ABCG1.** Total lipid and protein composition (A) and abundance of phospholipid and sphingolipid classes (B) of HDL from *Abcg1*$^{-/-}$ mice 10 days following the injection with either a control or expressing hABCG1 vector. C. Heat map representation of phospholipid species significantly altered following the expression of human ABCG1 ($p<0.05$ after FDR correction) in female mice (n=16) 10 days following the injection with either a control (Control) or expressing (hABCG1) vector . CE, cholesteryl ester; Cer, ceramide; FC, free cholesterol; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PL, phospholipid; pPE, plasmalogen PE; Prot, protein; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin; TG; triglyceride.

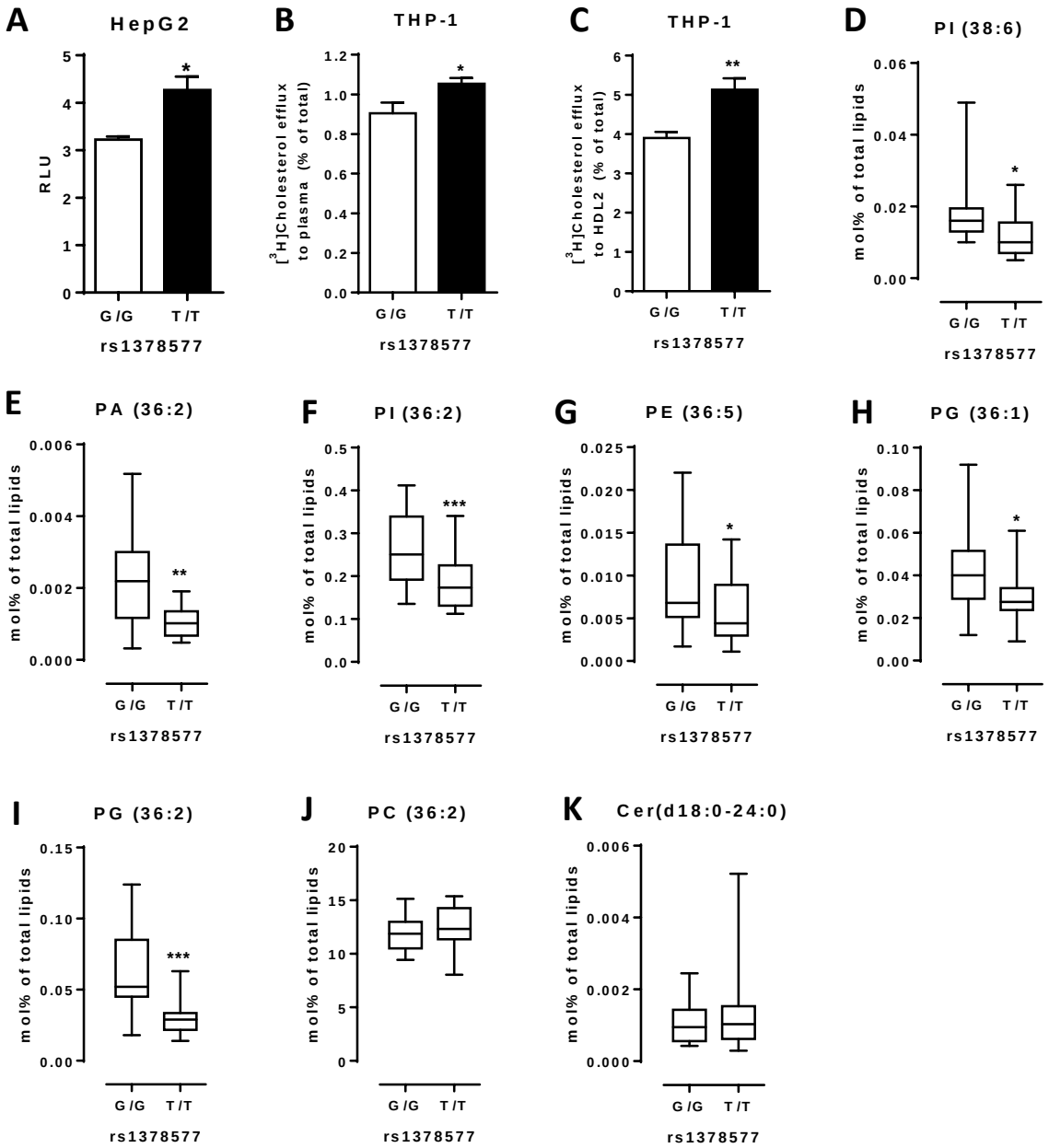


Figure 6. **Effect of the functional rs1378577 *ABCG1* polymorphism on the phospholipidome and the capacity of HDL to promote macrophage cholesterol efflux capacity.** A. Human hepatocellular carcinoma HepG2 cells were transiently transfected with a construct containing proximal 1056 bp of the human promoter with either T allele or G allele at position -134 (rs1378577). Luciferase activity was expressed in RLU after normalization for β-galactosidase activity. Capacity of plasma (B) and HDL2 (C) from normolipidemic women carrying either the G/G (low ABCG1 expression; n=28) or the T/T (high ABCG1 expression; n=40) genotype to promote free [^{3}H]Cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. D-K, Quantification of selected phospholipid species by LC-ESI/MS/MS in HDL2 from G/G (n=21) and T/T (n=18) carriers. Data are means ± SEM, *p<0.05, **p<0.005 and ***p<0.0005 versus G/G carriers. Cer, ceramide; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol.

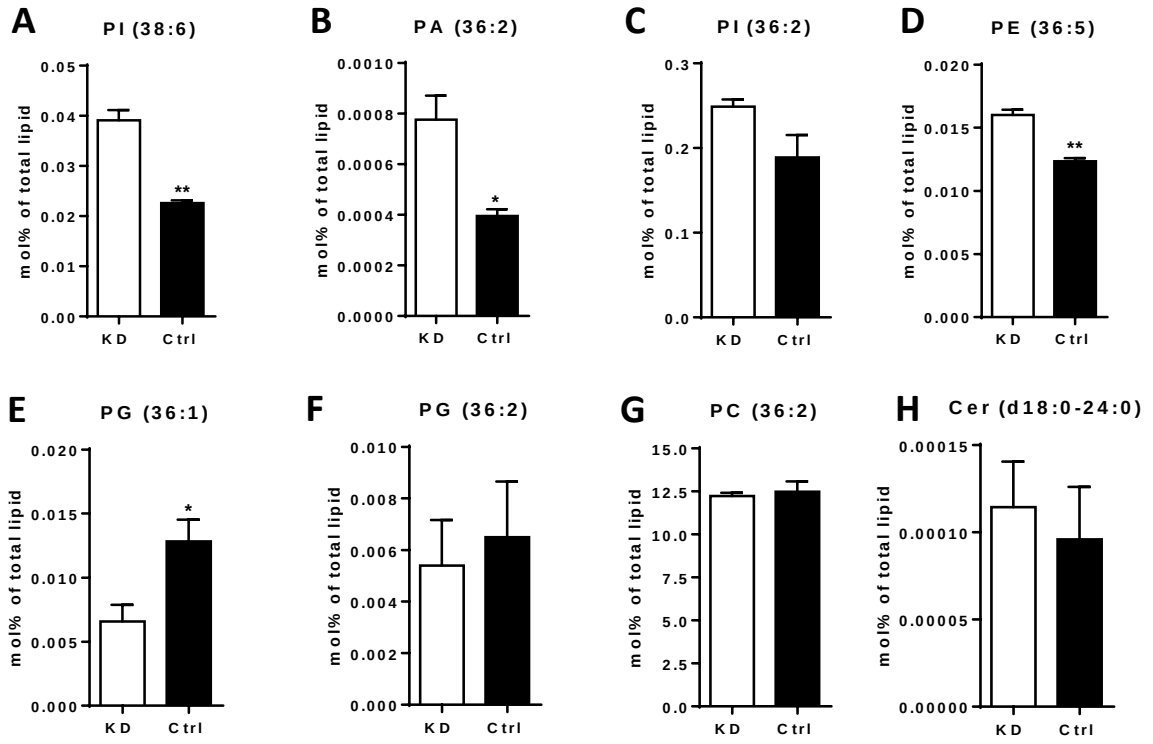


Figure 7. **Silencing of the ABCG1 expression in human primary hepatocytes recapitulated the action of ABCG1 on the HDL phospholipidome . A-D,** Quantification of selected phospholipid species by LC-MS/MS in HDL2 incubated with either control (Ctrl) or ABCG1 knockdown (KD) primary human hepatocytes. Data are means ± SEM, *p<0.05 and **p<0.005 vs controls. n=6 per group. Cer, ceramide; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol.

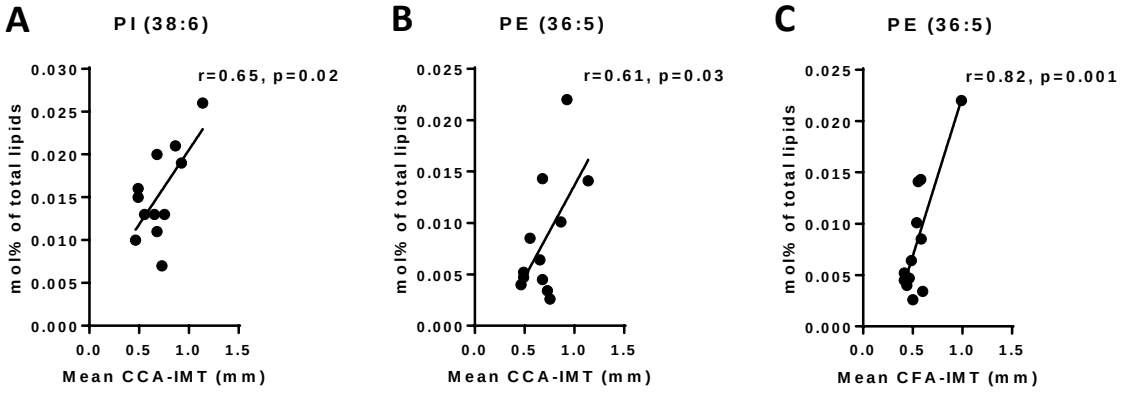
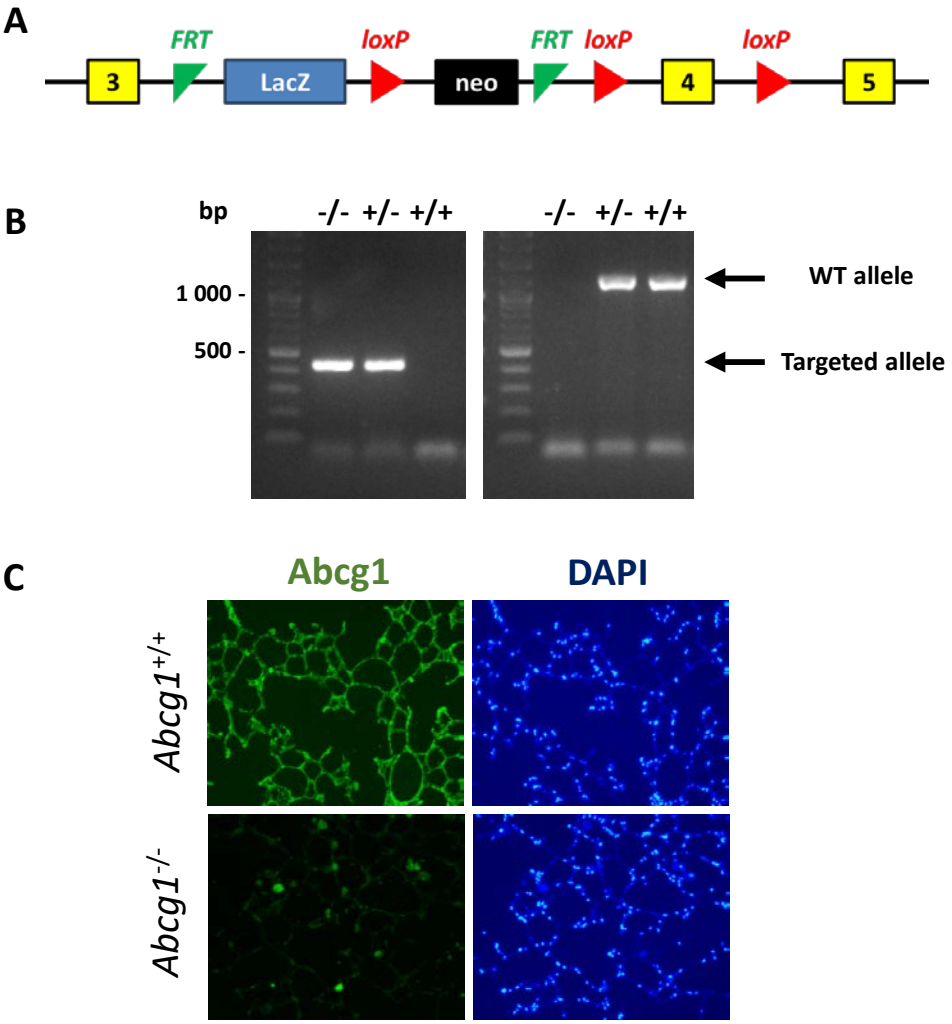
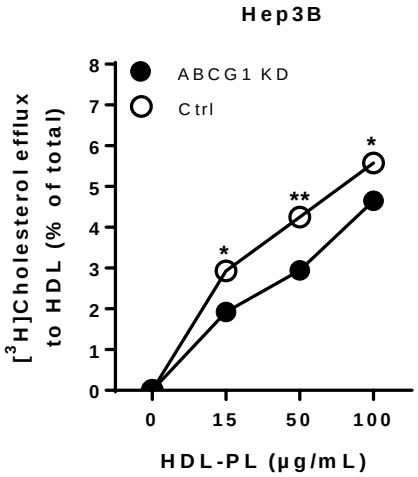


Figure 8. Remodeling of the HDL phospholipidome by ABCG1 was correlated with atherosclerosis. Correlation of HDL2 content in PI (38:6) (A) and PE (36:5) (B-C) with IMT of either the common carotid artery (CCA-IMT; A-B) or common femoral artery (CFA-IMT; C) in normolipidemic women (n=12); *r*, Pearson's correlation. PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol.

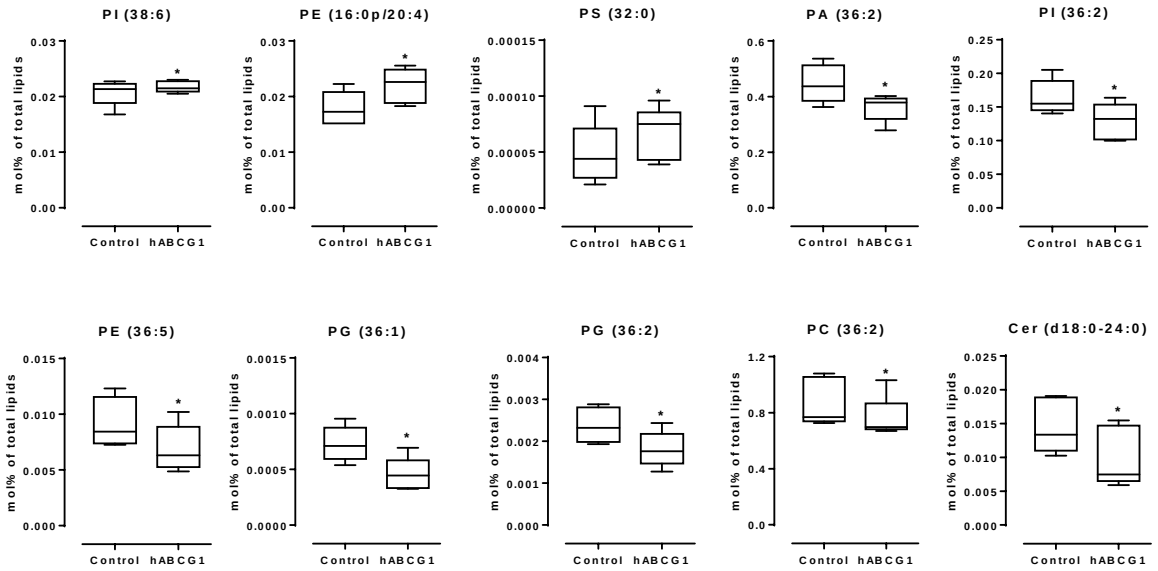
Supplemental figures.



Supplemental Figure 1. Generation of *Abcg1*$^{-/-}$ mice. A, Depiction of the targeted *Abcg1* locus. B, Amplification of genomic DNA with specific primers for the WT or the targeted allele. C, Abcg1 deficiency was confirmed by detection of Abcg1 (green) by immunofluorescence in lung from *Abcg1*$^{+/+}$ or *Abcg1*$^{-/-}$ mice. Nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (blue). Numbered yellow boxes correspond to exons. Neo, neomycin.



Supplemental Figure 2. **Hepatic ABCG1 expression promoted cholesterol efflux to HDL.** Cellular free [^{3}H]cholesterol efflux to HDL from control (Ctrl) and ABCG1 knockdown (KD) Hep3B cells. Data are means ± SEM, *p<0.05 and **p<0.005 vs controls; PL, phospholipid.



Supplemental Figure 3. **Remodeling of the HDL phospholipidome following the expression of human ABCG1.** Abundance of phospholipid species significantly altered in HDL following the expression of human ABCG1 in female mice (n=16) (*p<0.05 after FDR correction). Cer, ceramide; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; pPE, plasmalogen PE; PS, phosphatidylserine.

Supplemental tables.

Supplemental Table 1. Fasting plasma lipid and glucose levels in healthy normolipidemic women according to the rs1378577 SNP.

	ABCG1 rs1378577		
Fasting plasma lipid levels	**All (n=68)**	**T/T (n=40)**	**G/G (n=28)**
TC (mg/dL)	209.8±5.9	212.6±8.0	205.5±8.7
TG (mg/dL)	96.5±5.9	101.8±8.1	88.7±8.6
Glucose (mmol/L)	5.09±0.11	5.11±0.15	5.06±0.16
LDL-C (mg/dL)	130.9±5.7	133.6±8.1	127.0±7.6
HDL-C (mg/dL)	59.5±1.8	58.7±2.4	60.7±2.9
ApoA-I (g/L)	1.55±0.03	1.56±0.04	1.53±0.08
ApoB (g/L)	1.03±0.04	1.04±0.06	1.00±0.07
Lp(a) (mg/dL)	42.7±9.1	39.7±10.1	50.2±21.1

Only subjects carrying either the T/T or the G/G genotype for the rs1378577 (ABCG1 c. -134 T>G) SNP were selected for the study. Subjects were not receiving lipid-lowering therapy. TC: total cholesterol, TG: triglycerides, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, Apo: apolipoprotein, Lp(a): lipoprotein(a). Values are means±S.E.M.

Supplemental Table 2. Modulation of the HDL lipidome following the expression of human ABCG1.

Lipid species	Control		hABCG1		Remodeling
(normalized to PL)	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	
LPC (16:0)	1.13258	0.14522	1.039424	0.10925	
LPC (16:1)	0.01876	0.00193	0.01393	0.00085	
LPC (16:2)	0.00023	0.00005	0.00020	0.00003	
LPC (18:0)	0.79910	0.02638	0.79927	0.07340	
LPC (18:1)	0.20783	0.01526	0.19884	0.00634	
LPC (18:2)	0.26823	0.02098	0.23978	0.01524	
LPC (18:3)	0.00493	0.00045	0.00422	0.00034	
LPC (20:0)	0.00553	0.00076	0.00473	0.00050	
LPC (20:1)	0.00496	0.00062	0.00413	0.00042	
LPC (20:2)	0.00494	0.00072	0.00484	0.00059	
LPC (20:3)	0.02390	0.00274	0.02452	0.00302	
LPC (20:4)	0.07476	0.00992	0.07367	0.00815	
LPC (20:5)	0.00355	0.00055	0.00320	0.00037	
LPC (22:3)	0.00033	0.00005	0.00037	0.00007	
LPC (22:4)	0.00095	0.00009	0.00091	0.00014	
LPC (22:5)	0.00331	0.00048	0.00340	0.00095	
LPC (22:6)	0.03784	0.00295	0.03939	0.00449	
LPE (16:0)	0.01024	0.00097	0.00880	0.00088	
LPE (16:1)	0.00067	0.00009	0.00055	0.00006	
LPE (18:0)	0.01492	0.00096	0.01483	0.00246	
LPE (18:1)	0.01552	0.00416	0.01130	0.00118	
LPE (18:2)	0.01804	0.00220	0.01436	0.00116	
LPE (18:3)	0.00081	0.00018	0.00061	0.00006	
LPE (20:3)	0.00212	0.00035	0.00178	0.00017	
LPE (20:4)	0.02089	0.00215	0.01982	0.00260	
LPE (20:5)	0.00175	0.00023	0.00143	0.00016	
LPE (22:4)	0.00198	0.00032	0.00203	0.00037	
LPE (22:5)	0.00211	0.00035	0.00195	0.00034	
LPE (22:6)	0.02351	0.00341	0.02175	0.00376	
PA (34:1)	0.01210	0.00210	0.01055	0.00175	
PA (34:2)	0.02518	0.00556	0.01857	0.00350	
PA (36:1)	0.00295	0.00019	0.00241	0.00048	
PA (36:2)	0.44617	0.05297	0.36085	0.03280	
PA (36:3)	0.01672	0.00275	0.01207	0.00145	
PA (36:4)	0.02981	0.00275	0.02489	0.00240	
PA (40:5)	0.02238	0.00515	0.02440	0.00338	
PA (40:6)	0.04633	0.00778	0.04309	0.00152	
PC (28:0)	0.00763	0.00190	0.00853	0.00183	
PC (30:1)	0.10952	0.02172	0.08896	0.02086	
PC (30:2)	0.00282	0.00044	0.00264	0.00008	
PC (32:0)	0.17873	0.01214	0.16795	0.03416	
PC (32:1)	0.19680	0.03518	0.14328	0.01442	

PC (34:0)	0.09535	0.02281	0.10738	0.01813
PC (34:1)	1.95468	0.29839	1.70099	0.12852
PC (34:2)	1.09367	0.15859	0.93275	0.08559
PC (34:3)	0.05280	0.00622	0.04227	0.00497
PC (36:1)	0.50193	0.10156	0.47489	0.04000
PC (36:2)	0.87078	0.14706	0.75846	0.10928
PC (36:3)	0.31258	0.04708	0.28571	0.04623
PC (36:4)	1.29392	0.15754	1.38086	0.08645
PC (36:5)	0.12998	0.01430	0.12863	0.01271
PC (36:6)	0.00685	0.00070	0.00619	0.00063
PC (38:2)	0.01570	0.00290	0.01377	0.00180
PC (38:3)	0.11111	0.03152	0.11482	0.02079
PC (38:4)	1.15862	0.13338	1.22160	0.07613
PC (38:5)	0.59352	0.06220	0.58058	0.03315
PC (38:6)	1.41635	0.10816	1.40914	0.10012
PC (40:4)	0.02546	0.00349	0.02472	0.00313
PC (40:5)	0.07976	0.00797	0.07914	0.01464
PC (40:6)	0.48126	0.04946	0.55109	0.02875
PC (40:7)	0.22730	0.02653	0.23347	0.03663
PC (40:8)	0.02743	0.00343	0.02867	0.00457
PE (16:0p/18:2)	0.00527	0.00073	0.00517	0.00069
PE (16:0p/20:1)	0.00039	0.00006	0.00032	0.00007
PE (16:0p/20:2)	0.00014	0.00011	0.00017	0.0007
PE (16:0p/20:3)	0.00083	0.00026	0.00088	0.00019
PE (16:0p/20:4)	0.01785	0.00236	0.02199	0.00252
PE (16:0p/22:4)	0.00280	0.00032	0.00353	0.00071
PE (16:0p/22:5)	0.00243	0.00047	0.00282	0.00066
PE (16:0p/22:6)	0.02169	0.00389	0.02523	0.00259
PE (18:0p/18:1)	0.00406	0.00051	0.00447	0.00025
PE (18:0p/18:2)	0.02155	0.00278	0.01947	0.00189
PE (18:0p/18:3)	0.00348	0.00062	0.00297	0.00019
PE (18:0p/20:3)	0.00196	0.00027	0.00198	0.00045
PE (18:0p/20:4)	0.06057	0.00401	0.05899	0.00464
PE (18:0p/20:5)	0.00784	0.00093	0.00748	0.00052
PE (18:0p/22:6)	0.06069	0.00763	0.05960	0.00387
PE (18:0p/24:5)	0.00299	0.00043	0.00273	0.00021
PE (30:0)	0.00015	0.00004	0.00013	0.00003
PE (32:0)	0.00343	0.00062	0.00374	0.00089
PE (32:1)	0.00214	0.00057	0.00181	0.00048
PE (34:0)	0.00288	0.00032	0.00298	0.00055
PE (34:1)	0.03411	0.01262	0.02882	0.00823
PE (34:2)	0.06372	0.01547	0.04732	0.01126
PE (36:1)	0.00948	0.00269	0.00945	0.00244
PE (36:2)	0.14546	0.04028	0.10814	0.02386
PE (36:3)	0.04865	0.01137	0.036533	0.00958
PE (36:4)	0.07528	0.01115	0.06524	0.01443
PE (36:5)	0.00926	0.00183	0.00691	0.00156
PE (38:2)	0.00751	0.00194	0.00574	0.00096

PE (38:3)	0.01780	0.00299	0.01719	0.00275
PE (38:4)	0.10995	0.00770	0.091336	0.01195
PE (38:5)	0.07441	0.01448	0.06377	0.01291
PE (38:6)	0.10047	0.01466	0.08521	0.01819
PE (40:4)	0.00629	0.00106	0.00577	0.00085
PE (40:5)	0.00811	0.00150	0.00827	0.00120
PE (40:6)	0.02923	0.00411	0.02781	0.00237
PE (40:7)	0.02265	0.00319	0.02122	0.00436
PE (40:8)	0.00778	0.00126	0.00685	0.00046
PG (32:0)	0.00015	0.00003	0.00018	0.00002
PG (34:1)	0.00203	0.00061	0.001413	0.00027
PG (34:2)	0.00137	0.00019	0.00118	0.00019
PG (34:3)	0.00010	0.00001	0.00009	0.00001
PG (36:1)	0.00072	0.00011	0.00045	0.00010
PG (36:2)	0.00238	0.00034	0.00181	0.00029
PG (36:3)	0.00081	0.00016	0.00054	0.00007
PG (36:4)	0.00050	0.00009	0.00044	0.00008
PG (38:2)	0.00001	0.00002	0.00004	0.00002.
PG (38:3)	0.00026	0.00003	0.00024	0.00004
PG (38:4)	0.00062	0.00009	0.00052	0.00006
PG (38:5)	0.00015	0.00003	0.00012	0.00004
PG (38:6)	0.00017	0.00003	0.00016	0.00002
PG (40:6)	0.00015	0.00003	0.00013	0.00004
PG (40:7)	0.00010	0.00004	0.00011	0.00002
PI (32:0)	0.00146	0.00049	0.00115	0.00011
PI (32:1)	0.00224	0.00031	0.00208	0.00031
PI (34:1)	0.01675	0.00215	0.01320	0.00196
PI (34:2)	0.08948	0.01716	0.07949	0.01012
PI (36:1)	0.01467	0.00389	0.01198	0.00181
PI (36:2)	0.16461	0.01935	0.12856	0.02144
PI (36:3)	0.08672	0.00888	0.07295	0.00677
PI (36:4)	0.17447	0.01259	0.17149	0.01154
PI (38:2)	0.01417	0.00312	0.01373	0.00207
PI (38:3)	0.17788	0.03792	0.15424	0.02675
PI (38:4)	1.58835	0.13236	1.67214	0.09920
PI (38:5)	0.13199	0.02231	0.13164	0.01092
PI (38:6)	0.02072	0.00157	0.02176	0.00080
PI (40:4)	0.00615	0.00097	0.00579	0.00086
PI (40:5)	0.01901	0.00247	0.01897	0.00175
PI (40:6)	0.03922	0.00424	0.03844	0.00487
PI (40:7)	0.00484	0.00055	0.00503	0.00105
PS (32:0)	0.00004	0.00001	0.00006	0.00001
PS (32:1)	0.00004	0.00001	0.00005	0.00001
PS (34:0)	0.00003	0.00000	0.00004	0.00000
PS (34:1)	0.00021	0.00008	0.00026	0.00011
PS (34:2)	0.00541	0.00141	0.00548	0.00164
PS (34:3)	0.00097	0.00017	0.00137	0.00021
PS (36:1)	0.00036	0.00023	0.00049	0.00030

PS (36:2)	0.03598	0.01742	0.03711	0.01390
PS (36:3)	0.01348	0.00487	0.01474	0.00365
PS (36:4)	0.02966	0.01016	0.03683	0.01051
PS (38:2)	0.00359	0.00240	0.00301	0.00162
PS (38:3)	0.00896	0.00268	0.01633	0.00782
PS (38:4)	0.13177	0.03807	0.15008	0.04168
PS (38:5)	0.10820	0.05201	0.14565	0.02890
PS (38:6)	0.08966	0.03052	0.10520	0.02021
PS (40:4)	0.00992	0.00458	0.01503	0.00631
PS (40:5)	0.04996	0.01869	0.06033	0.02097
PS (40:6)	0.18103	0.05945	0.22319	0.04760
PS (40:8)	0.12304	0.05512	0.13751	0.03975
Cer (d18:0-24:0)	0.01460	0.00340	0.00996	0.00377
Cer (d18:1-14:0)	0.00009	0.00002	0.00006	0.00009
Cer (d18:1-16:0)	0.00775	0.00019	0.00817	0.00089
Cer (d18:1-18:0)	0.00240	0.00063	0.00285	0.00034
Cer (d18:1-19:0)	0.00015	0.00004	0.00017	0.00001
Cer (d18:1-20:0)	0.00051	0.00006	0.00047	0.00005
Cer (d18:1-22:0)	0.00347	0.00043	0.00297	0.00033
Cer (d18:1-23:0)	0.00327	0.00044	0.00284	0.00047
Cer (d18:1-24:0)	0.00674	0.00083	0.00596	0.00075
Cer (d18:1-24:1)	0.04293	0.00782	0.03691	0.00425
Cer (d18:1-25:0)	0.00155	0.00028	0.00135	0.00026
Cer (d18:1-26:0)	0.00029	0.00011	0.00027	0.00006
Cer (d18:1-26:1)	0.00029	0.00006	0.00025	0.00003
Cer (d18:2-16:0)	0.00019	0.00002	0.00020	0.00002
Cer (d18:2-18:0)	0.00023	0.00005	0.00029	0.00010
Cer (d18:2-20:0)	0.00011	0.00002	0.00010	0.00002
Cer (d18:2-21:0)	0.00003	0.00005	0.00002	0.00001
Cer (d18:2-22:0)	0.00087	0.00012	0.00081	0.00013
Cer (d18:2-23:0)	0.00073	0.00010	0.00060	0.00012
Cer (d18:2-23:1)	0.00005	0.00000	0.00004	0.00000
Cer (d18:2-24:0)	0.00136	0.00024	0.00116	0.00020
Cer (d18:2-24:1)	0.00374	0.00049	0.00317	0.00049
Cer (d18:2-24:2)	0.00018	0.00002	0.00019	0.00004
Cer (d18:2-26:0)	0.00002	0.00001	0.00001	0.00000
Cer (d18:2-26:1)	0.00003	0.00001	0.00002	0.00000
SM (32:1)	0.00999	0.00135	0.01054	0.00146
SM (34:1)	0.47044	0.07312	0.55111	0.12127
SM (34:2)	0.05044	0.00970	0.05456	0.00899
SM (36:1)	0.10010	0.01264	0.11518	0.01121
SM (36:2)	0.03901	0.00870	0.04132	0.00329
SM (38:1)	0.03140	0.00391	0.03561	0.00262
SM (38:2)	0.01495	0.00236	0.01587	0.00155
SM (40:1)	0.09229	0.00783	0.10652	0.00853
SM (40:2)	0.06470	0.00732	0.06651	0.00366
SM (41:1)	0.06231	0.00600	0.06892	0.00532
SM (41:2)	0.05640	0.00381	0.05548	0.00396

SM (42:1)	0.10387	0.04658	0.11362	0.03254	
SM (42:2)	0.62755	0.07133	0.63252	0.05412	
SM (42:3)	0.15810	0.02914	0.22119	0.06145	
SM (42:4)	0.01278	0.00262	0.01475	0.00321	

Lipidomic analysis by LC-ESI/MS/MS of total HDL isolated from *Abcg1*$^{-/-}$ mice following the injection of a control vector (Control) or expressing human ABCG1 (hABCG1). Impact of the hABCG1 expression on the amount of each lipid specie is indicated in green (decrease) or in red (increase). LPC. lysophosphatidylcholine; LPE. lysophosphatidylethanolamine; PA. phosphatidic acid; PC. phosphatidylcholine; PE. phosphatidylethanolamine; PG. phosphatidylglycerol; PI. phosphatidylinositol; PS. phosphatidylserine; Cer. ceramide; SM. sphingomyelin. Values are means±S.E.M (n=18 mice).

Etude n°2

Identification of ZNF471 as a modulator of DNA methylation and plasma lipid levels in cardiovascular diseases

Lise Hardy, Claire Perret, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Carole Proust, Thierry Huby, Philippe Lesnik, Maryse Guérin, Alain Carrié, Philippe Couvert, David-Alexandre Trégouët and Wilfried Le Goff

En préparation

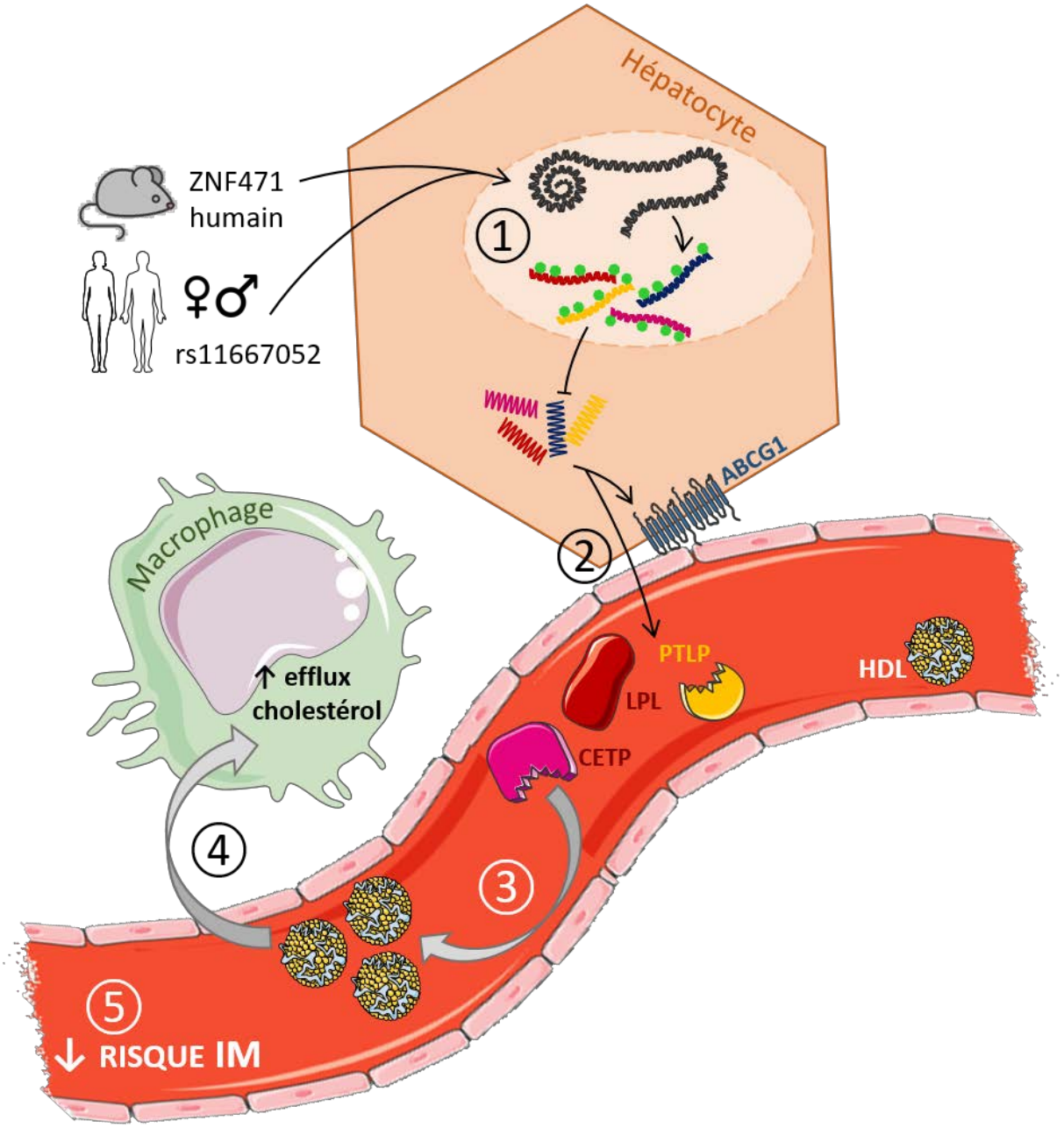


Schéma bilan 2

① L'expression de ZNF471 chez la souris, comme la présence du polymorphisme C rs11667052 chez l'Homme augmentent la méthylation sur les gènes codant les protéines CETP, ABCG1, LPL et PLTP, et diminuent leur expression. ② L'activité plasmatique des protéines est réduite. Le métabolisme des lipoprotéines HDL est ainsi altéré. ③ En conséquence, les concentrations de HDL-C circulantes sont augmenétes. ④ Les capacités d'efflux de cholestérol des HDL sont stimulées suite à l'expression de ZNF471 humain. ⑤ Enfin, ZNF471 rs11667052 influence le risque d'infarctus du myocarde (IM).

Identification of ZNF471 as a modulator of DNA methylation and plasma lipid levels in cardiovascular diseases

Authors

Lise Hardy[1], Claire Perret[1], Lucie Poupel[1], Eric Frisdal[1], Carole Proust[2], Thierry Huby[1], Philippe Lesnik[1], Maryse Guérin[1], Alain Carrié[1,3], Philippe Couvert[1,3], David-Alexandre Trégouët[2] and Wilfried Le Goff[1]

Affiliations

[1]Sorbonne Université, Inserm, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), UMR_S1166, Hôpital de la Pitié, Paris, F-75013, France

[2]Université de Bordeaux, Inserm, Bordeaux Population Health Research Center, U1219, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

[3]AP-HP Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Corresponding author

Wilfried Le Goff, PhD.

INSERM UMR_S1166

Faculté de médecine Sorbonne Université

91, boulevard de l'Hôpital

75013 Paris

France

Email : wilfried.le_goff@sorbonne-universite.fr

Keywords

ZNF471, DNA methylation, Lipid levels, Cardiometabolic diseases

Running title

Impact of ZNF471 on DNA methylation and plasma lipid levels

Abstract.

Context. Plasma lipid concentrations are closely linked to the development of cardiovascular diseases (CVD). Plasma levels of Low-Density Lipoprotein cholesterol are positively correlated to the incidence of CVD whereas those of High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C) are considered as protective. Recent studies revealed that epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, might contribute to the control of blood lipid concentrations and might affect cardiovascular risk. However, underlying molecular mechanisms are unknown.

Objective. The goal of this study was to identify novel pathways controlling DNA methylation and the determination of plasma lipid levels.

Methods and Results. Epidemiological studies in the MARTHA cohort led us to identify the association of a non-synonymous single nucleotide polymorphism (nSNP), rs11667052, located in a gene coding for a novel transcription factor, *ZNF471*, with both DNA methylation at *CETP* CpG sites and circulating cholesterol levels. Moreover, the *ZNF471* nSNP was associated to DNA methylation levels at *CETP* CpG sites, plasma CETP activity and to CVD in the ECTIM (Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde) study. Expression of human ZNF471 (hZNF471) in the liver of ApoB/CETP transgenic mice led to an increased DNA methylation at a *CETP* CpG site (+17%, $p<0.05$) and a reduced hepatic *CETP* mRNA levels (-78%, $p<0.05$) as compared to control animals. Plasma CETP activity and total cholesterol levels were decreased (-19% and -10%, respectively, $p<0.05$) upon hZNF471 expression, whereas an elevation of atheroprotective HDL-C (+57%, $p<0.05$) was observed. Plasma from hZNF471 mice showed a higher capacity to promote macrophage cholesterol efflux than those from control mice (+35%, $p<0.05$). In addition, liver expression of additional DNA methylation-sensitive key genes controlling lipid metabolism, *Lpl* (Lipoprotein lipase), *Pltp* (Phospholipid Transfer Protein) and *Abcg1* (ATP-Binding Cassette G1), was equally reduced in hZNF471 mice. In the Cardiogenics cohort, methylation levels of CpG sites in *CETP*, *ABCG1*, *LPL* and *PLTP* genes were associated with *ZNF471* expression levels in circulating monocytes and derived macrophages; such an association being influenced by *ZNF471* rs11667052.

Conclusions Our findings indicate that epigenetic modulation of lipid metabolism genes by ZNF471 might impact plasma lipid and lipoprotein levels and the incidence of CVD.

Introduction.

Plasma lipids and lipoproteins levels, such as low-density, high-density lipoproteins cholesterol (LDL-C, HDL-C, respectively) and post-prandial triglycerides(TG)-rich lipoproteins (TRL) are well-established risk factors for cardiometabolic disorders (CMD) including coronary artery disease (CAD), obesity and type 2 diabetes (T2D) that represent the most prevalent cause of morbidity and mortality in Western countries. These CMD risk factors are modifiable and demonstrate strong inter-individual variability whose deep characterization can help identifying novel therapeutic targets for cholesterol management and CMD prophylaxis.

Thus, because plasma LDL-C levels are positively correlated to the incidence of CAD[1], targeting the reduction of LDL-C has been widely validated as being an efficacious therapeutic goal in atherosclerosis and CAD. Pharmacological drugs such as statins (cholesterol synthesis inhibitors) have successfully achieved this goal during the last decades[2]. New promising molecules, including PCSK9 inhibitors, are currently tested in clinical trials and should help to strengthen the therapeutic arsenal available for CAD patients, although those molecules are intended to a very restricted population of patients. Indeed, PCSK9 inhibitors are proposed to patients for whom first-line treatment like statins cannot lower efficiently their cholesterol due to serious genetic defects as it is case in familial hypercholesterolemic patients carrying homozygous mutations in *APOB*, *LDLR* and *PCSK9* genes.

However, whatever the therapeutic option, a residual CAD risk still persists in treated patients[2] and new therapies are therefore needed in order to reduce this risk. Novel therapeutic strategies currently explored include the pharmacological increase of HDL-C[3], as circulating HDL-C levels are inversely associated to CAD risk[1,4]. Such association results from the atheroprotective properties of HDL particles notably the one related to reverse cholesterol transport (RCT). Indeed, HDL particles promote cholesterol efflux from the arterial wall, mostly from intimal lipid-laden macrophages, and its transport back to the liver for elimination. Through the RCT pathway, HDLs are proposed to reduce lipid accumulation in the arterial wall, atherosclerosis development and CAD related outcomes[5] and mortality[6]. More importantly, recent studies reported that cholesterol efflux from macrophage to HDL, is strongly inversely associated with both carotid intima-media thickness and the likelihood of angiographic coronary artery disease[7].

Recent studies pointed out that circulating lipid levels variability may be controlled by epigenetic mechanisms including DNA methylation. Thus, DNA methylation regulation of several genes implicated in lipid metabolism was reported to be associated with blood lipid levels, however molecular mechanisms underlying those effects are largely unknown[8]. We presently identified ZNF471, a transcription factor of

the zinc finger family, as a modulator of the expression of genes involved in the lipoprotein metabolism likely through an epigenetic mechanism which requires DNA methylation at CpG sites.

Materials & Methods.

In vivo expression of human ZNF471 in mice

Twelve-week aged male Tg human Apolipoprotein B (ApoB) / CETP (ApoB/CETP) mice (generated by breeding human CETP transgenic mice (line 5203) with mice transgenic for the human apoB gene as previously descrived[9]) fed on a standard chow diet were retro-orbitally injected with 40µg of either a hZNF471 expression vector (pCMV6-hZNF471-GFP, Origene#RG215696) or a control pmax-GFP vector (Lonza) using an *in vivo* transfection reagent (PepJet DNA In Vivo Transfection Reagent, SignaGen Laboratories) (injected volume = 200µl) under isoflurane anesthesia. Seven days following injection, blood samples were collected in Microvette tubes (Sarstedt) by retro-orbital bleeding under isoflurane anesthesia. Mice were weighted, euthanized and livers were isolated for RNA extraction and DNA methylation analysis by bisulfite conversion and pyrosequencing. Plasma samples were analyzed with an Autoanalyzer (Konelab 20) using reagent kits from Roche (total cholesterol) and ThermoElectron (HDL-cholesterol). A liver piece was excised, minced and digested in Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 2.5 mg/mL collagenase D (Roche, Boulogne Billancourt, France) for 30 min at 37°C under shaking and dissociated through a 200 µm pored cell strainer (Franklin lakes, NJ, USA). Hepatocytes were isolated following a brief centrifugation for 1 min at 1,000 rpm and stored at -80°C until use.

RNA extraction, reverse-transcription and quantitative-PCR

Total RNA from liver or isolated hepatocytes were extracted using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and real-time qPCR using a LightCycler LC480 (Roche) were performed as previously described[10]. Expression of mRNA levels was normalized to mouse hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*), mouse non-POU domain containing, octamer-binding housekeeping gene (*Nono*), mouse heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (*Hsp90ab1*) and mouse cyclophilin A (*CycA*). Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control values.

DNA methylation analyses in the MARTHA study

We measured genome-wide DNA methylation in whole blood samples of 350 individuals of the MARTHA (MARseille Thrombosis Association) study using the dedicated Illumina HumanMethylation450 array. A detailed description of the quality controls and the normalization procedures applied to the methylation

array data has previously been published[11]. Briefly, bisulfite conversion was performed on 1 µg genomic DNA for each sample using the Qiagen EpiTect 96 Bisulfite Kit and 200 ng of bisulfite-converted DNA at 50 ng/µl was independently amplified, labeled and hybridized to Infinium HumanMethylation450 BeadChip microarrays. For each sample, the intensities of the methylated and unmethylated signals were measured at 485,577 CpG sites using the Illumina iScan (with default settings). Three CpG sites at the *CETP* locus were investigated in the present work: cg09889350, cg12564453 and cg1660091. DNA methylation levels were expressed as a β-value, a continuous variable over the [0–1] interval, representing the percentage of methylation of a given CpG site.

Association of *ZNF471* genotypes with *CETP* CpG levels was tested using a linear regression analysis adjusted for age and sex. Correlation analyses between *CETP* CpG and lipids levels were investigated while adjusting for age, sex and cell type composition determined by specific biological counts of lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and basophils.

DNA methylation analysis of CETP CpG sites in the ECTIM study

Sodium bisulfite conversion was performed from 300 ng genomic DNA using EZ-96 DNA Methylation kit (ZymoResearch) from patients included in the ECTIM study (Cases, n=361, Controls, n=461, Study for Myocardial Infarction). From the resulting bisulfite DNA, a relative quantitative PCR was performed using 2 TaqMan MGB probes (Life Technologies) specific to methylated or unmethylated studied CpG and specific labelled with FAM or VIC reporter. The primers and probes design was performed with Primer Express software from the bisulfite converted DNA sequence. The primers and probes were chosen with no CpG island in there sequence, except the one to study. The sequences of the probes and primers were:

For cg09889350:

probe C $^{5'}$ AGTTTTATGTTTCGTG$^{3'}$(FAM) – probe T $^{5'}$ AGTTTTATGTTTTGTG$^{3'}$ (VIC)

primer F $^{5'}$ TAAAAATGGTGTAGATGGTGG$^{3'}$ – primer R $^{5'}$ CATAATTATCAAACAATAATATATAAATAACC$^{3'}$.

For cg125644538:

probe C $^{5'}$ AGTTTGGAGTTCGT$^{3'}$(FAM) – probe T $^{5'}$ TTAGTTTGGAGTTTGT$^{3'}$ (VIC)

primer F $^{5'}$ GTGGGTGTTTATGAAAAGATTT$^{3'}$ – primer R $^{5'}$ CTAAAACCAAAAAAACCCTACTAC$^{3'}$.

For cg16660091:

probe C $^{5'}$ TTAGGTTGAACGGT$^{3'}$(FAM) – probe T $^{5'}$ TAGGTTGAATGGTT$^{3'}$ (VIC)

primer F $^{5'}$ GGTGTAGATGGTGGAGGG$^{3'}$ – primer R $^{5'}$ AACATAATTATCAAACAATAATATATAAATAAC$^{3'}$.

Relative quantitative PCR was performed on a ABIPRISM7000 instrument (Life Technology) with Rox Passive Reference from 1.5µl of bisulfite converted DNA in total volume of 14µl. The reaction mix contained 200 nM of each MGB probe (Life technologies), 900 nM of each primer (Sigma – HPLC purified), 0.1 mM dNTP, 5 mM MgCl2, 0.1X Rox (Euromedex), 0.4U Immolase Taq and 1X ImmoBuffer (Bioline). The amplification program was: 95°C 10 min following by 45 cycles of 95°C 15sec - 58°C 1min. For each sample, the Ct for the two probes were determined with the same threshold, this threshold being defined with control DNA for which methylated value was known. For each sample, the formula "% methylation = $100/[1+2^{(Ctmeth-Ctunmeth)}]$" was applied to calculate the methylated percentage of the studied CpG. Association of *ZNF471* genotypes with CETP CpG levels was tested using a linear regression analysis adjusted for age

Analysis of DNA methylation by bisulfite conversion and pyrosequencing in mouse liver

Liver DNA from ApoB/CETP mice was extracted using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) and converted through bisulfite treatment for methylation analysis using the Premium Bisulfite kit (Diagenode) according to the manufacturer's instructions. Amplification of a 366 bp fragment of the human CETP promoter gene encompassing 11 CpG sites and including the 3 incriminated CpG sites (cg09889350, cg12564453 and cg16660091) was carried out by polymerase chain reaction using the following primers (forward : 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATATTGATATTTATATATTAGGAGGGTAG-3' and reverse : 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAAAAACAAATAAAAATTAAAATACTCTTATT-3'). Quality of amplicons was validated onto a 2% agarose gel and PCR products were pyrosequenced on a PyroMark Q96 MD system using the PyroMark Gold Q96 CDT reagent kit and Pyro Q-CpG software (Qiagen).

Cellular free cholesterol efflux assays

Human THP-1 macrophages were labeled with 1µCi/ml [3H]cholesterol for 24 hours in the presence of 50µg/ml acetylated LDL (acLDL) in a RPMI medium containing 2mM Glutamine, 50mM Glucose and 0.2% BSA (RGGB). Cells were then equilibrated in RGGB medium for an additional period of 16 hours. Cellular cholesterol efflux to 0.5% mouse serum was assayed in RGGB medium for a 4-hour chase period. Finally, culture media were harvested and cleared of cellular debris by brief centrifugation. Cell associated radioactivity was determined by extraction in hexan-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).

Cardiogenics study population

Individuals included in this analysis have been collected as part of the Cardiogenics Consortium[12]. They were composed of 479 individuals of white European origin with (n=241) or without (n=238) a history of coronary artery disease and recruited in five centres (Cambridge and Leicester, UK; Lübeck and Regensburg, Germany; Paris, France). Fasting venous blood samples were collected from all the participants into EDTA. All patients have been typed for genome-wide genotypes from whole blood DNA using the Human Quad Custom 670 array (Illumina). mRNA expression from isolated CD14+ monocytes and derived macrophages were quantified using the HumanRef-8 v3 Beadchip array (Illumina)[13]. Large-scale analysis of methylation in whole blood DNA was previously conducted using the Infinium Human Methylation450K array (Illumina)[11].

Expression quantitative trait loci (eQTL) and DNA methylation analysis

The effect of *ZNF471* expression on DNA methylation was analyzed by selecting all CpG sites for *CETP*, *LPL*, *ABCG1* and *PLTP* after adjustment for age, sex, centre, blood cell composition as fixed effects with batch and chip as random effects. Association of *ZNF471* rs11667052 on gene expressions was tested using regression linear models under the assumption of additive allele effects with the same adjustments as above. Note that this polymorphism was available on the DNA array and had not had to be imputed.

Statistical analysis

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.

Association of a nonsynonymous polymorphism of *ZNF471* with DNA methylation at the CETP locus.. In a sample of 350 patients with venous thrombosis from the MARTHA study[14], whose whole blood DNA was epityped with the Illumina H450K DNA methylation array, we observed an association between the nonsynonymous rs62123030 (G 0,8 > C 0,2) polymorphism of *ZNF471* and whole blood DNA methylation levels at five CpG sites located in the *CETP* gene promoter (cg09889350, cg01706698, cg12564453, cg16660091 and cg26624021). As an illustration, the common *ZNF471* rs62123030 G was associated with increased DNA methylation at CpG cg09889350 (Figure 1A). We replicated this association in an independent sample of 822 individuals part of the ECTIM study[15], a case-control study for arterial thrombosis. In the ECTIM sample composed of 361 patients with myocardial infarction and 461 healthy controls, all males, whole blood DNA methylation at *CETP* CpG sites were measured using a bisulfite PCR assay. As shown in Figure 1B, the common rs62123030 G allele was significantly ($p = 0.0025$) associated with increased CpG cg09889350 levels, consistently to what observed in the MARTHA cohort epityped for the H450K array. Similar patterns were obtained for the four other *CETP* CpG sites (data not shown). Of note, this association was slightly enhanced in the sample of 361 cases (additive effect of the G allele $\beta = +0.27$, $p = 0.02$) than in the sample of 461 controls ($\beta = +0.13$, $p = 0.10$). Also of interest were the observations of lower *CETP* CpG cg09889350 levels in cases than in controls ($p=5.83\ 10^{-4}$) and in smokers compared to non-smoker individuals ($p= 1.25\ 10^{-4}$) of the ECTIM study (Figure 2). Despite differences in study sampling scheme, DNA methylation measurements and data processing between the hypothesis-generating MARTHA study and the replication ECTIM study, those data provide strong support for *ZNF471* genetic polymorphisms (the rs62123030 or any other variation in very strong linkage disequilibrium with it i.e $r^2 >0.8$) associated with whole blood DNA methylation levels at the *CETP* locus.

Interestingly, methylation levels at the *CETP* CpG sites were correlated to plasma HDL, LDL and total cholesterol in both MARTHA and ECTIM, and these correlations were modulated by the rs62123030 genotype. For example, in the ECTIM population, the correlation between CpG cg09889350 and HDL-C was $\rho = 0.11$ ($p = 0.02$) in the 459 carriers of the GG genotype and $\rho = 0.01$ ($p =0.84$) in the 330 carriers of the C allele. As CETP activity had been previously measured in ECTIM participants[16], we investigated where this genotype also influences the correlation between CpG cg09889350 levels and CETP activity. In GG carriers, CpG levels and CETP activity were not correlated ($\rho =0.05$; $p = 0.30$) while they were negatively correlated in C carriers ($\rho = -0.15$; $p = 4.72\ 10^{-3}$).

Taken together, those data indicate that methylation of *CETP* CpG sites and plasma lipid levels are affected by a polymorphism located in the *ZNF471* gene, suggesting that *ZNF471* genetically influences the epigenetic regulation of *CETP* that further contributes to circulating lipid levels variability and cardiovascular diseases.

***In vitro* expression of human ZNF471 represses CETP mRNA levels in human hepatocytes.** In order to test if ZNF471 modulates the expression of CETP, we overexpressed ZNF471 using an expression vector coding for a human ZNF471 protein tagged with GFP. Analysis of the cellular localization of ZNF471-GFP in both Hep3B and CHO cells confirmed the nuclear localization of ZNF471 as previously reported (Ref. Cao Oncogene 2018) (Figure 3A). Interestingly, the transient overexpression of human ZNF471 (hZNF471) in HepG2 cells (Figure 3B) led to a significant decrease of *CETP* mRNA levels (Figure 3C; -22%, $p<0.05$) which is coherent with a repressive mechanism involving an increased DNA methylation of *CETP* CpG sites as observed in our epidemiological studies.

***In vivo* expression of human ZNF471 affects plasma lipid levels and macrophage cholesterol efflux.** In order to validate our findings *in vivo*, we evaluated the effect of the expression of hZNF471 in the Tg human Apolipoprotein B (ApoB) / CETP (ApoB/CETP) (as CETP is lacking in mice) mouse model which displays a “humanized” lipid metabolism more prone to reproduce effects expected on human lipid metabolism. Indeed, plasma cholesterol in mice is mostly carried by HDL (ApoA-I-containing lipoproteins) and not by LDL or VLDL (ApoB-containing lipoproteins) as it occurs in humans. Introduction of the human ApoB transgene in CETP Tg mice allows a plasma phenotype similar to that observed in humans, with a predominance of plasma cholesterol carried by ApoB-containing particles.

To achieve this goal, hZNF471 was expressed in ApoB/CETP mice following the retro-orbital injection (PepJet DNA In Vivo Transfection Reagent) of a hZNF471 expression vector (pCMV6-hZNF471-GFP). Retro-orbital injection of this cationic peptide (PepJet DNA In Vivo Transfection Reagent) was described to allow a high in vivo delivery efficiency to the liver which is the key organ controlling lipid metabolism.

Injection of the hZNF471 expression vector in ApoB/CETP mice led to a significant decrease of plasma total cholesterol levels as compared to animals injected with a control plasmid (pmaxGFP) after 7 days (Figure 4A). More importantly, an increase of plasma HDL-C levels was observed following injection of hZNF471 whereas those of animals injected with the control vector were not significantly affected. In agreement with this marked increase of plasma HDL-C levels, capacity of plasmas from mice

injected with the hZNF471 expression vector to promote cholesterol efflux from human THP-1 macrophages was enhanced by 35% ($p<0.05$) (Figure 4C) as compared to control animals. This result is of particular interest as plasma cholesterol efflux capacity from macrophages, a metric of HDL function, is strongly inversely associated with both carotid intima-media thickness and the likelihood of angiographic coronary artery disease[7].

In vivo experiments in a "humanized" lipid metabolism mouse model indicate that the expression of human *ZNF471* is able to reduce the atherogenicity of plasma lipid phenotype.

Modulation of liver expression of key lipid metabolism genes following in vivo expression of human ZNF471. Seven days following the injection of the hZNF471 expression vector, a robust expression of hZNF471 mRNA levels was detected in hepatocytes isolated from livers of ApoB/CETP mice (Figure 5A). In addition, liver expression of hZNF471 led to an increased methylation of a promoter *CETP* CpG site, a reduction of *CETP* mRNA levels together with a decrease of plasma CETP activity as compared to control animals (Figure 5B-C). Moreover, liver gene expression analysis revealed that the increased expression of hZNF471 represses not only *CETP*, but also three additional murine genes involved in lipid metabolism, *Pltp, Lpl* and *Abcg1* coding respectively for Phospholipid Transfer Protein, Lipoprotein Lipase and ATP-Binding Cassette G1 (Figure 6 and supplemental Figure 1). Taken together these results indicate that ZNF471 not only modulates the expression of CETP but of a set of genes controlling lipoprotein metabolism.

Association of CpG sites DNA methylation levels into genes identified in epidemiological and in vivo studies with ZNF471 rs11667052 and ZNF471 expression in human monocytes and derived macrophages. To determine if these genes might be targets of ZNF471 in humans, eQTL analysis was performed in a subset of the Cardiogenics cohort. Analysis of *ZNF471* expression in human monocytes and derived macrophages from 479 individuals of the Cardiogenics Consortium indicated that the expression of *ZNF471* in human monocytes was significantly correlated to whole blood methylation levels at *CETP* CpG sites (cg26624021, cg01706698, cg03232842, cg09889350 and cg16660091) but also to those at CpG sites located in candidates genes (*PLTP*, cg20105087, cg26321644 and cg01236081; *ABCG1*, cg00222799 and cg26767954 and *LPL*, cg22108175 and cg04649769) (Table 1); the most significant effect being observed at the *PLTP* CpG site cg20105087 ($p=0.002$). Highly significant correlations were observed between *ZNF471* expression in human macrophages and methylation levels

at *CETP* CpG sites (cg09889350, cg26624021, cg01706698, cg16660091, cg03232842 and cg12564453) and to a lesser degree at the *LPL* CpG site cg07263235 (Table 1). However, no correlations were detected at CpG sites in the *PLTP* and *ABCG1* genes in macrophages.

In this subset of individuals of the Cardiogenics cohort, the non-synonymous ZNF471 rs11667052 variant (C/A: 0,76/0,24, Met→Ile), which is in complete linkage disequilibrium (LD) with rs62123030 (r^2=1) was associated with whole blood methylation at *CETP* (cg01706698, cg03232842, cg09889350, cg16660091, cg26624021, cg12564453 and cg03186069), *LPL* (cg20435463) and *ABCG1* (cg05639842) CpG sites (Table 2). Further analysis revealed an interaction between rs11667052 and *ZNF471* expression on whole blood DNA methylation levels at *CETP*, *ABCG1*, *LPL* and *PLTP* CpG sites (Table 3). As a whole, those findings indicate that both the *ZNF471* rs11667052 (or any other variant in perfect LD with it) and *ZNF471* monocyte/macrophage expression are associated with whole blood DNA methylation at *CETP* CpG sites but also at CpG sites in *LPL*, *ABCG1* and *PLTP* genes then supporting the idea that ZNF471 might modulate the expression of these genes through DNA methylation.

Discussion.

Altogether, the present study points out to a novel transcription factor, ZNF471, as a new player in modulating plasma cholesterol levels through epigenetic modulation of key genes controlling lipid metabolism. Those data indicate that *ZNF471* SNPs may be valid indicators of the action of ZNF471 on DNA methylation and potentially the expression of several genes involved in the lipid metabolism in humans. In this context, it can be envisaged that exploration of the *ZNF471* genotype could be a useful tool in precise medicine for modulation of cholesterol metabolism.

Indeed, the present transversal exploration of the role of ZNF471 by epidemiological, *in vitro* and *in vivo* studies led us to propose that this transcription factor, for which only few information are available in the literature, represses the expression of *CETP* and others genes involved in cholesterol metabolism i.e. *LPL*, *PLTP* and *ABCG1* very likely through the methylation of CpG sites within these genes. In agreement with our findings, DNA methylation of *CETP*, *PLTP, LPL* and *ABCG1* genes was recently reported to contribute independently to plasma lipid levels in hypercholesterolemic individuals[17]. Moreover, DNA methylation at *ABCG1* CpG sites was reported to be associated with plasma HDL-C levels in several studies and to predict incident coronary heart disease events [18–21]. A role of ZNF471 on CVD is supported by our observation in ECTIM that the modulation of methylation at *CETP* CpG sites by the *ZNF471* SNP was associated with myocardial infarction.

Our study does not however provide direct evidences that ZNF471 modulates the DNA methylation of the target genes. Our knowledge on molecular mechanisms through which ZNF transcription factors control the gene expression allows us to draw a mechanism for the mode of action of ZNF471. Family of ZNF contains more than 400 different proteins, expressed in various tissues in human[22]. ZNF471 possesses a classical zinc finger structure allowing the three-dimensional stabilization of α helix and β sheet: two cysteine (C) and two histidine (H) (C_2H_2 type) residues are linked through this ion zinc. This three-dimensional arrangement allows attachment of the ZNF protein on DNA sequence. ZNF contains a KRAB (Krüppel Associated Box) domain, which has a strong repressor activity. KRAB domain permits the recruitment and binding of KAP1 (KRAB-Associated Protein 1) protein, a corepressor implicated in the recruitment of others partners. Indeed, this ZNF-KRAB-KAP1 complex is able to modulate epigenetic through histones modifications (acetylation and/or methylation) and/or DNA methylation[23,24]. To achieve this role, the complex is able to recruit HP1 (Heterochromatin Protein 1) and to read methylation levels on the lysine 9 of histone 3, HDAC (Histone Deacetylase), HAT (Histone Acetylase) or DNMT (DNA Methyltransferase) proteins[25,26]. For instance, ZNF202, a C_2H_2 ZNF type

transcription factor such as ZNF471, has been showed to be a modulator of apolipoproteins *Apo A-IV*, *Apo C-III* and *Apo E*[27] and *ABCA1* (ATP-Binding Cassette A1) and *ABCG1* gene expression[28], all of them being implicated in lipid metabolism. Thus, the reduced expression of *ABCA1* and *ABCG1* by ZNF202 transfection diminishes phospholipid and cholesterol efflux to Apo A-I and HDL from Raw 264.7 murine macrophages[28].

We were not able to detect any modification in the expression of *KAP1*, *KDM1A* (Lysine Demethylase 1A), *DNMT1* or *DNMT3* following ZNF471 expression (data not shown). Taken together, we therefore propose that ZNF471 represses the expression of CETP, LPL, PLTP and ABCG1 through its binding to their DNA sequence and the recruitment of KAP1 and DNMT3A or DNMT3B; these latter being able to perform the *de novo* DNAmethylation at CpG sites. Unfortunately, the use of anti-GFP or anti-ZNF471 antibodies commercially available did not allow to immunoprecipitate ZNF471 and associated proteins in order to validate this mechanism. Ongoing transcriptomic (RNA-sequencing) and DNA methylation (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) analysis in liver samples from hZNF471 and control mice will provide important information about the role of ZNF471 on gene expression. However, we need to keep in mind that ZNF471 is a transcription factor that very likely modulates the expression of numerous genes implicated in cellular pathways other than lipid metabolism. Indeed, ZNF471 expression was previously characterized in human tumors; *ZNF471* gene being hypermethylated in patients with squamous cell carcinoma of the tongue[29] or gastric cancer[30]. As a consequence, the reduced ZNF471 expression was associated with a reduced survival of patients[30].

Although *ABCG1* expression was not reported to determine plasma HDL-C concentrations[31–33], a large body of evidence indicates that a reduced expression of *PLTP*, *LPL* and *CETP* led to an increase of circulating levels of HDL-C [34,35]. More especially, CETP inhibitors have been developed for a therapeutic use as elevated plasma HDL-C levels are largely described to be inversely associated with in ASCVD[36]. In this context, the inhibition of *CETP*, *LPL*, *PLTP* expression and in some extend that of *ABCG1*, observed in the present study following the expression of *ZNF471* is coherent with an elevation of plasma HDL-C levels and a subsequent increased capacity of plasma to promote macrophage cholesterol efflux. Therefore, our findings suggest that the pharmacological increase of *ZNF471* expression might have a benefical action on ASCVD through the raising of HDL-C. Interestingly, the expression of human *ZNF471* in ApoB/CETP mice was equally accompanied by a reduction of total cholesterol levels; such a decreased of non-HDL cholesterol being detected in patients treated with CETP inhibitors[36].

Beyond of the use of pharmacological tools for increasing ZNF471 which remain to be identified, our study rather led us to propose that the *ZNF471* genotype could serve as a biological marker for stratifying patients and to propose a personalized medicine strategy for treating cardiovascular diseases through lipid-lowering therapy. More especially, the *ZNF471* rs11667052 (or any other variant in perfect LD with it) might be used to predict the response of patients to CETP inhibitors which mostly failed to reduce CVD in clinical trials[37–39]. Indeed, among the four CETP inhibitors developed by pharmaceutical companies, only Anacetrapib was reported to decrease the risk of CV events[40]. Then, it can be anticipated that individuals homozygous for the rare allele of *ZNF471* rs11667052 (AA, low *ZNF471* expression) which are expected to exhibit both a high CETP expression and activity would benefit from the CETP inhibition. By contrast, the CC carriers (high *ZNF471* expression) would be poor responders of CETP inhibition because of the low CETP expression and activity in those individuals. Such a pharmacogenomic approach was recently used in order to predict the response to the CETP inhibitor Dalcetrapib on the incidence of CVD[41]. Thus, Tardif et al. identified a polymorphism of the Adenylate Cyclase 9 (*ADCY9*) gene able to identify patients who will benefit from the treatment with Dalcetrapib. However, the use of this genetic biomarker failed to predict the response to Evacetrapib, another CETP inhibitor, indicating that *ADCY9* SNPs was a biomarker to the Dalcetrapib drug rather than the CETP inhibition[42]. In this context, the *ZNF471* rs11667052 might be a useful pharmacogenomic tool to identify patients for which CETP inhibitors would be efficient for reducing CVD.Although additional investigations are needed to elucidate the molecular mechanisms through which ZNF471 exerts its epigenetic control of gene expression, the present study provides important information in the understanding of the relation between DNA methylation and determination of plasma lipid levels. Finally, our findings identify ZNF471 as a potential therapeutic target and a novel pharmacogenomic tool for personalized medicine.

References.

1. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* **62**, 707–714 (1977).
2. Adhyaru, B. B. & Jacobson, T. A. Safety and efficacy of statin therapy. *Nat Rev Cardiol* **15**, 757–769 (2018).
3. Kingwell, B. A., Chapman, M. J., Kontush, A. & Miller, N. E. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 445–464 (2014).
4. Ko, D. T. *et al.* High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cause-Specific Mortality in Individuals Without Previous Cardiovascular Conditions: The CANHEART Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **68**, 2073–2083 (2016).
5. Rohatgi, A. *et al.* HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2383–2393 (2014).
6. Guerin, M. *et al.* Association of Serum Cholesterol Efflux Capacity With Mortality in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 3259–3269 (2018).
7. Khera, A. V. *et al.* Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **364**, 127–135 (2011).
8. Braun, K. V. E. *et al.* The role of DNA methylation in dyslipidaemia: A systematic review. *Prog. Lipid Res.* **64**, 178–191 (2016).
9. El Khoury, P. *et al.* Extended-Release Niacin/Laropiprant Improves Overall Efficacy of Postprandial Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 285–294 (2016).
10. Larrede, S. *et al.* Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1930–1936 (2009).
11. Dick, K. J. *et al.* DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet* **383**, 1990–1998 (2014).

12. Samani, N. J. *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **357**, 443–453 (2007).

13. Heinig, M. *et al.* A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk. *Nature* **467**, 460–464 (2010).

14. Germain, M. *et al.* Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. *Am. J. Hum. Genet.* **96**, 532–542 (2015).

15. Tregouet, D.-A. *et al.* In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 775–781 (2004).

16. Corbex, M. *et al.* Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction. *Genet. Epidemiol.* **19**, 64–80 (2000).

17. Guay, S.-P., Brisson, D., Lamarche, B., Gaudet, D. & Bouchard, L. Epipolymorphisms within lipoprotein genes contribute independently to plasma lipid levels in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics* **9**, 718–729 (2014).

18. Petersen, A.-K. *et al.* Epigenetics meets metabolomics: an epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. *Hum Mol Genet* **23**, 534–545 (2014).

19. Pfeiffer, L. *et al.* DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ Cardiovasc Genet* **8**, 334–342 (2015).

20. Braun, K. V. E. *et al.* Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: the Rotterdam Study. *Clin Epigenetics* **9**, 15 (2017).

21. Hedman, Å. K. *et al.* Epigenetic Patterns in Blood Associated With Lipid Traits Predict Incident Coronary Heart Disease Events and Are Enriched for Results From Genome-Wide Association StudiesCLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics* **10**, e001487 (2017).

22. Cassandri, M. *et al.* Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* **3**, 17071 (2017).

23. Quenneville, S. *et al.* The KRAB-ZFP/KAP1 system contributes to the early embryonic establishment of site-specific DNA methylation patterns maintained during development. *Cell Rep* **2**, 766–773 (2012).

24. Rowe, H. M. *et al.* De novo DNA methylation of endogenous retroviruses is shaped by KRAB-ZFPs/KAP1 and ESET. *Development* **140**, 519–529 (2013).

25. Urrutia, R. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol.* **4**, 231 (2003).

26. Feschotte, C. & Gilbert, C. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 283–296 (2012).

27. Wagner, S. *et al.* A broad role for the zinc finger protein ZNF202 in human lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* **275**, 15685–15690 (2000).

28. Porsch-Ozcurumez, M. *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. *J. Biol. Chem.* **276**, 12427–12433 (2001).

29. Bhat, S. *et al.* Gene promoter-associated CpG island hypermethylation in squamous cell carcinoma of the tongue. *Virchows Arch.* **470**, 445–454 (2017).

30. Cao, L. *et al.* Zinc-finger protein 471 suppresses gastric cancer through transcriptionally repressing downstream oncogenic PLS3 and TFAP2A. *Oncogene* **37**, 3601–3616 (2018).

31. Furuyama, S. *et al.* Genotypic Effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men. *J. Atheroscler. Thromb.* **16**, 194–200 (2009).

32. Xu, Y. *et al.* A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis* **219**, 648–654 (2011).

33. Liu, F. *et al.* ABCG1 rs57137919G>a polymorphism is functionally associated with varying gene expression and apoptosis of macrophages. *PLoS ONE* **9**, e97044 (2014).

34. Haraki, T. *et al.* Clinical characteristics of double heterozygotes with familial hypercholesterolemia and cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* **132**, 229–236 (1997).

35. Vergeer, M. *et al.* Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N. Engl. J. Med.* **364**, 136–145 (2011).

36. Tall, A. R. & Rader, D. J. Trials and Tribulations of CETP Inhibitors. *Circ. Res.* **122**, 106–112 (2018).

37. Barter, P. J. *et al.* Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2109–2122 (2007).

38. Schwartz, G. G. *et al.* Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2089–2099 (2012).

39. Lincoff, A. M. *et al.* Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1933–1942 (2017).

40. HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group *et al.* Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1217–1227 (2017).

41. Tardif, J.-C. *et al.* Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib. *Circ Cardiovasc Genet* **8**, 372–382 (2015).

42. Nissen, S. E. *et al.* ADCY9 Genetic Variants and Cardiovascular Outcomes With Evacetrapib in Patients With High-Risk Vascular Disease: A Nested Case-Control Study. *JAMA Cardiol* **3**, 401–408 (2018).

Tables.

Cell type	Methylation probe	Gene	β	SE	*P* Value
Monocyte	cg20105087	*PLTP*	0.026	0.008	0.002
	cg26624021	*CETP*	0.050	0.018	0.005
	cg01706698	*CETP*	0.020	0.007	0.006
	cg03232842	*CETP*	0.026	0.010	0.011
	cg00222799	*ABCG1*	0.024	0.010	0.019
	cg26767954	*ABCG1*	-0.004	0.002	0.020
	cg22108175	*LPL*	-0.029	0.013	0.022
	cg04649769	*LPL*	0.017	0.007	0.022
	cg26321644	*PLTP*	-0.007	0.003	0.035
	cg09889350	*CETP*	0.027	0.013	0.039
	cg16660091	*CETP*	0.031	0.015	0.042
	cg01236081	*PLTP*	0.014	0.007	0.045
Macrophage	cg09889350	*CETP*	0.041	0.011	1.18E-04
	cg26624021	*CETP*	0.054	0.015	2.20E-04
	cg01706698	*CETP*	0.021	0.006	4.78E-04
	cg16660091	*CETP*	0.041	0.012	9.85E-04
	cg03232842	*CETP*	0.028	0.009	1.29E-03
	cg12564453	*CETP*	0.023	0.009	0.011
	cg07263235	*LPL*	0.022	0.011	0.044

Table 1. Association between methylation levels at selected *CETP*, *ABCG1*, *LPL* and *PLTP* CpG sites and *ZNF471* expression in human monocytes and derived macrophages. Estimates are for a unit increase in log2 *ZNF471* expression (ILMN_2191720).

Methylation probe	Gene	β	SE	*P* Value
cg01706698	*CETP*	-0.0234	0.0024	3.08E-23
cg03232842	*CETP*	-0.0288	0.0034	1.56E-17
cg09889350	*CETP*	-0.0306	0.0044	2.46E-12
cg16660091	*CETP*	-0.0347	0.0051	9.68E-12
cg26624021	*CETP*	-0.0373	0.0060	7.24E-10
cg12564453	*CETP*	-0.0202	0.0037	7.04E-08
cg03186069	*CETP*	-0.0031	0.0013	0.0169
cg20435463	*LPL*	-0.0079	0.0035	0.0266
cg05639842	*ABCG1*	-0.0015	0.0008	0.0437

Table 2. Association between methylation levels at selected *CETP*, *ABCG1* and *LPL* CpG sites and the non-synonymous *ZNF471 SNP* rs11667052. Values are for the rs11667052 A allele.

Cell type	Methylation probe	Gene	*P* Value
Monocyte	cg01176028	*ABCG1*	0.008
	cg07072366	*LPL*	0.018
	cg23611945	*PLTP*	0.027
	cg03232842	*CETP*	0.038
	cg14982472	*ABCG1*	0.043
	cg08918749	*LPL*	0.046
	cg22108175	*LPL*	0.046
	cg01706698	*CETP*	0.047
	cg11662315	*ABCG1*	0.049
Macrophage	cg00222799	*ABCG1*	0.002
	cg09863247	*PLTP*	0.002
	cg06500161	*ABCG1*	0.007
	cg05046272	*ABCG1*	0.013
	cg20214535	*ABCG1*	0.013
	cg26768067	*ABCG1*	0.016
	cg02370100	*ABCG1*	0.017
	cg08918749	*LPL*	0.019
	cg07397296	*ABCG1*	0.020
	cg07072366	*LPL*	0.024
	cg23611945	*PLTP*	0.039
	cg16125291	*LPL*	0.042
	cg27243685	*ABCG1*	0.044

Table 3. *P* values of the interaction test between rs11667052 polymorphism and *ZNF471* expression on whole blood DNA methylation levels at selected *CETP, ABCG1, LPL* and *PLTP* CpG sites.

Figures.

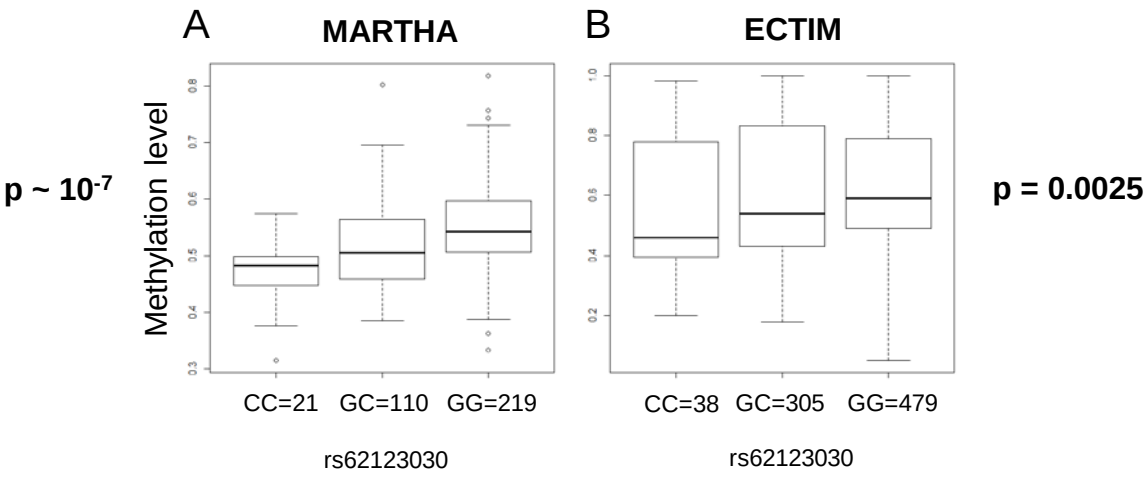


Figure 1. Association of a ZNF471 nSNP (rs62123030) with whole blood DNA methylation levels at CETP CpG#1 (cg09889350) site in the MARTHA (A) and ECTIM (B) studies. In ECTIM, association was performed on normalized values adjusting for age and case-control status. Only males were studied.

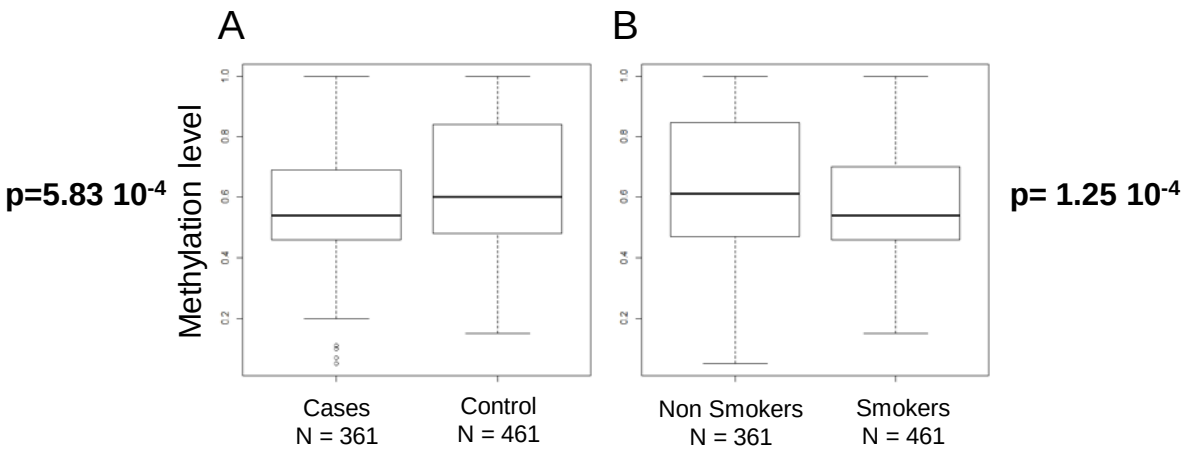


Figure 2 . Association of CETP CpG#1 (cg09889350) levels with arterial thrombosis (A) and smoking (B) in the ECTIM study.

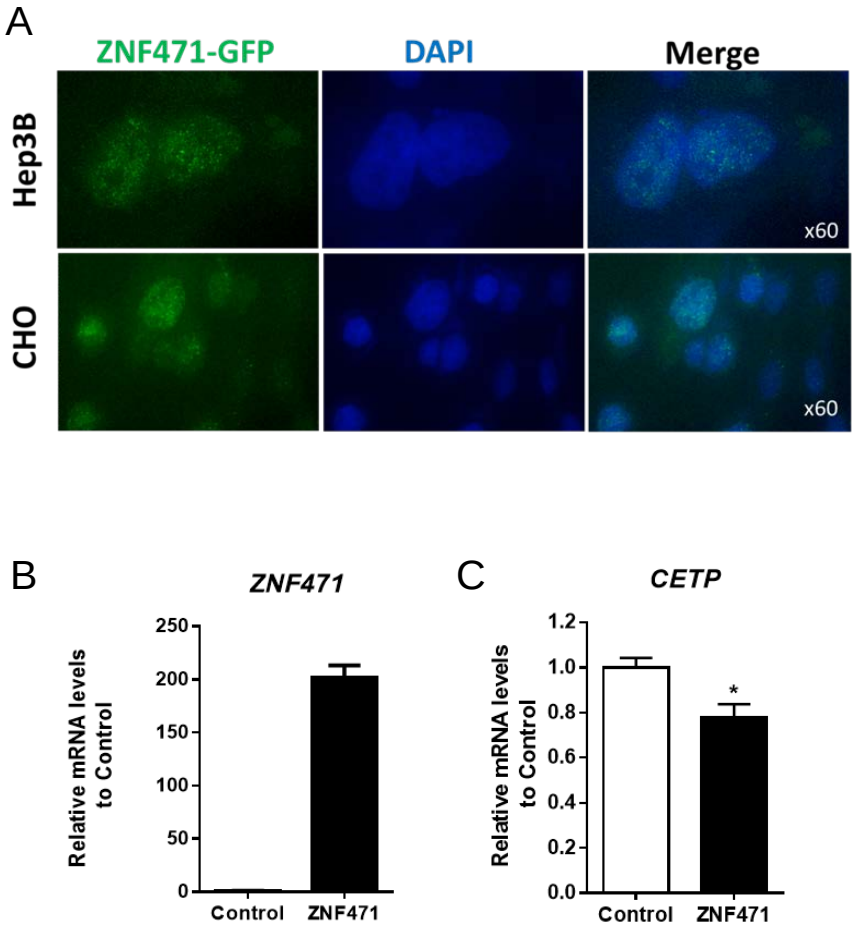


Figure 3 . Expression of hZNF471 *in vitro* reduces CETP expression. A. Nuclear localization of ZNF471-GFP in Hep3B and CHO cells following the transient transfection with an expression vector coding for a human ZNF471-GFP fusion protein. ZNF471-GFP in green and DAPI in blue. Analysis of ZNF471 (B) and CETP (C) mRNA levels in HepG2 cells transfected with an expression vector coding for human ZNF471or a control vector. *p<0.05 versus control.

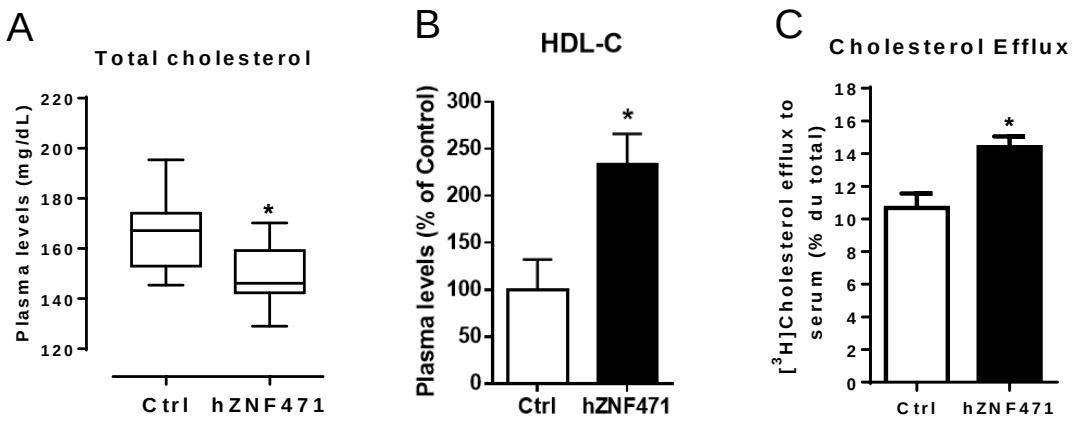


Figure 4. Expression of hZNF471 *in vivo* decreases circulating cholesterol levels. ApoB/CETP mice were retro-orbitally injected with an expression vector coding for human ZNF471 (hZNF471) or a control vector (Ctrl). Quantification of circulating total cholesterol (A), HDL-C levels (B) and capacity of serum to promote macrophage cholesterol efflux (C) 7 days following the injection. *p<0.05, **p<0.05. n=7-8 animals per group.

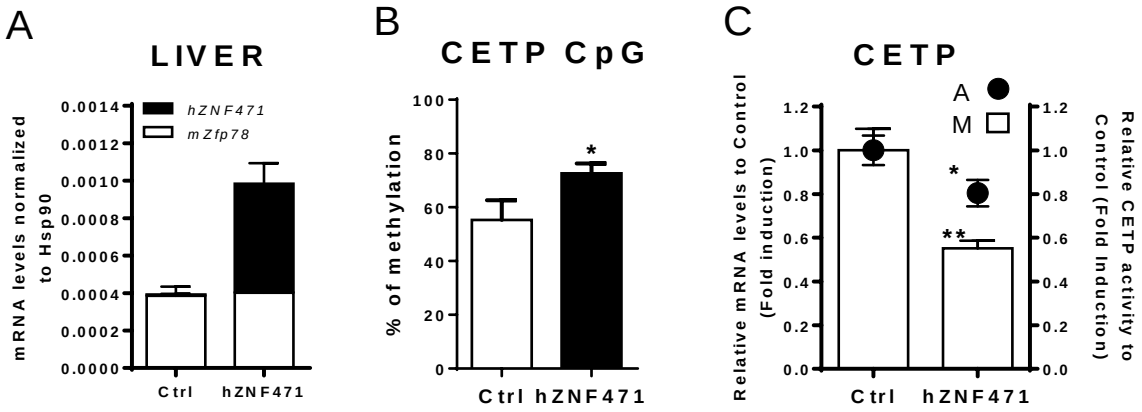


Figure 5. Expression of hZNF471 *in vivo* reduces liver CETP expression . ApoB/CETP mice were retro-orbitally injected with an expression vector coding for human ZNF471 (hZNF471) or a control vector (Ctrl). Quantification of human *ZNF471* and the mouse *Zfp78* orthologue mRNA levels *(A).* Analysis of a CETP promoter CpG site methylation by bisulfite conversion (B). Quantification of hepatic *CETP* (C, ☐) mRNA levels, and measurement of plasma CETP activity (C, ●) 7 days following the injection. *p<0.05, **p<0.05. n=7-8 animals per group.

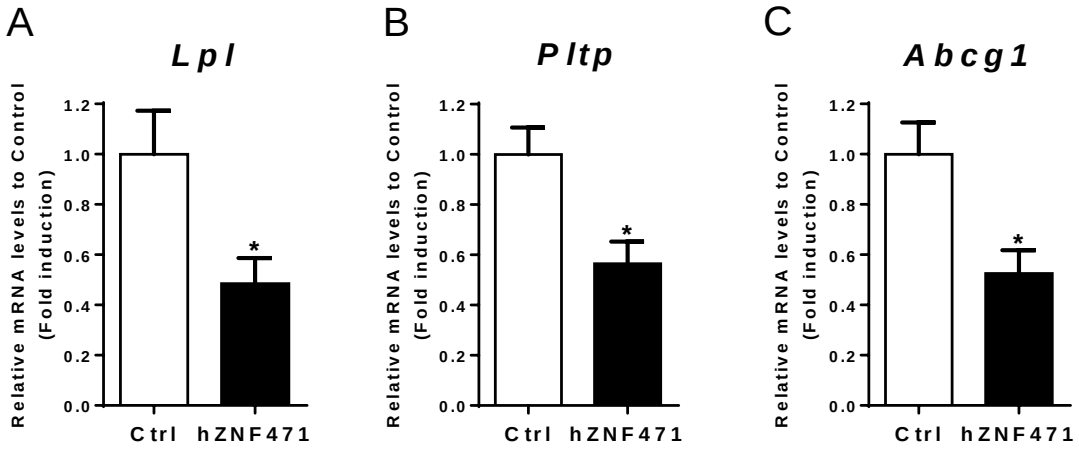
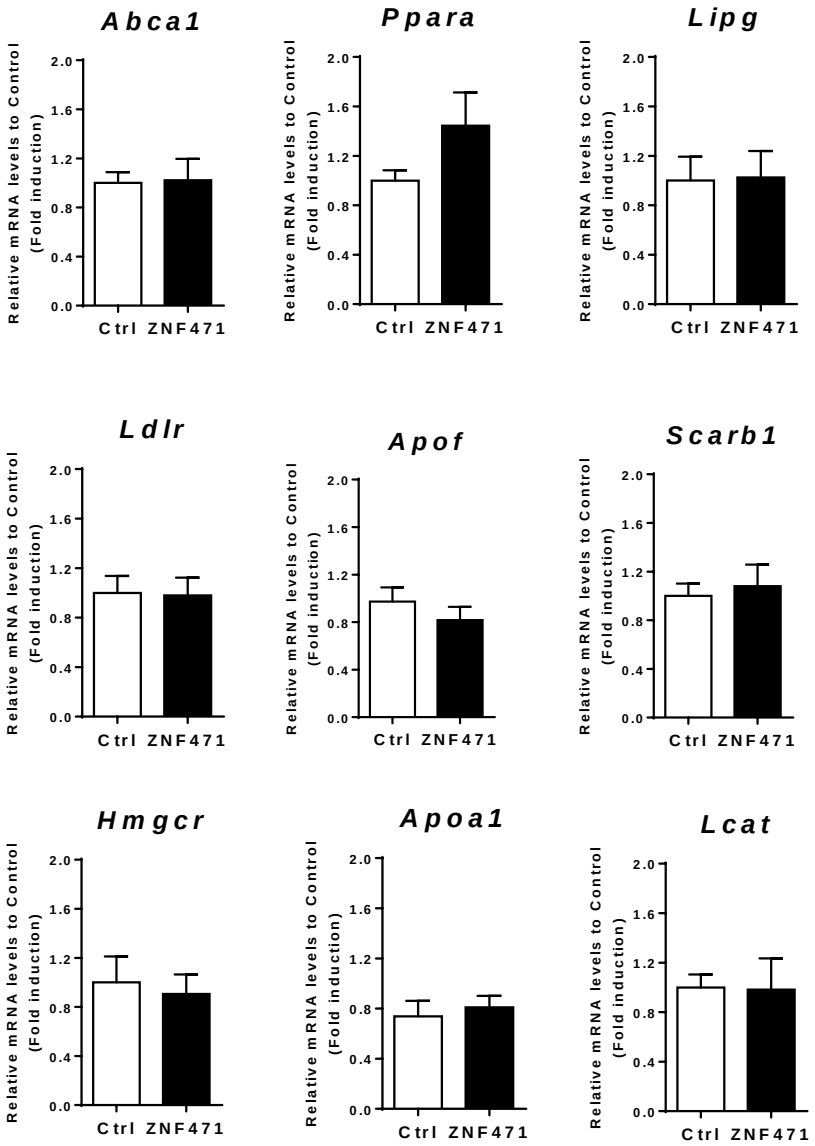


Figure 6. Expression of hZNF471 *in vivo* reduces liver expression of key lipid metabolism genes. ApoB/CETP mice were retro-orbitally injected with an expression vector coding for human ZNF471 (hZNF471) or a control vector (Ctrl). Quantification of hepatic *Lpl* (A), Pltp (B) and Abcg1 (C) mRNA levels 7 days following the injection. *p<0.05, n=7-8 animals per group.

Supplemental figure.



Supplemental Figure. Impact of hZNF471 *on* liver expression of others lipid metabolism genes. ApoB/CETP mice were retro-orbitally injected with an expression vector coding for human ZNF471 (hZNF471) or a control vector (Ctrl). Quantification of mRNA levels 7 days following the injection. n=7-8 animals per group.

Revue

Critical role of the human ATP-binding cassette G1 transporter in cardiometabolic diseases

Lise M. Hardy, Eric Frisdal, and Wilfried Le Goff

International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18, 1892

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Critical Role of the Human ATP-Binding Cassette G1 Transporter in Cardiometabolic Diseases

Lise M. Hardy, Eric Frisdal and Wilfried Le Goff *,†

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), UMR_S1166, Hôpital de la Pitié, F-75013 Paris, France; lise.hardy@inserm.fr (L.M.H.); eric.frisdal@upmc.fr (E.F.)
* Correspondence: wilfried.le_goff@upmc.fr
† Current address: INSERM UMR_S1166, Faculté de Médecine UPMC, 91 boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France.

Received: 1 August 2017; Accepted: 30 August 2017; Published: 2 September 2017

Abstract: ATP-binding cassette G1 (ABCG1) is a member of the large family of ABC transporters which are involved in the active transport of many amphiphilic and lipophilic molecules including lipids, drugs or endogenous metabolites. It is now well established that ABCG1 promotes the export of lipids, including cholesterol, phospholipids, sphingomyelin and oxysterols, and plays a key role in the maintenance of tissue lipid homeostasis. Although ABCG1 was initially proposed to mediate cholesterol efflux from macrophages and then to protect against atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVD), it becomes now clear that ABCG1 exerts a larger spectrum of actions which are of major importance in cardiometabolic diseases (CMD). Beyond a role in cellular lipid homeostasis, ABCG1 equally participates to glucose and lipid metabolism by controlling the secretion and activity of insulin and lipoprotein lipase. Moreover, there is now a growing body of evidence suggesting that modulation of ABCG1 expression might contribute to the development of diabetes and obesity, which are major risk factors of CVD. In order to provide the current understanding of the action of ABCG1 in CMD, we here reviewed major findings obtained from studies in mice together with data from the genetic and epigenetic analysis of *ABCG1* in the context of CMD.

Keywords: ABCG1; triglyceride; high-density lipoprotein; macrophage; lipoprotein lipase; obesity; diabetes; insulin resistance; atherosclerosis; cardiovascular diseases

1. Introduction to ABC Transporters and Lipid Metabolism

Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette (ABC) transporters belong to a large protein family composed of 48 members in humans, divided into 7 families (A–G) [1]. The ABC transporters mediate the active transport of molecules through membranes by hydrolyzing ATP. Thus, ABC transporters are able to drive transport of different types of molecules, from small inorganic or organic molecules to larger organic compounds, such as hormones, amino acids, ions, vitamins and lipids. Exchange of nutrients and metabolites, which are essential for the maintenance of cell or tissue homeostasis, often occurs against concentration gradients across cellular membranes. Therefore, it is not surprisingly that mutations in genes encoding ABC transporters lead to impaired homeostasis and genetic disorders associated with diseases. More especially, mutations in genes coding for ABC transporters involved in lipid transport are responsible for alterations in cellular lipid homeostasis and cause lipid-related disorders which may be associated with an increased risk of cardiovascular diseases (CVD) [2,3].
Among them, patients carrying mutations in *ABCG5* or *ABCG8* genes exhibit Sitosterolemia [4,5], a pathology characterized by elevated plasma levels of plant sterols due to an exacerbated absorbance of dietary phytosterols from the intestine. Indeed, the ABCG5/ABCG8 dimer promotes the efflux of cholesterol and plant sterols from both hepatocytes to bile and enterocytes to lumen. Patients

harboring mutations in either *ABCG5* or *ABCG8* have premature atherosclerosis and an increased risk to develop CVD [6]. In addition, mutations in *ABCA1* cause Tangier disease, a pathology characterized by a quasi-absence of high-density lipoprotein (HDL) and the appearance of lipid depots in tonsils, liver, spleen and lymph nodes [7–9]. Indeed, ABCA1 promotes cholesterol and phospholipid efflux to lipid-poor apolipoprotein A-I (ApoA-I) [10] and through this mechanism expression of ABCA1 in liver and intestine is crucial for HDL biogenesis [11]. Cholesterol efflux to HDL from macrophages in the arterial wall is proposed to protect against macrophage lipid accumulation and atherosclerosis development. Thus, mutations in ABCA1 are associated with a premature atherosclerosis and an increased CVD risk [12,13].

Although no genetic disorder caused by mutations in the *ABCG1* gene is reported so far, the ABCG1 transporter draws a special attention since it is described to promote cellular cholesterol efflux to HDL [14,15]. The membrane ABCG1 transporter was initially thought to protect from atherosclerosis and CVD. However, investigation of the role of ABCG1 in mouse models as well as in human studies seems to indicate that the control of cellular lipid homeostasis operated by ABCG1 might play an important role in the wide spectrum of metabolic disorders, including obesity, diabetes and insulin resistance, which are risk factors for atherosclerosis and CVD.

The goal of the present review is therefore to provide a comprehensive view of the action of ABCG1 in lipid metabolism and lipid-related metabolic disorders in the context of cardiometabolic diseases (CMD). In addition to major findings obtained from studies in mice, the present review mainly focusses on the analysis of genetic and epigenetic modulation of *ABCG1* in relation to CMD.

2. Structure and Regulation

The human *ABCG1* gene was initially identified as the human homolog of the *Drosophila melanogaster white* gene which encodes a member of the ABC transporter family involved in guanine and tryptophan import, two precursors of Drosophila eye color pigments [16]. In humans, *ABCG1* gene has been mapped to chromosome 21q22.3 [17] and multiple human *ABCG1* transcripts have been detected resulting from different transcription initiation and alternative mRNA splicing [18–20]. Similar to others members of the ABC family (ABCA1, ABCG4, ABCG5 and ABCG8), the expression of human ABCG1 is highly stimulated by cholesterol loading and oxysterols [14,21] through the liver X receptors (LXR) pathway. Indeed LXR acts as a cholesterol sensor which is activated by oxysterols (cholesterol oxidative derivatives) when the cholesterol concentration increases in the cell. Induction of ABCG1 expression by LXR agonists likely involves the presence of multiple LXR responsive elements (LXRE) through the *ABCG1* gene [20,22] and appears to only require the LXRα isoform in human macrophages [23]. Analysis of the molecular mechanism indicates that LXR recruitment at the human *ABCG1* locus is facilitated by the G protein pathway suppressor 2 (GPS2) [24]. Although ABCG1 shares common gene expression regulatory pathways with others ABC family members, ABCG1 clearly exhibits a tissue specific expression pattern with high expression levels of ABCG1 found in lung, brain, spleen, adrenal glands, heart and liver [14,17].

Although discrepancies were initially found in the literature regarding the structure of the *ABCG1* gene [18–20], it is now well established that the *ABCG1* gene is composed of 23 exons encoding a protein forming a half transporter with 6 transmembrane spanning domains and a single intracellular nucleotide binding domain (NBD) (Figure1). This NBD domain contains highly conserved Walker A and Walker B motifs and is required for the binding and the hydrolysis of ATP [25,26] which might provide required energy to transport substrates across the membrane [27]. An alternative splicing at the end of exon 17 led to the generation of a spliced variant of ABCG1 which lacks an internal segment of 12 amino acids in the region between the cytoplasmic domain and the ATP cassette (ABCG1(−12)) [28,29]. Interestingly, the two ABCG1 isoforms, ABCG1(+12) and ABCG1(−12), are expressed in humans whereas mice only express the shorter isoform putting forward the limitations of extrapolating results from mouse models to the human context [30]. Although both isoforms exhibit similar activity, expression of the ABCG1(−12) isoform is roughly two fold more

abundant than the ABCG1(+12) isoform in human macrophages and vascular cells [28,29]. Indeed, Gelissen et al. demonstrated that the ABCG1(+12) isoform is more rapidly degraded as the result of the phosphorylation of a serine residue located in the 11 amino acid segment by protein kinase A (PKA) [31]. Others mechanisms contribute to the stability and activity of human ABCG1. Thus, ABCG1 degradation is proposed to be regulated via the ubiquitin proteasome system by the E3 ubiquitin ligases HUWE1 (HECT, UBA, and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase) and NEDD4-1 (Neural precursor cell-expressed developmentally down regulated gene 4) [32]. Interestingly, ubiquitination and proteasomal degradation of human ABCG1 was suppressed by cholesterol through interaction with a cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motif located in the final transmembrane domain of ABCG1 [33,34].

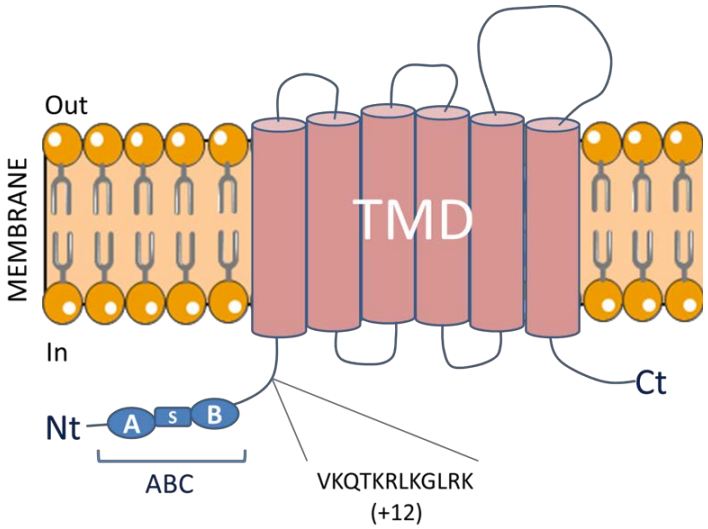


Figure 1. Structure of the membrane ATP-binding cassette G1 (ABCG1) transporter. ABCG1 is a member of the ABC superfamily of transporters and contains one ABC domain containing three highly conserved domains (Walker A (A), Walker B (B) and Signature motif (S)) and one transmembrane domain (TMD) consisting of six membrane-spanning α-helices. The 12 amino acids present in the long ABCG1 isoform (+12AA) are indicated. Functional ABC transporters require two ABCs and two TMDs, therefore, the ABCG1 half-transporter must homodimerize or heterodimerize with others ABC partners in order to be functional. Nt: N-terminus; Ct: C-terminus.

A debate still occurs regarding the cellular localization of ABCG1. Indeed, the use of expression vectors containing the human ABCG1 cDNA sequence fused or not to a tag protein for ABCG1 visualization led to conflicting results with ABCG1 being predominantly detected at the plasma membrane [27,28,35–37] or/and in the intracellular compartment [14,38–40]. Indeed, localization of human ABCG1 was reported at the cell surface and in the endocytic pathway (early, recycling, late endosomes and lysosomes) as well as in the Golgi apparatus [14,28,35,38–40] and ABCG1 was proposed to traffic along the secretory pathway from the endoplasmic reticulum to the cell surface as well as along the endocytic pathway to the late endosomes/lysosomes [41]. The presence of Leu 562 [37] or both Asn 316 and Phe 320 in the highly conserved sequence located between the NBD and the transmembrane domain [42] has been reported to be important for ABCG1 localization at the plasma membrane.

3. Functions and Mechanism of Action

The ABC transporters are membrane-bound proteins that mediate the ATP-dependent translocation of many amphiphilic and lipophilic molecules including lipids, drugs or endogenous metabolites. Among them, twenty transporters have been shown to be implicated in lipids, lipid-like

or steroids transport [43]. The ABCG1 transporter is a half ABC protein that must dimerize to form an active transporter. It has been reported that human ABCG1 can form homodimers [38] or heterodimers, especially with ABCG4 [26,44]. Although others potential partners for ABCG1 may exist, it is very likely that ABCG1 mainly acts as a homodimer since ABCG1 and ABCG4 are generally spatially separated at the exception of the brain [45]. Human ABCG1 was identified as a lipid transporter able to promote the export of numerous lipid species including cholesterol, phospholipids (phosphatidylcholine), sphingomyelin (SM) and oxysterols (7-ketocholesterol, 7β-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol) [36,38,46–50]. However, it appears that ABCG1 exerts a broader array of substrates which is not restricted to lipids as ABCG1 can equally promote export of liposoluble molecules such as vitamin E (α- and γ-tocopherol) [51]. In contrast to ABCA1, ABCG1 promotes cellular cholesterol efflux to high density lipoproteins (HDL_2 and HDL_3) but not to lipid-free ApoA-I; the phospholipid content of the acceptor being the major parameter driving ABCG1-mediated cholesterol efflux [38,46]. Importantly, lipidation of ApoA-I by ABCA1 generates nascent or preβ-HDL which may serve as a substrate for ABCG1 indicating that ABCA1 and ABCG1 act sequentially to export cellular cholesterol efflux [38,46]. However, even if HDL is the most efficient lipid acceptor for promoting lipid efflux through ABCG1, the latter may also occur in the presence of non-specific acceptors such as serum albumin although to a lesser degree considering the efflux of cholesterol [36,50].

The mechanism of action of ABCG1 is not yet fully understood and is controversial. A prevailing view is that ABCG1 acts within the endocytic pathway and at the plasma membrane by redistributing membrane cholesterol through the vesicular pathway between endoplasmic reticulum and plasma membrane. The reorganization of membrane cholesterol and SM operated by ABCG1 might increase their accessibility to extracellular acceptors for removal allowing a reduction of lipid rafts formation at the plasma membrane [41,52,53]. However, this process might occur independently of the presence of such acceptors and cholesterol might desorb in a nonspecific manner when ABCG1 is expressed [54].

4. Critical Role of ATP-Binding Cassette G1 (ABCG1) in Cardiometabolic Diseases

Identification of a role of ABCG1 in promoting cellular lipid efflux to extracellular acceptors led to propose that ABCG1 may be essential to maintain cell or tissue lipid homeostasis in metabolic contexts associated with major perturbation of lipid homeostasis and metabolism as classically observed in CMD. However, no genetic disease caused by *ABCG1* mutations has been documented and generation of mouse models with targeted disruption of *Abcg1* or expression of human *ABCG1* helped to appreciate the contribution of ABCG1 in physiological and physiopathological situations. Although major finding from studies in mice will be reported here, we will mainly focus on information available when human ABCG1 is explored at both genetic and epigenetic levels which are of major importance for uncovering association of ABCG1 with metabolic traits and providing insights in CMD.

5. ABCG1 and Lipid Metabolism and Homeostasis

5.1. Major Findings from Studies in Mice

In agreement with a role of ABCG1 in promoting cellular cholesterol efflux, the use of *Abcg1*$^{-/-}$ and human *ABCG1* transgenic mice confirmed that ABCG1 has a critical role in maintaining tissue lipid homeostasis when mice were challenged with a high-fat and high-cholesterol diet [55]. Indeed although neutral lipid accumulation was observed in lung from deficient-*Abcg1* mice on a chow diet [55,56], a massive elevation of the amount of cholesterol ester, triglycerides (TG) and phospholipids was detected in hepatocytes and macrophages from liver and lung when deficient-*Abcg1* mice were fed a high-fat and high-cholesterol diet. By contrast, animals expressing the human *ABCG1* transgene were protected from lipid accumulation in those tissues [55]. Although not the topic of the present review, it is however important to mention here that ABCG1 plays a key role in maintaining lung lipid homeostasis and that impaired ABCG1 expression was reported in pulmonary alveolar proteinosis

(PAP) [57]. Indeed, PAP is characterized by deficient surfactant clearance and lipid accumulation in alveolar macrophages which were proposed to result from a defective ABCG1 expression [57–59]. The apparent preponderant role of macrophage Abcg1 to export cholesterol was confirmed in peritoneal macrophages from Abcg1-deficient mice which exhibited a reduced cellular cholesterol efflux to HDL but not to lipid free ApoA-I in comparison to peritoneal macrophages from wild-type mice when stimulated with LXR ligands. Despite a role of ABCG1 in promoting cellular cholesterol export to HDL, lack of Abcg1 in mice has no consequence on plasma lipid levels, especially HDL-C. Indeed, both Abcg1-deficient mice and human *ABCG1* transgenic mice fed either a chow diet or a high-fat and high-cholesterol diet exhibited no differences in plasma lipid levels as compared to wild-type mice [55,60,61]. However, Wiersma et al. observed a less pronounced increase in plasma HDL-C in Abcg1 knockout (KO) mice following a 2-week period of high-cholesterol diet or when fed a chow diet after LXR agonist (T0901317) administration, suggesting that LXR activation is required to elicit an effect of Abcg1 on plasma HDL-C levels [62].

5.2. Genetic Modulation of Human ABCG1

Development of genome- and epigenome-wide association studies (GWAS and EWAS) provides very useful tools to study the association between genetic and epigenetic variations of the human *ABCG1* gene and metabolic phenotypes. Numerous polymorphisms have been identified in the *ABCG1* locus [63] and several functional single nucleotide polymorphisms (SNP) located in the promoter region as well as in the coding region of the *ABCG1* gene served as genetic markers to explore the association between *ABCG1* and plasma lipid levels and to decipher the role of ABCG1 in CMD. Genotyping of a functional *ABCG1* SNP (rs1378577, T > G) located in the promoter region of the *ABCG1* gene in 109 Japanese men with a coronary artery disease (CAD) did not allow to detect any statistical differences in serum TG, total cholesterol (TC), low-density lipoproteins (LDL)-C and HDL-C according to the *ABCG1* genotype [64]. Similar observations were reported in 609 dyslipidemic white men with a minimum 50% obstruction of a major coronary artery in regression growth evaluation satin study (REGRESS) when two different SNPs located in the *ABCG1* promoter (rs1378577, T > G and rs1893590, A > C) were studied [65]. Indeed, these two *ABCG1* SNPs were associated with neither plasma lipid concentrations (TC, LDL-C, HDL-C, TG and Lipoprotein(a)) nor circulating cholesterol ester transfer protein (CETP) concentrations. Nevertheless in this study, the authors brought to light an unexpected association between both *ABCG1* SNPs and plasma lipoprotein lipase (LPL) activity independently of any effect on circulating LPL mass [65]. However the absence of association between the two SNPs and TG levels observed in REGRESS (plasma TG levels < 3.5 g/L) suggests that modulation of LPL activity by ABCG1 might only alter circulating TG concentrations in subjects exhibiting fasting or postprandial hypertriglyceridemia. The absence of any association between *ABCG1* promoter SNPs (rs2234714, −768G > A; and rs57137919, −367G > A) and plasma lipids levels (HDL-C, LDL-C, TG and TC) was equally reported in 1021 patients with CAD and 1013 unaffected control subjects in a Chinese Han population [66]. Genotyping of the rs57137919 in 200 Chinese healthy volunteers led to similar conclusions [67]. Association studies in larger cohorts enabled detection of an association between *ABCG1* genotype and plasma HDL-C levels. Indeed, genotyping of 10,237 individuals from the Copenhagen city heart study (CCHS) for 16 *ABCG1* SNPs identified two rare variants (rs140837853, C > T and rs56140811, C > T) located in the promoter region and exon 9 of the *ABCG1* gene that were associated with modest reductions in HDL-C (7% and 3%, respectively); the carriers of the rare alleles exhibited lower HDL-C levels than the non-carriers [68]. However except for HDL-C, none of those *ABCG1* variants were associated with plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Moreover, a high-density genotyping array containing SNPs from HDL-C candidates provided suggestive evidence for an association of an intronic *ABCG1* SNP (rs914189, C > G) with HDL-C concentrations in a meta-analysis comprising 7857 individuals [69]. Interestingly, Abellán et al. reported that the *ABCG1* SNP rs1893590 (A > C) was associated with plasma HDL-C levels in the postprandial state while no association was detected with postprandial TC or LDL-C [70]. Indeed, in 1473 Spanish subjects from

the population-based Hortega study, the carriers of the rare C allele (CC + AC) were significantly associated with higher postprandial HDL-C concentrations 3 h after lunch as compared to individuals homozygous for the frequent A allele (genotype AA) [70]. Strikingly, this association was only observed in women but not in men suggesting a gender-specific effect of the *ABCG1* genotype on postprandial HDL-C levels. Since people in Western countries spend most of the day in the postprandial state, this study provides new insights regarding the potential contribution of ABCG1 in determining circulating levels of HDL-C, which are firmly reported to be inversely associated to CAD [71]. However, the diet intake appears to be essential in the effect of ABCG1 on plasma HDL-C levels. Indeed, the association between rs1893590 and postprandial HDL-C disappeared after adjustment for caloric intake or lipid consumption [70] whereas an association with the *ABCG1* SNP rs1044317 (G > A, 3'UTR region) with variations in fasting HDL-C concentrations was only observed in subjects with a high polyunsaturated fatty acid (PUFA) intake (>13.6 g/day) [72]. A similar diet-interaction was reported regarding the association of the *ABCG1* SNP rs4148102 (G > A, intronic region) with TC and LDL-C in this latter study [72]. To note that the body mass index (BMI) and age equally interact in the relation between *ABCG1* polymorphisms and plasma HDL-C. Thus, the association between the *ABCG1* SNP rs1893590 (A > C) with HDL-C in an asymptomatic Brazilian population (654 normolipidemic volunteers) was only detectable for individuals under 60 years or BMI < 25 kg/m^2 with homozygous AA subjects displaying higher plasma HDL-C levels than carriers of the C allele (AC + CC) [73]. Finally, rare *ABCG1* SNPs were reported to be associated with plasma TC (rs170444, A > G) and TG levels (rs170444, A > G and rs8126601, G > A) in a large-scale meta-analysis across 32 studies (66,240 individuals of European ancestry) [74]. However no association between *ABCG1* SNPs (rs1378577, −134 T > G and rs1893590, 204 A > C) with circulating lipids levels was observed in a population of morbidly obese patients (BMI > 40 kg/m^2, n = 1320) [75].

5.3. Epigenetic Modulation of Human ABCG1

Epigenetic mechanisms such as DNA methylation might contribute to the determination of circulating lipid concentrations in humans [76]. In this context, recent evidence indicates that epigenetic marks within the *ABCG1* gene including cytosine guanine dinucleotide (CpG) site methylation are associated with blood lipid levels. Genome-wide DNA methylation analysis in whole blood samples of 1776 subjects from the general population of the cooperative health research in the region of Augsburg (KORA) identified CpG sites located in *ABCG1* associated with HDL-C and TG levels [77]. Indeed, cg27243685 and cg07397296 were strongly associated with TG levels whereas cg06500161 was associated in opposite directions with plasma HDL-C and TG levels. Interestingly, association of *ABCG1* DNA methylation with TG levels was also found in adipose tissue, a tissue in which *ABCG1* gene was expressed. Methylation of *ABCG1* at cg06500161 was negatively associated with *ABCG1* mRNA levels indicating that this CpG site was functional in repressing *ABCG1* expression [77–79]. Moreover, functional analysis of cg06500161 by electrophoretic mobility shift assay revealed a higher binding of a protein complex for the unmethylated status of the CpG site as compared to the methylated status, suggesting that cg06500161 modulates transcriptional activity of the *ABCG1* promoter. In agreement with those observations, *ABCG1* mRNA levels showed a strong positive association with HDL-C and a negative association with TG levels [77].

The association of DNA methylation at *ABCG1* locus in whole blood DNA with plasma TG and HDL-C levels was replicated in several studies recapitulated in Table1which were conducted in the Botnia prospective study (cg06500161, TG, n = 258) [80], the Rotterdam study (cg06500161, TG and HDL-C, n = 1485) [78], the Framingham heart study (FHS) and prospective investigation of the vasculature in uppsala seniors study (PIVUS) (cg06500161, TG and HDL-C, cg27243685 and cg01176028, TG, n = 2036) [79] and in Canadian familial hypercholesterolemia patients (CpGC3, TG, HDL-C and TC, n = 98) [81]. In addition, Lai et al. reported that methylation of the *ABCG1* CpG site (cg06500161) in blood CD4$^+$ T cells from 979 subjects of the genetics of lipid lowering drugs and diet network (GOLDN) study was significantly associated with postprandial hypertriglyceridemia (PPHT) after

consumption of a high-fat test meal [82]. Indeed, an increased methylation at *ABCG1* was correlated with an increased PPHT response. However cg06500161 was equally associated with fasting TG, then the effect on PPHT disappeared after adjustment for baseline fasting TG levels. Finally, beyond TG and HDL-C, EWAS between DNA methylation and lipidomic traits in human blood revealed an association between methylation at cg06500161 and SM, phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and monoacylglycerol [79,83].

Table 1. Association between methylation at different ATP-binding cassette G1 (ABCG1) CpG loci and plasma lipid levels. HDL, high-density lipoprotein; TG, triglycerides; KORA, cooperative health research in the region of Augsburg; InCHIANTI, aging in the chianti area; FHS, Framingham heart study; PIVUS, prospective investigation of the vasculature in Uppsala seniors; PPHT; postprandial hypertriglyceridemia; GOLDN, genetics of lipid lowering drugs and diet network.

Lipid Trait	CpG Site	Position	Direction	Cohort	*n*	*p* Value	Reference
HDL	**cg06500161**	43,656,588	−	KORA F3, KORA F4 and InCHIANTI (meta-analysis)	2747	9.00×10^{-11}	[77]
−				Rotterdam discovery/replication	725/760	9.5×10^{-23}	[78]
−				FHS and PIVUS	2306	1.2×10^{-34}	[79]
KORA F3, KORA F4 and InCHIANTI (meta-analysis)			+		2747	5.56×10^{-10}	[77]
	cg06500161	43,656,588	+	Botnia prospective study	258	0.001	[80]
			+	Rotterdam discovery/replication	725/760	1.4×10^{-24}	[78]
			+	FHS and PIVUS	2306	2.29×10^{-48}	[79]
			+(PPHT)	GOLDN	979	4.25×10^{-9}	[82]
TG							
	cg27243685	43,642,366	+	KORA F3, KORA F4 and InCHIANTI (meta-analysis)	2747	2.49×10^{-5}	[77]
+				FHS and PIVUS	2306	8.12×10^{-26}	[79]
	cg07397296	42,235,165	+	KORA F3, KORA F4 and InCHIANTI (meta-analysis)	2747	3.78×10^{-3}	[77]
	cg01176028	43,653,234	+	FHS and PIVUS	2306	5×10^{-9}	[79]
Not specified	**CpGC3**		+	Canadian familial Hypercholesterolemia	98	0.02	[81]

Taken together, the use of polymorphisms in the *ABCG1* gene as genetic markers in association studies appears poorly informative in order to reveal a potential impact of ABGC1 on lipid metabolism. However, the results from DNA methylation studies univocally revealed a strong association of ABCG1 with circulating TG levels and in a lesser extend those of HDL-C. The inverse association between methylation at cg06500161 and HDL-C is coherent with the largely described role of ABCG1 in promoting cellular cholesterol efflux to HDL and suggests that DNA methylation of *ABCG1* in key tissues controlling HDL metabolism (liver or intestine) might contribute to the determination of circulating HDL-C levels. In addition, the strong positive relationship existing between DNA methylation at the *ABCG1* locus and circulating TG levels is in agreement with the role of ABCG1 in controlling the bioavailability and activity of LPL, a key enzyme in TG metabolism [65]. However, it must be kept in mind that although DNA methylation may modulate circulating lipid concentrations, an inverse relationship may equally occur. Indeed, Dekkers et al. demonstrated that blood lipids influenced DNA methylation with methylation of *ABCG1* CpG sites (cg06500161 and cg27243685) being modulated by TG or HDL-C [84].

6. ABCG1: Role in Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases

Cardiovascular diseases are one of the major causes of mortality and morbidity worldwide and are frequently associated to atherosclerosis, a physiopathological process leading to lipid accumulation, mainly in macrophages in the arterial wall. Epidemiological studies have largely reported that plasma LDL-C levels are positively associated to CAD whereas an inverse relationship exists with those of HDL-C [71].

6.1. Major Findings from Studies in Mice

Because of the important role of Abcg1 in maintaining tissue lipid homeostasis, especially in macrophages [55], Abcg1 was proposed to protect from atherosclerosis development by promoting cholesterol efflux to HDL from arterial macrophages. In addition, ABCG1 was reported to protect macrophage from apoptosis induced by oxidized LDL [85] as well as against endothelial dysfunction [48] and activation [86] in mice, which are key features of atherosclerosis. However investigation of the role of Abcg1 in atherosclerosis in animal models led to conflicting results. Indeed, the expression of human ABCG1 in a rabbit fed a high-cholesterol diet [87] or in *Ldlr*$^{-/-}$ [88] or *Apoe*$^{-/-}$ [61] mice fed a high-fat and high-cholesterol diet showed either attenuation or increased or no effect on atherosclerosis, respectively. In addition, Abcg1 deficiency in mice under high-fat and high-cholesterol feeding was either protective or deleterious against atherosclerosis in wild-type mice [60] or in *Apoe*$^{-/-}$ mice [89], respectively. In order to evaluate the specific contribution of macrophage Abcg1 in atherosclerosis development, bone marrow transfer (BMT) from donor *Abcg1*$^{-/-}$ mice into recipient *Ldlr*$^{-/-}$ or *Apoe*$^{-/-}$ mice fed a high-fat and/or a high-cholesterol diet was simultaneously conducted in three different laboratories [89–94]. However, consistent with what was observed for modulation of whole body Abcg1 expression, those studies led to contrasting results which did not resolve the role of macrophage Abcg1 in atherosclerosis. In an attempt to reconcile the results obtained in *Ldlr*$^{-/-}$ mice, Meurs et al. proposed that the effect of Abcg1 deficiency on atherosclerosis depends on the stage of the disease [95]. Thus, Abcg1 would be protective in early lesions likely by promoting macrophage cholesterol efflux and reducing foam cell formation whereas Abcg1 would be deleterious in advanced lesions by protecting macrophage from apoptosis through the export of cellular oxysterols. However further investigations are needed to validate this model and to elucidate the whole spectrum of action of Abcg1 in the process of atherogenesis in which Abcg1 appears to exert a more complex role that initially thought.

Finally, since Abcg1 was demonstrated to cooperate with Abca1 in promoting cholesterol efflux from macrophages [38,46], Abca1/Abcg1 double KO mice have been generated in order to determine if the impact of macrophage Abcg1 deficiency in atherogenesis could be unmasked when Abca1 is absent. A much more pronounced reduction of cholesterol efflux to HDL was observed in double Abca1/Abcg1-deficient macrophages in comparison to single KO mice whereas cholesterol efflux to ApoA-I was not affected [92,96]. However, similar to what was observed in single Abcg1-deficiency, BMT from donor *Abca1*$^{-/-}$*Abcg1*$^{-/-}$ mice into recipient *Ldlr*$^{-/-}$ mice led to conflicting results and did not help to elucidate the role of macrophage Abcg1 in atherosclerosis [92,93]. Indeed, an exacerbated size of atherosclerotic lesions was detected in *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with *Abca1*$^{-/-}$*Abcg1*$^{-/-}$ BM fed a high-cholesterol diet in comparison to single KO animals [92] whereas an independent study showed no difference in lesion size between *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with either *Abca1*$^{-/-}$*Abcg1*$^{-/-}$ or *Abcg1*$^{-/-}$ BM when animals were fed a high-fat and high-cholesterol diet [93].

6.2. Genetic Modulation of Human ABCG1

Whole genome expression arrays performed in circulating monocytes (CD14+ cells) from young male with premature familial CAD and control individuals (n = 22 in each group) revealed that ABCG1 expression was down-regulated in CAD patients suggesting that ABCG1 might be associated with early atherosclerosis [97]. However, association studies between *ABCG1* SNPs and CAD or atherosclerosis led to conflicting results. Indeed, analysis of the effect of the functional *ABCG1* SNP (rs1378577, T > G) on CAD severity in 109 Japanese men with CAD indicated that individuals homozygous for the T allele (TT) exhibited an increased risk of multi-vessel disease compared with single-vessel disease which was independent of any effect on plasma lipid levels [64]. A protective role of ABCG1 regarding CAD was also reported by Schou et al. who identified two *ABCG1* variants associated with an increased risk for myocardial infarction (MI) and ischemic heart disease (IHD) (rs72542412, −376 C > T and S630L) and one *ABCG1* variant only associated with MI (rs138515663, −311 T > A) in 10,237 individuals from theCCHS [68]. It is worthy to note that those very rare variants were not associated with plasma HDL-C

levels. Conversely, *ABCG1* SNPs associated with circulating HDL-C concentrations were not found associated to either MI or IHD indicating that the effect of *ABGC1* variation on the risk of ischemic vascular disease was not the result of any modulation of HDL-C. However, genotyping of two *ABCG1* SNPs located in the ABCG1 promoter (rs1378577, −134 T > G and rs1893590, −204 A > C) in REGRESS indicated that those SNPs were not associated with angiographic parameters (minimum segment diameter and mean obstruction diameter) in individuals (n = 609) developing atherosclerosis [65]. On the contrary, analysis of the association of four *ABCG1* polymorphisms, three located in the promoter (rs2234714, −768 G > A; rs2234715, A > G and rs57137919, −367 G > A) and one in the 3'UTR region (rs1044317, G>A) in patients with CAD (n = 1021) and unaffected control subjects (n = 1013) in a Chinese Han population concluded to a deleterious role of ABCG1 regarding CAD [66]. Indeed, a significant difference in allele frequency and genotype distribution of both rs2234714 and rs57137919 was observed between CAD patients and control subjects with the frequency of the less minor allele being lower in the CAD group (with MI or not) than in controls. Thus, those polymorphisms showed a decreased risk for CAD (rs2234714 and rs57137919) and MI (rs57137919) and led to identification of a GAGA haplotype (rs2234714, rs2234715, rs1044317 and rs57137919) including the more frequent allele of each SNP that was associated with an increased risk of CAD or MI [66]. In addition, rs57137919 was shown to be associated with angiographic severity of CAD (multi-vessel versus single vessel). Interestingly, those SNPs were not in apparent linkage disequilibrium and were not associated with blood lipid concentrations. In order to elucidate the mechanism underlying the deleterious effect of the *ABCG1* SNP rs57137919 in CAD, the same group extended their investigation by carrying out functional experiments in 200 Chinese healthy volunteers [67]. In this study, human monocyte-derived macrophages from individuals carrying the rare AA genotype for the rs57137919 displayed reduced ABCG1 expression, impaired oxidized NBD-cholesterol efflux to HDL and increased apoptosis as compared to macrophages from individuals carrying the frequent GG genotype. In addition, mRNA levels of proapoptotic Bcl-2 related ovarian killer (*BOK*) and BH3 interacting domain death agonist (*BID*) genes from macrophages with the AA genotype were more elevated than those from macrophages with the GG genotype following exposure with oxidized LDL. Those results suggest that the reduced risk of developing atherosclerosis observed in individuals carrying the less frequent rs57137919 A allele could result from an increased macrophage apoptosis, thereby supporting the model proposed by Meurs et al. from studies in mice about the role of Abcg1 in atherosclerosis [95]. Finally, the association of two functional *ABCG1* SNPs (rs1378577, T > G and rs571137919, G > A) with the risk of ischemic stroke in a case-control study including 389 ischemic stroke patients and 380 healthy subjects in the Chinese Han population provided additional mechanistic insights about the deleterious effect of ABCG1 [98]. Indeed, Li et al. demonstrated that the frequency of homozygosity for the rare alleles (GG and AA) was lower in patients as compared to control individuals in a subgroup of hypertriglyceridemia whereas genotypic distribution was similar in patients and controls when the whole population was studied. In addition, both rs1378577 and rs571137919 were associated with a reduced risk of developing ischemic stroke in hypertriglyceridemic individuals. Although the sample size was here relatively low, this study supports the mechanism proposed by Olivier et al. through which ABCG1 could exert a deleterious role in metabolic situations associated with high levels of circulating TG-rich lipoproteins [65]. Indeed, Olivier et al. demonstrated that ABCG1 controls LPL activity and promotes lipid accumulation in macrophages in a presence of TG-rich lipoproteins and, therefore, might contribute to foam cell formation and atherosclerosis development in hypertriglyceridemic individuals.

6.3. Epigenetic Modulation of Human ABCG1

Analysis of the relationship between *ABCG1* promoter methylation and coronary heart disease (CHD) was investigated in a small group of 85 CHD patients and 54 participants without CHD in the Han Chinese population [99]. In this study, *ABCG1* promoter hypermethylation was frequently observed in patients with CHD (90.5%) but not in individuals without CHD (29.6%). Further analysis

indicated that hypermethylation of the *ABCG1* promoter gene was associated with an increased risk of CHD after adjustment for age, gender, smoking, lipid levels, hypertension and diabetes. In support of this preliminary study, analysis of genome-wide DNA methylation in whole blood in subjects ($n = 1776$) from the general population of the KORA study indicated that the *ABCG1* CpG site cg06500161 was associated with MI [77]. This effect was independent of the association of cg06500161 with HDL-C and TG in this cohort. However, this result must be interpreted with caution since only 60 individuals with previous hospitalized MI were included in this analysis. A very recent study reported that whole blood methylation at the *ABCG1* CpG site cg27243685 (5'UTR region of *ABCG1*) was significantly associated with CHD in a meta-analysis of theFHS and PIVUS (2306 participants, number of CHD events = 193). Altogether, this study highlighted a pathway linking hypermethylation of *ABCG1* at cg27243685 with reduced *ABCG1* expression, higher TG, lower HDL-C and increased risk for CHD [79]. Measurement of blood DNA methylation in Canadian Familial Hypercholesterolemia patients did not allow to establish any association between methylation levels at a single *ABCG1* CpG site (CpGC3) and a prior history of CAD in a small subset of individuals (Non-CAD ($n = 22$) vs CAD ($n = 22$)) [81].

To conclude, association studies in humans using methylation marks at the *ABCG1* locus support a protective role for ABCG1 in CAD in the general population with methylation levels at *ABCG1* CpG sites being associated with an increased risk of CHD and MI. However, this effect is independent of any effect on blood lipid concentrations. Thus, modulation of DNA methylation by environmental factors such as smoking and nutrition might play an important role in the contribution of ABCG1 in CAD. Nevertheless, genome-wide DNA methylation analysis in large cohorts of CAD patients or in case-control studies for CAD will be required to conclude on the impact of methylation at the *ABCG1* locus on CAD. By contrast, results from the genotyping of *ABCG1* SNPs in CAD patients or in case-control studies for CAD support the contention that ABCG1 might exert a pro-atherogenic effect locally in the arterial wall independently of any modulation of circulating HDL-C or TG levels [100]. Such a deleterious role could result from the critical contribution of human ABCG1 in reducing macrophage apoptosis through efflux of oxysterol [50,101] and in promoting macrophage lipid accumulation through modulation of LPL activity in a TG-rich metabolic context [65]. In contrast to what is proposed in mice, human ABCG1 does not promote macrophage cholesterol efflux to HDL [52] and therefore is not expected to attenuate foam cell formation in early atherosclerosis lesions. However, ABCG1 could protect from atherosclerosis by preserving vascular endothelium from dietary cholesterol-induced dysfunction [48,102].

7. ABCG1: Role in Diabetes and Insulin Resistance

The presence of diabetes and insulin resistance (IR) is frequently observed in CMD. In addition, diabetes is growing worldwide because of the emergence of obesity and is a risk factor for accelerated atherosclerosis and CAD. The loss of insulin signaling or secretion as well as the loss of glycemic control are critical features that characterize type 2 diabetes (T2D).

7.1. Major Findings from Studies in Mice

Macrophages from diabetic mice (*db/db* mice or treated with streptozotocin) showed a decrease of Abcg1 expression and an impaired cellular cholesterol efflux to HDL [103,104]. As a consequence, an increased accumulation of esterified cholesterol was observed in diabetic *db/db* macrophages [103]. Interestingly, Mauldin et al. also demonstrated that elevated glucose led to a repression of Abcg1 expression in mouse macrophages, suggesting that hyperglycemia in diabetes could contribute to foam cell formation and accelerated atherosclerosis through inhibition of macrophage Abcg1-mediated cholesterol efflux. Advanced glycation end products (AGE), which are generated by non-enzymatic glycation and oxidation of proteins and lipids, accumulate in diabetes. Treatment of macrophages with AGEs led to a decreased ABCG1 expression through a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ-dependent mechanism and a reduction of cholesterol efflux to HDL. Generation of mice deficient for the receptor of AGEs (RAGE/AGER) revealed that macrophage reverse cholesterol

transport to feces was reduced in diabetic mice through RAGE [104]. Moreover, Nagelin et al. reported that macrophage Abcg1 expression was significantly suppressed by PUFAs such as linoleic or arachidonic acids which frequently accumulate in diabetes and IR [105]. Interestingly, those PUFAs are ligands for 12/15-lipoxygenase (12/15LO) for producing hydroperoxy FA 12S- and 15S-hydroxyeicosatetranoic acids (12SHETE/15SHETE) and 13S-hydroxyoctadecadienoic acid (13SHODE) and 12/15LO was reported to play a role in diabetes and atherosclerosis. Genetic manipulation of 12/15LO in mice indicated that 12/15 LO regulates the degradation of Abcg1 through p38- and c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2)-dependent pathways and macrophage cholesterol efflux to HDL [106].

Beyond macrophages, Abcg1 was demonstrated to play a major role in regulation of subcellular cholesterol distribution in mouse pancreatic β cells [107]. Indeed, loss of Abcg1 in β cells reduced granule cholesterol content and altered granule morphology leading to an impaired insulin secretion. Thus, *Abcg1*$^{-/-}$ mice fed a chow diet exhibited an impaired glucose tolerance and insulin secretion as compared to *Abcg1*$^{+/+}$ animals whereas insulin sensitivity was not altered. The relevance of those findings was strengthened by the observation that islet Abcg1 expression was decreased in hyperglycemic diabetic *db/db* mice and restored by the antidiabetic thiazolidinedione (PPARγ agonist). However, although insulin secretion was equally reduced in *Abcg1*$^{-/-}$ mice fed a chow diet in the work from Kruit et al., glucose tolerance was not affected in *Abcg1*$^{-/-}$ mice when compared to *Abcg1*$^{+/+}$ animals [108]. On the contrary, Abcg1-deficient mice fed a high fat diet were protected from glucose intolerance in comparison to their wild-type littermates [109]. Taken together, a large body of evidence suggests that Abcg1 could play a role in diabetes as well as in accelerated atherosclerosis associated to diabetes through modulation of insulin secretion and foam cell formation, respectively. However, it is still difficult to evaluate the impact of the impaired insulin secretion consecutive to Abcg1 deficiency in diabetes since glucose intolerance was not a common feature in *Abcg1*$^{-/-}$ mice. In addition, although macrophage Abcg1 expression was consistently found reduced in diabetic mice or in response to stimuli relevant to diabetes (PUFA, glucose, AGEs), the impact of such a reduction on macrophage cholesterol efflux and potentially atherogenesis was not evaluated directly in experimental models in which Abcg1 expression may be manipulated (*Abcg1* KO or *Abcg1* KD). Additional investigations in appropriate mouse models are therefore required in order to evaluate the overall physiopathological consequences of the reduced Abcg1 expression in diabetes.

7.2. Genetic Modulation of Human ABCG1

Similar to what was observed in diabetic mice, expression of macrophage ABCG1 was reduced in patients with T2D as compared to control subjects [110]. Indeed, blood monocyte-derived macrophages from T2D patients displayed a decreased cholesterol efflux to HDL, but not to ApoA-I, and an increased cholesterol accumulation relative to control individuals. Interestingly, treatment with a LXR agonist induced ABCG1 expression and attenuated cholesterol accumulation in macrophages from T2D patients [110]. A reduction of *ABCG1* expression was also reported in peripheral blood mononuclear cells from Iranian patients with Metabolic Syndrome exhibiting high fasting glycemia in comparison to the control group [111]. Consistent with studies in murine cells, high glucose and PUFAs repressed ABCG1 expression in human macrophages [112,113] whereas a conjugated linoleic acid isomer (trans-9, trans-11-CLA) was reported to activate ABCG1 expression through sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c [114]. In order to determine whether genetic variation in *ABCG1* may predict T2D in the general population, Schou et al. genotyped several *ABCG1* SNPs in 40,600 individuals from the CCHS [115]. However, none of the 14 *ABCG1* SNPs tested was associated with an increased risk of T2D. Finally, analysis of two functional *ABCG1* SNPs (rs1378577, −134 T > G and rs1893590, −204 A > C in the promoter region) in 1320 French morbidly obese patients (BMI > 40 kg/m^3) failed to detect any association between the 2 SNPs and homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) with or without adjustment for BMI [75].

7.3. Epigenetic Modulation of Human ABCG1

Although analysis of genetic variations in *ABCG1* failed to report any relationship between ABCG1 and diabetes, numerous studies highlighted a link between epigenetic modulation of *ABCG1* and IR and diabetes. Hidalgo et al. first reported that DNA methylation at the *ABCG1* locus was significantly associated with insulin and HOMA-IR [116]. Indeed, EWAS conducted in blood $CD4^+$ T cells from 837 non-diabetic individuals in the GOLDN study identified that methylation at two *ABCG1* CpG site (cg06500161 and cg01881899) was associated with fasting insulin and HOMA-IR. This observation was replicated and enriched in a recent EWAS performed in whole blood samples from 1440 non-diabetic individuals of the KORA F4 study [117]. In this study, the *ABCG1* CpG site cg06500161 was associated with reduced *ABCG1* expression and positively with fasting glucose, 2-h glucose, fasting insulin, 2-h insulin, glycated haemoglobin (HbA1c) and HOMA-IR, effects persisting after adjustment with BMI. Analysis of DNA methylation in a nested case-control study in Indian Asians and Europeans with incident T2D from the 8-year follow-up of 25,372 participants in the London life sciences prospective population (LOLIPOP) revealed that methylation at the *ABCG1* locus (cg06500161) was associated with future T2D incidence [118]. Indeed, the relative risk for incident T2D per 1% increase in methylation was 1.09 (95% CI: 1.07–1.11) at the *ABCG1* methylation marker. A similar risk for future T2D (OR = 1.09, 95% CI: 1.02–1.16) was reported by Dayeh et al. when DNA methylation at the *ABCG1* locus cg06500161 was conducted in blood DNA from 258 non-diabetic individuals from the Botnia prospective study [80]. In those two studies, cg06500161 was positively associated with diabetes-related traits including fasting glucose, HbA1c, fasting insulin and HOMA-IR. Interestingly, DNA methylation at cg06500161 was increased in blood and adipose tissue from subjects with T2D versus non-diabetic subjects [80]. Additional investigations in 850 pedigreed Mexican-American individuals from 39 families in the San Antonio family heart study (SAFHS) confirmed that methylation in *ABCG1* is a determinant of T2D in this population at high risk of developing T2D [119]. Thus, even after adjustment with BMI, cg06500161 was found significantly associated with fasting blood glucose, HOMA-IR and T2D. Further exploration was conducted in this population in order to evaluate genetic and epigenetic associations with the hypertriglyceridemic waist (HTGW) phenotype (high waist circumference (≥95 cm in men and ≥80 cm in women) combined with high serum TG concentration (≥2 mmol/L in men and ≥1.5 mmol/L in women)), as a marker of T2D and CVD [120]. Whereas GWAS detected no SNP in association with HTGW, EWAS identified that the *ABCG1* CpG site (cg06500161) was associated with HTGW and T2D, the association with T2D being significantly explained in part through HTGW.

As a whole, genetic and epigenetic studies of *ABCG1* in T2D and IR univocally demonstrated that genetic modulation of *ABCG1* was without effect on T2D and associated traits whereas methylation marks at the *ABCG1* locus were consistently associated with T2D as well as the risk to develop T2D. Indeed, methylation at *ABCG1* CpG sites was positively associated with all the diabetes-related traits including fasting glucose, fasting insulin, HbA1c and HOMA-IR suggesting that epigenetic regulation of ABCG1 expression by environmental exposure is a critical event in the prevalence and incidence of diabetes.

8. ABCG1: Role in Obesity and Weight Gain

8.1. Major Findings from Studies in Mice

No difference in body weight was reported in Abcg1-deficent mice or mice expressing human ABCG1 when fed a chow or a high-cholesterol diet supplemented with or without fat [55,60,61,88]. However, genome-wide screens in drosophila and mice led to the identification of *Abcg1* as a candidate for TG storage and obesity [109]. Indeed, Buchman et al. first reported that targeted disruption of *Abcg1* protected mice against diet-induced obesity (DIO) by reducing body weight gain and adipose tissue mass. In addition, $Abcg1^{-/-}$ exhibited a markedly decrease of the adipocyte size, an elevation of total energy expenditure and a reduction of food intake as compared to wild-type littermates. The possible underlying mechanism was afterward elucidated by Frisdal et al. who provided evidence

that adipocyte Abcg1 exerts a major role in adiposity and fat mass growth [75]. Indeed, Abcg1 ensured the optimal LPL-mediated TG hydrolysis in mouse adipocytes through promoting SM export which contributed to a concomitant induction of adipogenesis under the control of PPARγ and an increase of de novo TG synthesis and storage. Validation of the role of Abcg1 in adipocyte maturation was achieved by the local RNAi-silencing of Abcg1 expression in adipose tissue from mice fed a high-fat diet which led to a rapid decrease of adiposity and fat mass growth. Whereas an increased expression of adipose perilipin (*Plin*), *Pparγ*, and hormone-sensitive lipase (*hsl*) was observed in adipose tissue from male *Abcg1*$^{-/-}$ mice as compared to wild-type littermates upon a high-fat diet [109], the expression of those genes was markedly reduced in *Abcg1*-deficient adipocytes or in *Abcg1* knock down adipose tissue from mice fed a high-fat diet [75]. Those contrasting results clearly highlight that the expression of Abcg1 in cells others than adipocytes contributes, likely to an opposite way, to adipogenesis and adipocyte maturation. However, expression of Abcg1 appears equally critical in controlling inflammation in adipose tissue (AT). Indeed, Abcg1-mediated cholesterol efflux to HDL in mouse adipocyte generated an anti-inflammatory response that reduced expression of pro-inflammatory cytokines and chemotactic factors [121]. Thus, inhibition of Abcg1 expression in mouse adipocytes led to a reduction of plasma cholesterol content, a disruption of lipid rafts and an inhibition of the translocation of NADPH oxidase 4 into lipid rafts. As a consequence, reactive oxygen species (ROS) generation and inflammatory response induced by palmitate was abrogated following silencing of Abcg1. Moreover, BMT from donor *Abcg1*$^{-/-}$ or *Abcg1*$^{+/+}$ mice into recipient C57BL/6 mice fed a high-fat diet revealed that *Abcg1*$^{-/-}$ adipose tissue macrophages (ATM) from obese mice were enriched in cholesterol as compared to *Abcg1*$^{+/+}$ ATM [122]. Analysis of ATM activation indicated that alternatively activated (M2) macrophages were more abundant in *Abcg1*$^{-/-}$ ATM and that this effect could likely result from an impaired M2 macrophage chemotaxis due to Abcg1 deficiency. However, deletion of Abcg1 in myeloid cells in this study did not improve obesity or glucose intolerance [122]. Intriguingly, whereas Abcg1 expression was consistently increased in AT from obese mice as compared to lean mice [109,123], a further elevation of Abcg1 in epididymal AT was observed in *db/db* mice following caloric restriction [123]. The increase of Abcg1 expression in AT following caloric restriction was thought to result from an induction of Abcg1 in ATM and more especially in F4/80 expressing cells. Thus, the effect of myeloid Abcg1 on the regulation of ATM cholesterol content and M2 abundance in AT from obese mice was exacerbated by caloric restriction [122]. Then, although Abcg1 deficiency protects mice from DIO, the exact role of Abcg1 in AT appears complex with a potential antagonist role of Abcg1 in AT, in promoting adipocyte maturation and fat mass growth on the one hand and in attenuating inflammation on the other hand. In this context, it is interesting to note that glucagon-like peptide 1 (GLP-1)-based therapy (vildagliptin and exendin-4) was able to induce the expression of Abcg1 and cholesterol efflux in mouse adipocytes [124].

8.2. Genetic Modulation of Human ABCG1

Several studies reported that human *ABCG1* was expressed in adipose tissue [77,80] and similar to what observed in mice, *ABCG1* expression was highly induced during adipocyte maturation [75]. No association between *ABCG1* SNPs and BMI or waist-to-hip ratio was observed in individuals with a BMI < 30 kg/m^2 [65,67,73]. However, genotyping of two functional *ABCG1* SNPs (rs1378577, −134 T > G and rs1893590, −204 A > C in the promoter region) in 1320 French morbidly obese patients (BMI > 40 kg/m^2) revealed that those two SNPs were associated with BMI after adjustment for diabetes and HOMA-IR [75]. Indeed, obese individuals homozygous for the frequent allele of each SNP (rs1378577, TT and rs1893590, AA) displayed the higher BMI. Also BMI increased in parallel with the amount of the frequent AT haplotype. In coherence with this result, obese individuals carrying the −134TT or −204AA genotype exhibited the higher fat mass index. Analysis of *ABCG1* expression in adipose tissue biopsies indicated that *ABCG1* mRNA levels were more elevated in adipose tissue from obese patients carrying the AT haplotype than those carrying the CG haplotype and *ABCG1* mRNA levels in adipose tissue were positively correlated to adipocyte diameter. Association of *ABCG1*

genotype with obesity was replicated in two independent populations composed of either 595 severely obese (35 < BMI < 40 kg/m^2) or 216 diabetic obese (30 < BMI < 35 kg/m^2) from the diabetes atorvastatin lipid intervention (DALI) subjects [75]. This study reported for the first time that genetic modulation of *ABCG1* was intimately linked to fat mass growth and obesity in humans suggesting that ABCG1 might represent a potential therapeutic target in obesity [125]. Although this study suggests that an increase of ABCG1 expression in adipose tissue was positively associated with weight gain and BMI, it however appears that weight loss in obese individuals was not accompanied by a decrease of *ABCG1* expression in adipose tissue. Indeed, quantification of *ABCG1* mRNA levels in subcutaneous adipose tissue from obese individuals following caloric restriction [126–129] or surgery [130] indicated that *ABCG1* expression was not altered, the latter could even be increased [131].

8.3. Epigenetic Modulation of Human ABCG1

Although most of the metabolic disturbances in fat cells are normalized following gastric bypass surgery, patients in a post-obese (PO) state display adipose hyperplasia characterized by a smaller size but an increased number of fat cells as compared with never-obese (NO) women. In order to identify differentially methylated DNA sites linked to adipocyte hyperplasia in PO, genome-wide DNA methylation was analyzed in abdominal subcutaneous fat cells from women two years after gastric bypass surgery (PO, $n = 16$) and from never-obese women (NO, $n = 14$) [132]. Reduced DNA methylation at the *ABCG1* CpG site cg10192877 was detected in fat cells from PO women in comparison to NO women, which was associated with increased *ABCG1* mRNA levels in subcutaneous adipose tissue. Those results suggest that hyperplasia observed in PO women is associated with elevated ABCG1 expression in fat cells as compared NO women.

In order to decipher molecular mechanisms associated to obesity that contribute to obesity-related diseases, such as T2D and CVD, transcriptome and epigenome of circulating monocytes were conducted in 1264 participants from the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [133]. This study demonstrated that alterations of a cellular cholesterol metabolism network of 11 BMI-associated genes (including *ABCG1*) were associated with T2D and coronary artery calcium. More precisely, *ABCG1* expression in the coexpressed network module was downregulated with increasing BMI whereas methylation at the *ABCG1* CpG site cg06500161 was positively associated with BMI. Thus, the relationship between BMI and the expression of *ABCG1* in the module was partially explained through methylation [133]. Analysis of whole-genome DNA methylation in peripheral blood leucocytes from 2097 African American adults in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study reported that the increased methylation at two CpG sites within the *ABCG1* gene (cg06500161 and cg27243685) was positively associated with BMI [134]. Moreover, this study highlighted that methylation at cg06500161 was positively associated with waist circumference (WC). Finally, a very recent analysis carried out in a cohort of 1058 US women who had a sister with breast cancer but had not been diagnosed for the disease themselves (Sister Study) confirmed that blood DNA methylation of *ABCG1* (cg06500161) was associated with BMI [135]. Although the primary endpoint of those studies was T2D, a positive association between the *ABCG1* locus cg06500161 was reported with BMI in the Botnia prospective study [80], the LOLIPOP study [118] and with WC in the SAFHS [120]. Interestingly, the association of cg06500161 with obesity-related traits, such a BMI, waist-to-hip ratio and fat mass (total, android, ginoid and trunk) was only significant in the main group of individuals with BMI < 25 kg/m^2 [118].

Taken together, results from studies in mice and in humans led to conflicting conclusions. Findings from Abcg1-deficient mice suggest that Abcg1 promotes diet-induced obesity through the contribution of adipocyte Abcg1 in adipogenesis and fat mass growth. The deleterious role of Abcg1 in obesity is supported by genetic modulation of *ABCG1* in populations of obese individuals, although analysis of adipose *ABCG1* expression following weight loss in both mice and humans appears in contradiction with the proposed model for ABCG1. On the contrary, epigenetic modulation of *ABCG1* was undoubtedly positively associated with an increased BMI and BMI-related traits which would support a protective role of ABCG1 in obesity. Those apparent contrasting observations clearly indicate

that the role of adipose ABCG1 is still not yet fully elucidated and that further investigations are required in order to decipher the puzzling role of ABCG1 in obesity.

9. ABCG1: Role in Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD)

9.1. Major Findings from Studies in Mice

Although no study aimed to investigate the contribution of Abcg1 in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and more widely in fatty liver diseases (NAFLD) has been conducted, several lines of evidence indicate that Abcg1 plays an important role in lipid homeostasis in the liver. In rat liver, most of the *Abcg1* expression resided in Kupffer cells (KC) (51% of total) whereas liver endothelial and parenchymal cells only accounted for 24% and 26% of total expression at the basal level. However a high-cholesterol diet highly induced *Abcg1* expression in parenchymal cells but not in KC and endothelial cells which brought the *Abcg1* expression in parenchymal cells up to 60% of total liver [136]. The use of Abcg1 deficient mice harboring a lacZ cassette insertion in exon 3 of the *Abcg1* locus confirmed that Abcg1 was expressed at very low levels in hepatocytes under a chow diet although stimulation with a LXR agonist (TO901317) led to significant increase of Abcg1 expression [55]. Nevertheless, the feeding of Abcg1-deficient mice with a high-cholesterol and high-fat diet led to a massive accumulation of lipids (TG, cholesterol ester and phospholipids) in the liver, in both parenchymal cells and KC, indicating that the very low levels of *Abcg1* mRNA in hepatocytes are critical in liver lipid homeostasis. By contrast, expression of the human ABCG1 transgene led to a reduction of both cholesterol ester and phospholipids in the liver from mice fed a high-cholesterol and high-fat diet as compared to wild-type mice [55]. In an independent study, a discrete increase in sterol biosynthetic intermediate levels (lathosterol, lanosterol and desmosterol) was observed in liver from mice expressing the human *ABCG1* transgene fed a high-fat and high-cholesterol diet in comparison to wild-type animals [61]. Moreover, an increase of the hepatic expression of genes controlling cholesterol and fatty acids synthesis was observed in *Abcg1*$^{-/-}$ mice fed a chow diet with an increase of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (*Hmgcr*), farnesyl pyrophosphate (*Fpp*), acetylCoA carboxylase (*Acc*), sterol-CoA desaturase (*Sdc1*) and *Srebp1c* mRNA levels in comparison to control mice. However, an opposite decrease of *Srebp2, Ldlr and Hmgcr* mRNA levels was equally reported in *Abcg1*$^{-/-}$ mice fed a chow or a high-cholesterol diet relative to control mice, suggesting a decreased hepatic cholesterol synthesis and uptake in Abcg1-deficient mice [62]. In the latter study, feeding with a high-cholesterol diet led to a significant more elevated biliary cholesterol secretion in *Abcg1*$^{-/-}$ mice compared with controls. Although Abcg1 was initially proposed to protect from lipid accumulation in the liver under a high-fat and high-cholesterol diet [55], Buchmann et al. unexpectedly reported that ablation of Abcg1 prevented the diet-induced lipid accumulation in liver from mice fed a high-fat diet devoid of cholesterol [109]. This opposite phenotype might result from the activation of the LXR pathway in cholesterol-enriched diets which in turn might stimulate lipogenesis and TG synthesis through SREBP-1c activation. However, the observation that liver TG were found decreased in *Abcg1*$^{-/-}$ mice fed a chow diet supplemented with a LXR agonist (TO901317) as compared to control mice [62] does not support this hypothesis and suggests that a different mechanism occurs in order to explain the diet-specific control of liver lipid homeostasis by Abcg1.

9.2. Sparse Observations in Humans

Little information is available about the role of ABCG1 in lipid homeostasis in human liver. Analysis of expression of genes involved in cholesterol homeostasis in liver biopsies from obese patients that underwent bariatric surgery (14 with NASH and 17 with hepatosteatosis) in comparison to control liver biopsies from cadaveric liver donors or resection of liver metastasis (n = 7) indicated that liver *ABCG1* mRNA levels were modestly increased in patients with steatosis with or without NASH [137]. Interestingly, and in coherence with observation in Abcg1-defiencient mice fed a high-cholesterol diet [62], an increased expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*HMGCR*) and sterol

regulatory element-binding protein 2 (*SREBP2*) was also observed in liver from steatosis with or without NASH as compared to control biopsies [137]. However a more recent study performed in liver biopsies from 84 morbidly obese Mexican mestizo subjects who underwent bariatric surgery made the opposite observations [138]. Indeed, in this study, a reduction of liver ABCG1 protein levels was detected in patients with NASH as compared to control or steatosic livers while corresponding mRNA levels tended to be increased. Interestingly, ABCG1 protein levels were further decreased according to the different grades of fibrosis.

Thus, although ABCG1 appears to play an important role in the control of liver lipid homeostasis in mice in a diet-specific manner, such a role in humans remains to be demonstrated. Therefore, studies analyzing the genetic and epigenetic modulation of *ABCG1* in populations of patients with hepatosteatosis or NASH will greatly help to evaluate the contribution of ABCG1 expression in NAFLD.

10. Conclusions

A comprehensive review of the literature brought to light the critical role of the human ABCG1 transporter in CMD. Indeed, by redistributing cholesterol between cell membranes, ABCG1 not only maintains cellular cholesterol homeostasis but is also involved in the secretion and bioavailability of key molecules (LPL and insulin) controlling glucose and lipid metabolism. Studies in both mice and in humans, demonstrate modulation of ABCG1 expression in association with a large spectrum of metabolic disorders including diabetes, insulin resistance, obesity and CAD. However the precise role of ABCG1 in those disorders is still under debate since results obtained from studies in mice do not corroborate observations in humans and vice-versa. Nevertheless, it becomes clear that the epigenetic modulation of *ABCG1* is consistently associated with several metabolic disorders, including TG metabolism, diabetes-related traits, T2D risk, obesity and in a lesser degree to CAD (Table2). Those studies highlight that methylation at the *ABCG1* in response to environmental exposure might be critical in CMD. Indeed, CMD are complex diseases that result from close interactions between genetic and epigenetic mechanisms which are greatly influenced by environmental stimuli. However, further studies are needed to elucidate mechanisms underlying such regulations and to determine whether ABCG1 might constitute a therapeutic target in CMD.

Table 2. Relation between methylation at different *ABCG1* CpG loci and cardiovascular diseases, prevalence and incidence of type 2 diabete and obesity. CHD, coronary heart diseases; T2D, type 2 diabetes; MI, myocardial infarction; KORA, cooperative health research in the region of Augsburg; InCHIANTI, aging in the Chianti area; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; GOLDN, genetic of lipid lowering drugs and diet network; HbA1c, glycated haemoglobin; BMI, body mass index; LOLIPOP, London life science prospective population; HTGW, hypertriglyceridemic waist; WC, waist circumference; SAFHS, San Antonio family heart study; MESA, multi-ethnic study of atherosclerosis; ARIC, atherosclerosis risk in communities; FHS, Framingham heart study; PIVUS, prospective investigation of the vasculature in Uppsala seniors.

CpG Site	Position	CVD	Type 2 Diabete	Obesity	Direction	Cohort	*n*	Reference
CpGC3	*Not specified*	CAD			↔	Canadian Familial Hypercholesterolemia	22/22	[81]
ABCG1 promoter	*Not specified*	CHD			+	Chinese Han population	139	[99]
cg06500161	43,656,588	MI			+	KORA F3, KORA F4 and InCHIANTI (meta-analysis)	2747	[77]
			Fasting insulin and HOMA-IR		+	GOLDN	837	[116]
			Fasting glucose, fasting insulin, HbA1c and HOMA-IR		+	KORA F4	1440	[117]
			Risk of future T2D (fasting glucose, HbA1c, fasting	BMI and WHR, Fat mass	+	LOLIPOP	25,372	[118]
			Risk of future T2D (fasting glucose, HbA1c, fasting insulin and HOMA-IR) insulin	BMI	+	Non-diabetic from Botnia prospective study	258	[80]
			Risk of future T2D (fasting glucose and HOMA-IR) and HOMA-IR)		+	SAFHS	850	[119]
			HTGW and risk of T2D	WC	+			[120]
				BMI	+	MESA	1264	[133]
				BMI and WC	+	ARIC	2097	[134]
				BMI	+	Sister study	1058	[135]
cg27243685	43,642,366	CHD			+	FHS and PIVUS	2306	[79]
				BMI	+	ARIC	2097	[134]

Acknowledgments: INSERM and UPMC provided generous support for this study. This work was supported by the Fondation de France (WLG). LMH has received a research fellowship from the Île-de-France region, France (CORDDIM).

Author Contributions: Lise M. Hardy, Eric Frisdal and Wilfried Le Goff conducted the bibliographic search and wrote the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

11. Abbreviations

ABC	ATP-Binding Cassette
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
BMI	Body Mass Index
CAD	Coronary Artery Disease
CHD	Coronary Heart Disease
CMD	CardioMetabolic Disease
CpG	Cytosine Guanine dinucleotide
CVD	CardioVascular Diseases
EWAS	Epigenome-Wide Association Study
GWAS	Genome-Wide Association Study
HDL	High-Density Lipoprotein
HOMA-IR	HOmeostatic Model Assessment of Insulin Resistance
LDL	Low-Density Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipase
LXR	Liver X Receptor
MI	Myocardial Infarction
SM	Sphingomyelin
SNP	Single Nucelotide Polymorphism
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
T2D	Type 2 Diabetes
TC	Total Cholesterol
TG	Triglycerides
WC	Waist Circumference

12. References

1. Neumann, J.; Rose-Sperling, D.; Hellmich, U.A. Diverse relations between ABC transporters and lipids: An overview. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2016**. [CrossRef] [PubMed]
2. Tarling, E.J.; de Aguiar Vallim, T.Q.; Edwards, P.A. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 342–350. [CrossRef] [PubMed]
3. Schumacher, T.; Benndorf, R.A. ABC transport proteins in cardiovascular disease—A brief summary. *Molecules* **2017**, *22*, 589. [CrossRef] [PubMed]
4. Berge, K.E.; Tian, H.; Graf, G.A.; Yu, L.; Grishin, N.V.; Schultz, J.; Kwiterovich, P.; Shan, B.; Barnes, R.; Hobbs, H.H. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **2000**, *290*, 1771–1775. [CrossRef] [PubMed]
5. Lee, M.H.; Lu, K.; Hazard, S.; Yu, H.; Shulenin, S.; Hidaka, H.; Kojima, H.; Allikmets, R.; Sakuma, N.; Pegoraro, R.; et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 79–83. [CrossRef] [PubMed]
6. Tzavella, E.; Hatzimichael, E.; Kostara, C.; Bairaktari, E.; Elisaf, M.; Tsimihodimos, V. Sitosterolemia: A multifaceted metabolic disorder with important clinical consequences. *J. Clin. Lipidol.* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
7. Brooks-Wilson, A.; Marcil, M.; Clee, S.M.; Zhang, L.H.; Roomp, K.; van Dam, M.; Yu, L.; Brewer, C.; Collins, J.A.; Molhuizen, H.O.; et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 336–345. [CrossRef] [PubMed]

8. Bodzioch, M.; Orsó, E.; Klucken, J.; Langmann, T.; Böttcher, A.; Diederich, W.; Drobnik, W.; Barlage, S.; Büchler, C.; Porsch-Ozcürümez, M.; et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 347–351. [CrossRef] [PubMed]
9. Rust, S.; Rosier, M.; Funke, H.; Real, J.; Amoura, Z.; Piette, J.C.; Deleuze, J.F.; Brewer, H.B.; Duverger, N.; Denèfle, P.; et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 352–355. [CrossRef] [PubMed]
10. Lawn, R.M.; Wade, D.P.; Garvin, M.R.; Wang, X.; Schwartz, K.; Porter, J.G.; Seilhamer, J.J.; Vaughan, A.M.; Oram, J.F. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Investig.* **1999**, *104*, R25–R31. [CrossRef] [PubMed]
11. Brunham, L.R.; Singaraja, R.R.; Duong, M.; Timmins, J.M.; Fievet, C.; Bissada, N.; Kang, M.H.; Samra, A.; Fruchart, J.-C.; McManus, B.; et al. Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 548–554. [CrossRef] [PubMed]
12. Frikke-Schmidt, R.; Nordestgaard, B.G.; Jensen, G.B.; Steffensen, R.; Tybjaerg-Hansen, A. Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 180–186. [CrossRef] [PubMed]
13. Bochem, A.E.; van Wijk, D.F.; Holleboom, A.G.; Duivenvoorden, R.; Motazacker, M.M.; Dallinga-Thie, G.M.; de Groot, E.; Kastelein, J.J.P.; Nederveen, A.J.; Hovingh, G.K.; et al. ABCA1 mutation carriers with low high-density lipoprotein cholesterol are characterized by a larger atherosclerotic burden. *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 286–291. [CrossRef] [PubMed]
14. Klucken, J.; Büchler, C.; Orsó, E.; Kaminski, W.E.; Porsch-Özcürümez, M.; Liebisch, G.; Kapinsky, M.; Diederich, W.; Drobnik, W.; Dean, M.; 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. USA* **2000**, *97*, 817–822. [CrossRef] [PubMed]
15. Wang, N.; Lan, D.; Chen, W.; Matsuura, F.; Tall, A.R. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9774–9779. [CrossRef] [PubMed]
16. Savary, S.; Denizot, F.; Luciani, M.; Mattei, M.; Chimini, G. Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila* white gene. *Mamm. Genome* **1996**, *7*, 673–676. [CrossRef] [PubMed]
17. Croop, J.M.; Tiller, G.E.; Fletcher, J.A.; Lux, M.L.; Raab, E.; Goldenson, D.; Son, D.; Arciniegas, S.; Wu, R.L. Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene* **1997**, *185*, 77–85. [CrossRef]
18. Langmann, T.; Porsch-Ozcürümez, M.; Unkelbach, U.; Klucken, J.; Schmitz, G. Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1494*, 175–180. [CrossRef]
19. Lorkowski, S.; Kratz, M.; Wenner, C.; Schmidt, R.; Weitkamp, B.; Fobker, M.; Reinhardt, J.; Rauterberg, J.; Galinski, E.A.; Cullen, P. Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 821–830. [CrossRef] [PubMed]
20. Kennedy, M.A.; Venkateswaran, A.; Tarr, P.T.; Xenarios, I.; Kudoh, J.; Shimizu, N.; Edwards, P.A. 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. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39438–39447. [CrossRef] [PubMed]
21. Venkateswaran, A.; Repa, J.J.; Lobaccaro, J.M.; Bronson, A.; Mangelsdorf, D.J.; Edwards, P.A. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14700–14707. [CrossRef] [PubMed]
22. Sabol, S.L.; Brewer, H.B.; Santamarina-Fojo, S. The human ABCG1 gene: Identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 2151–2167. [CrossRef] [PubMed]
23. Ishibashi, M.; Filomenko, R.; Rébé, C.; Chevriaux, A.; Varin, A.; Derangère, V.; Bessède, G.; Gambert, P.; Lagrost, L.; Masson, D. Knock-down of the oxysterol receptor LXRα impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: Lack of compensation by LXRβ activation. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 122–129. [CrossRef] [PubMed]

24. Jakobsson, T.; Venteclef, N.; Toresson, G.; Damdimopoulos, A.E.; Ehrlund, A.; Lou, X.; Sanyal, S.; Steffensen, K.R.; Gustafsson, J.-A.; Treuter, E. GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus. *Mol. Cell* **2009**, *34*, 510–518. [CrossRef] [PubMed]
25. Hirayama, H.; Kimura, Y.; Kioka, N.; Matsuo, M.; Ueda, K. ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin. *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 496–502. [CrossRef] [PubMed]
26. Cserepes, J.; Szentpétery, Z.; Seres, L.; Ozvegy-Laczka, C.; Langmann, T.; Schmitz, G.; Glavinas, H.; Klein, I.; Homolya, L.; Váradi, A.; et al. Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: Indications for heterodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 860–867. [CrossRef] [PubMed]
27. Vaughan, A.M.; Oram, J.F. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30150–30157. [CrossRef] [PubMed]
28. Engel, T.; Bode, G.; Lueken, A.; Knop, M.; Kannenberg, F.; Nofer, J.-R.; Assmann, G.; Seedorf, U. Expression and functional characterization of ABCG1 splice variant ABCG1(666). *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4551–4559. [CrossRef] [PubMed]
29. Gelissen, I.C.; Cartland, S.; Brown, A.J.; Sandoval, C.; Kim, M.; Dinnes, D.L.; Lee, Y.; Hsieh, V.; Gaus, K.; Kritharides, L.; et al. Expression and stability of two isoforms of ABCG1 in human vascular cells. *Atherosclerosis* **2010**, *208*, 75–82. [CrossRef] [PubMed]
30. Burns, V.; Sharpe, L.J.; Gelissen, I.C.; Brown, A.J. Species variation in ABCG1 isoform expression: Implications for the use of animal models in elucidating ABCG1 function. *Atherosclerosis* **2013**, *226*, 408–411. [CrossRef] [PubMed]
31. Gelissen, I.C.; Sharpe, L.J.; Sandoval, C.; Rao, G.; Kockx, M.; Kritharides, L.; Jessup, W.; Brown, A.J. Protein kinase A modulates the activity of a major human isoform of ABCG1. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 2133–2140. [CrossRef] [PubMed]
32. Aleidi, S.M.; Howe, V.; Sharpe, L.J.; Yang, A.; Rao, G.; Brown, A.J.; Gelissen, I.C. The E3 ubiquitin ligases, HUWE1 and NEDD4-1, are involved in the post-translational regulation of the ABCG1 and ABCG4 lipid transporters. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 24604–24613. [CrossRef] [PubMed]
33. Hsieh, V.; Kim, M.-J.; Gelissen, I.C.; Brown, A.J.; Sandoval, C.; Hallab, J.C.; Kockx, M.; Traini, M.; Jessup, W.; Kritharides, L. Cellular cholesterol regulates ubiquitination and degradation of the cholesterol export proteins ABCA1 and ABCG1. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 7524–7536. [CrossRef] [PubMed]
34. Sharpe, L.J.; Rao, G.; Jones, P.M.; Glancey, E.; Aleidi, S.M.; George, A.M.; Brown, A.J.; Gelissen, I.C. Cholesterol sensing by the ABCG1 lipid transporter: Requirement of a CRAC motif in the final transmembrane domain. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*, 956–964. [CrossRef] [PubMed]
35. Xie, Q.; Engel, T.; Schnoor, M.; Niehaus, J.; Hofnagel, O.; Buers, I.; Cullen, P.; Seedorf, U.; Assmann, G.; Lorkowski, S. Cell surface localization of ABCG1 does not require LXR activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, e143–e144. [CrossRef] [PubMed]
36. Kobayashi, A.; Takanezawa, Y.; Hirata, T.; Shimizu, Y.; Misasa, K.; Kioka, N.; Arai, H.; Ueda, K.; Matsuo, M. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1791–1802. [CrossRef] [PubMed]
37. Gu, H.; Wang, F.; Alabi, A.; Deng, S.; Qin, S.; Zhang, D. Identification of an amino acid residue critical for plasma membrane localization of ATP-binding cassette transporter G1—Brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 253–255. [CrossRef] [PubMed]
38. Gelissen, I.C.; Harris, M.; Rye, K.-A.; Quinn, C.; Brown, A.J.; 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*, 534–540. [CrossRef] [PubMed]
39. Wang, N.; Ranalletta, M.; Matsuura, F.; Peng, F.; Tall, A.R. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 1310–1316. [CrossRef] [PubMed]
40. Gu, H.; Li, G.; Gao, X.; Berthiaume, L.G.; Zhang, D. Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: Effect on protein trafficking and function. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 1067–1078. [CrossRef] [PubMed]

41. Neufeld, E.B.; O'Brien, K.; Walts, A.D.; Stonik, J.A.; Malide, D.; Combs, C.A.; Remaley, A.T. The human ABCG1 transporter mobilizes plasma membrane and late endosomal non-sphingomyelin-associated-cholesterol for efflux and esterification. *Biology* **2014**, *3*, 866–891. [CrossRef] [PubMed]
42. Wang, F.; Li, G.; Gu, H.; Zhang, D. Characterization of the role of a highly conserved sequence in ATP binding cassette transporter G (ABCG) family in ABCG1 stability, oligomerization, and trafficking. *Biochemistry* **2013**, *52*, 9497–9509. [CrossRef] [PubMed]
43. Borst, P.; Elferink, R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 537–592. [CrossRef] [PubMed]
44. Hegyi, Z.; Homolya, L. Functional cooperativity between ABCG4 and ABCG1 isoforms. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156516. [CrossRef] [PubMed]
45. Tarr, P.T.; Edwards, P.A. ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 169–182. [CrossRef] [PubMed]
46. Vaughan, A.M.; Oram, J.F. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 2433–2443. [CrossRef] [PubMed]
47. Engel, T.; Kannenberg, F.; Fobker, M.; Nofer, J.-R.; Bode, G.; Lueken, A.; Assmann, G.; Seedorf, U. Expression of ATP binding cassette-transporter ABCG1 prevents cell death by transporting cytotoxic 7beta-hydroxycholesterol. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 1673–1680. [CrossRef] [PubMed]
48. Terasaka, N.; Yu, S.; Yvan-Charvet, L.; Wang, N.; Mzhavia, N.; Langlois, R.; Pagler, T.; Li, R.; Welch, C.L.; Goldberg, I.J.; et al. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 3701–3713. [CrossRef] [PubMed]
49. Li, D.; Zhang, Y.; Ma, J.; Ling, W.; Xia, M. Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1354–1362. [CrossRef] [PubMed]
50. Engel, T.; Fobker, M.; Buchmann, J.; Kannenberg, F.; Rust, S.; Nofer, J.-R.; Schürmann, A.; Seedorf, U. 3β,5α,6β-Cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol accumulate in ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)-deficiency. *Atherosclerosis* **2014**, *235*, 122–129. [CrossRef] [PubMed]
51. Olivier, M.; Bottg, R.; Frisdal, E.; Nowick, M.; Plengpanich, W.; Desmarchelier, C.; Roi, S.; Quinn, C.M.; Gelissen, I.; Jessup, W.; et al. ABCG1 is involved in vitamin E efflux. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 1741–1751. [CrossRef] [PubMed]
52. Larrede, S.; Quinn, C.M.; Jessup, W.; Frisdal, E.; Olivier, M.; Hsieh, V.; Kim, M.-J.; van Eck, M.; Couvert, P.; Carrie, A.; et al. Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 1930–1936. [CrossRef] [PubMed]
53. Tarling, E.J.; Edwards, P.A. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 19719–19724. [CrossRef] [PubMed]
54. Sankaranarayanan, S.; Oram, J.F.; Asztalos, B.F.; Vaughan, A.M.; Lund-Katz, S.; Adorni, M.P.; Phillips, M.C.; Rothblat, G.H. Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 275–284. [CrossRef] [PubMed]
55. Kennedy, M.A.; Barrera, G.C.; Nakamura, K.; Baldán, A.; Tarr, P.; Fishbein, M.C.; Frank, J.; Francone, O.L.; Edwards, P.A. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 121–131. [CrossRef] [PubMed]
56. Baldán, Á.; Tarr, P.; Vales, C.S.; Frank, J.; Shimotake, T.K.; Hawgood, S.; Edwards, P.A. Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipidosis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29401–29410. [CrossRef] [PubMed]
57. Thomassen, M.J.; Barna, B.P.; Malur, A.G.; Bonfield, T.L.; Farver, C.F.; Malur, A.; Dalrymple, H.; Kavuru, M.S.; Febbraio, M. ABCG1 is deficient in alveolar macrophages of GM-CSF knockout mice and patients with pulmonary alveolar proteinosis. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 2762–2768. [CrossRef] [PubMed]
58. Malur, A.; Huizar, I.; Wells, G.; Barna, B.P.; Malur, A.G.; Thomassen, M.J. Lentivirus-ABCG1 instillation reduces lipid accumulation and improves lung compliance in GM-CSF knock-out mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *415*, 288–293. [CrossRef] [PubMed]

59. De Aguiar Vallim, T.Q.; Lee, E.; Merriott, D.J.; Goulbourne, C.N.; Cheng, J.; Cheng, A.; Gonen, A.; Allen, R.M.; Palladino, E.N. D.; Ford, D.A.; et al. ABCG1 regulates pulmonary surfactant metabolism in mice and men. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 941–954. [CrossRef] [PubMed]
60. Out, R.; Hoekstra, M.; Meurs, I.; de Vos, P.; Kuiper, J.; van Eck, M.; van Berkel, T.J. C. Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 594–599. [CrossRef] [PubMed]
61. Burgess, B.; Naus, K.; Chan, J.; Hirsch-Reinshagen, V.; Tansley, G.; Matzke, L.; Chan, B.; Wilkinson, A.; Fan, J.; Donkin, J.; et al. Overexpression of human ABCG1 does not affect atherosclerosis in fat-fed ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1731–1737. [CrossRef] [PubMed]
62. Wiersma, H.; Nijstad, N.; de Boer, J.F.; Out, R.; Hogewerf, W.; van Berkel, T.J.; Kuipers, F.; Tietge, U.J. F. Lack of Abcg1 results in decreased plasma HDL cholesterol levels and increased biliary cholesterol secretion in mice fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* **2009**, *206*, 141–147. [CrossRef] [PubMed]
63. Iida, A.; Saito, S.; Sekine, A.; Mishima, C.; Kitamura, Y.; Kondo, K.; Harigae, S.; Osawa, S.; Nakamura, Y. Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *J. Hum. Genet.* **2002**, *47*, 285–310. [CrossRef] [PubMed]
64. Furuyama, S.; Uehara, Y.; Zhang, B.; Baba, Y.; Abe, S.; Iwamoto, T.; Miura, S.-I.; Saku, K. Genotypic effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men. *J. Atheroscler. Thromb.* **2009**, *16*, 194–200. [CrossRef] [PubMed]
65. Olivier, M.; Tanck, M.W.; Out, R.; Villard, E.F.; Lammers, B.; Bouchareychas, L.; Frisdal, E.; Superville, A.; van Berkel, T.; Kastelein, J.J.; et al. Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2223–2231. [CrossRef] [PubMed]
66. Xu, Y.; Wang, W.; Zhang, L.; Qi, L.-P.; Li, L.-Y.; Chen, L.-F.; Fang, Q.; Dang, A.-M.; Yan, X.-W. A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis* **2011**, *219*, 648–654. [CrossRef] [PubMed]
67. Liu, F.; Wang, W.; Xu, Y.; Wang, Y.; Chen, L.-F.; Fang, Q.; Yan, X.-W. ABCG1 rs57137919G>a polymorphism is functionally associated with varying gene expression and apoptosis of macrophages. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97044. [CrossRef] [PubMed]
68. Schou, J.; Frikke-Schmidt, R.; Kardassis, D.; Thymiakou, E.; Nordestgaard, B.G.; Jensen, G.; Grande, P.; Tybjærg-Hansen, A. Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 506–515. [CrossRef] [PubMed]
69. Edmondson, A.C.; Braund, P.S.; Stylianou, I.M.; Khera, A.V.; Nelson, C.P.; Wolfe, M.L.; Derohannessian, S.L.; Keating, B.J.; Qu, L.; He, J.; et al. Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2011**, *4*, 145–155. [CrossRef] [PubMed]
70. Abellán, R.; Mansego, M.L.; Martínez-Hervás, S.; Martín-Escudero, J.C.; Carmena, R.; Real, J.T.; Redon, J.; Castrodeza-Sanz, J.J.; Chaves, F.J. Association of selected ABC gene family single nucleotide polymorphisms with postprandial lipoproteins: Results from the population-based Hortega study. *Atherosclerosis* **2010**, *211*, 203–209. [CrossRef] [PubMed]
71. Ko, D.T.; Alter, D.A.; Guo, H.; Koh, M.; Lau, G.; Austin, P.C.; Booth, G.L.; Hogg, W.; Jackevicius, C.A.; Lee, D.S.; et al. High-density lipoprotein cholesterol and cause-specific mortality in individuals without previous cardiovascular conditions: The CANHEART study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *68*, 2073–2083. [CrossRef] [PubMed]
72. Abellán, R.; Mansego, M.L.; Martínez-Hervás, S.; Morcillo, S.; Pineda-Alonso, M.; Carmena, R.; Real, J.T.; Redon, J.; Rojo-Martínez, G.; Martín-Escudero, J.C.; et al. Dietary polyunsaturated fatty acids may increase plasma LDL-cholesterol and plasma cholesterol concentrations in carriers of an ABCG1 gene single nucleotide polymorphism: Study in two Spanish populations. *Atherosclerosis* **2011**, *219*, 900–906. [CrossRef] [PubMed]
73. Zago, V.H. S.; Scherrer, D.Z.; Parra, E.S.; Panzoldo, N.B.; Alexandre, F.; Nakandakare, E.R.; Quintão, E.C.R.; de Faria, E.C. Association between ABCG1 polymorphism rs1893590 and high-density lipoprotein (HDL) in an asymptomatic Brazilian population. *Mol. Biol. Rep.* **2015**, *42*, 745–754. [CrossRef] [PubMed]
74. Asselbergs, F.W.; Guo, Y.; van Iperen, E.P. A.; Sivapalaratnam, S.; Tragante, V.; Lanktree, M.B.; Lange, L.A.; Almoguera, B.; Appelman, Y.E.; Barnard, J.; et al. Large-scale gene-centric meta-analysis across 32 studies identifies multiple lipid loci. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *91*, 823–838. [CrossRef] [PubMed]

75. Frisdal, E.; Le Lay, S.; Hooton, H.; Poupel, L.; Olivier, M.; Alili, R.; Plengpanich, W.; Villard, E.F.; Gilibert, S.; Lhomme, M.; et al. Adipocyte ATP-binding cassette G1 promotes triglyceride storage, fat mass growth, and human obesity. *Diabetes* **2015**, *64*, 840–855. [CrossRef] [PubMed]
76. Braun, K.V.E.; Voortman, T.; Dhana, K.; Troup, J.; Bramer, W.M.; Troup, J.; Chowdhury, R.; Dehghan, A.; Muka, T.; Franco, O.H. The role of DNA methylation in dyslipidaemia: A systematic review. *Prog. Lipid Res.* **2016**, *64*, 178–191. [CrossRef] [PubMed]
77. Pfeiffer, L.; Wahl, S.; Pilling, L.C.; Reischl, E.; Sandling, J.K.; Kunze, S.; Holdt, L.M.; Kretschmer, A.; Schramm, K.; Adamski, J.; et al. DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2015**, *8*, 334–342. [CrossRef] [PubMed]
78. Braun, K.V.E.; Dhana, K.; de Vries, P.S.; Voortman, T.; van Meurs, J.B.J.; Uitterlinden, A.G.; BIOS consortium; Hofman, A.; Hu, F.B.; Franco, O.H.; et al. Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: The Rotterdam study. *Clin. Epigenet.* **2017**, *9*, 15. [CrossRef] [PubMed]
79. Hedman, Å.K.; Mendelson, M.M.; Marioni, R.E.; Gustafsson, S.; Joehanes, R.; Irvin, M.R.; Zhi, D.; Sandling, J.K.; Yao, C.; Liu, C.; et al. Epigenetic patterns in blood associated with lipid traits predict incident coronary heart disease events and are enriched for results from genome-wide association studies. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2017**, *10*, e001487. [CrossRef] [PubMed]
80. Dayeh, T.; Tuomi, T.; Almgren, P.; Perfilyev, A.; Jansson, P.-A.; de Mello, V.D.; Pihlajamäki, J.; Vaag, A.; Groop, L.; Nilsson, E.; et al. DNA methylation of loci within ABCG1 and PHOSPHO1 in blood DNA is associated with future type 2 diabetes risk. *Epigenetics* **2016**, *11*, 482–488. [CrossRef] [PubMed]
81. Guay, S.-P.; Brisson, D.; Lamarche, B.; Gaudet, D.; Bouchard, L. Epipolymorphisms within lipoprotein genes contribute independently to plasma lipid levels in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics* **2014**, *9*, 718–729. [CrossRef] [PubMed]
82. Lai, C.-Q.; Wojczynski, M.K.; Parnell, L.D.; Hidalgo, B.A.; Irvin, M.R.; Aslibekyan, S.; Province, M.A.; Absher, D.M.; Arnett, D.K.; Ordovás, J.M. Epigenome-wide association study of triglyceride postprandial responses to a high-fat dietary challenge. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 2200–2207. [CrossRef] [PubMed]
83. Petersen, A.-K.; Zeilinger, S.; Kastenmüller, G.; Römisch-Margl, W.; Brugger, M.; Peters, A.; Meisinger, C.; Strauch, K.; Hengstenberg, C.; Pagel, P.; et al. Epigenetics meets metabolomics: An epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 534–545. [CrossRef] [PubMed]
84. Dekkers, K.F.; van Iterson, M.; Slieker, R.C.; Moed, M.H.; Bonder, M.J.; van Galen, M.; Mei, H.; Zhernakova, D.V.; van den Berg, L.H.; Deelen, J.; et al. Blood lipids influence DNA methylation in circulating cells. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 138. [CrossRef] [PubMed]
85. Terasaka, N.; Wang, N.; Yvan-Charvet, L.; Tall, A.R. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15093–15098. [CrossRef] [PubMed]
86. Whetzel, A.M.; Sturek, J.M.; Nagelin, M.H.; Bolick, D.T.; Gebre, A.K.; Parks, J.S.; Bruce, A.C.; Skaflen, M.D.; Hedrick, C.C. ABCG1 deficiency in mice promotes endothelial activation and monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 809–817. [CrossRef] [PubMed]
87. Münch, G.; Bültmann, A.; Li, Z.; Holthoff, H.-P.; Ullrich, J.; Wagner, S.; Ungerer, M. Overexpression of ABCG1 protein attenuates arteriosclerosis and endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Heart Int.* **2012**, *7*, e12. [CrossRef] [PubMed]
88. Basso, F.; Amar, M.J.; Wagner, E.M.; Vaisman, B.; Paigen, B.; Santamarina-Fojo, S.; Remaley, A.T. Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *351*, 398–404. [CrossRef] [PubMed]
89. Baldán, A.; Pei, L.; Lee, R.; Tarr, P.; Tangirala, R.K.; Weinstein, M.M.; Frank, J.; Li, A.C.; Tontonoz, P.; Edwards, P.A. Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr$^{-/-}$ and ApoE$^{-/-}$ mice transplanted with Abcg1$^{-/-}$ bone marrow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 2301–2307. [CrossRef] [PubMed]
90. Ranalletta, M.; Wang, N.; Han, S.; Yvan-Charvet, L.; Welch, C.; Tall, A.R. Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1$^{-/-}$ bone marrow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 2308–2315. [CrossRef] [PubMed]

91. Out, R.; Hoekstra, M.; Hildebrand, R.B.; Kruit, J.K.; Meurs, I.; Li, Z.; Kuipers, F.; van Berkel, T.J.C.; van Eck, M. Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 2295–2300. [CrossRef] [PubMed]
92. Yvan-Charvet, L.; Ranalletta, M.; Wang, N.; Han, S.; Terasaka, N.; Li, R.; Welch, C.; Tall, A.R. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 3900–3908. [CrossRef] [PubMed]
93. Out, R.; Hoekstra, M.; Habets, K.; Meurs, I.; de Waard, V.; Hildebrand, R.B.; Wang, Y.; Chimini, G.; Kuiper, J.; van Berkel, T.J.C.; 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. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 258–264. [CrossRef] [PubMed]
94. Tarling, E.J.; Bojanic, D.D.; Tangirala, R.K.; Wang, X.; Lovgren-Sandblom, A.; Lusis, A.J.; Bjorkhem, I.; Edwards, P.A. Impaired development of atherosclerosis in Abcg1$^{-/-}$ Apoe$^{-/-}$ mice: Identification of specific oxysterols that both accumulate in Abcg1$^{-/-}$ Apoe$^{-/-}$ tissues and induce apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1174–1180. [CrossRef] [PubMed]
95. Meurs, I.; Lammers, B.; Zhao, Y.; Out, R.; Hildebrand, R.B.; Hoekstra, M.; van Berkel, T.J.C.; van Eck, M. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. *Atherosclerosis* **2012**, *221*, 41–47. [CrossRef] [PubMed]
96. Out, R.; Jessup, W.; Le Goff, W.; Hoekstra, M.; Gelissen, I.C.; Zhao, Y.; Kritharides, L.; Chimini, G.; Kuiper, J.; Chapman, M.J.; et al. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ. Res.* **2008**, *102*, 113–120. [CrossRef] [PubMed]
97. Sivapalaratnam, S.; Basart, H.; Watkins, N.A.; Maiwald, S.; Rendon, A.; Krishnan, U.; Sondermeijer, B.M.; Creemers, E.E.; Pinto-Sietsma, S.J.; Hovingh, K.; et al. Monocyte gene expression signature of patients with early onset coronary artery disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32166. [CrossRef] [PubMed]
98. Li, Q.; Liu, X.; Zhu, R.; He, Z. Association of ATP-binding cassette transporter G1 polymorphisms with risk of ischemic stroke in the Chinese Han population. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **2015**, *24*, 1397–1404. [CrossRef] [PubMed]
99. Peng, P.; Wang, L.; Yang, X.; Huang, X.; Ba, Y.; Chen, X.; Guo, J.; Lian, J.; Zhou, J. A preliminary study of the relationship between promoter methylation of the ABCG1, GALNT2 and HMGCR genes and coronary heart disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102265. [CrossRef] [PubMed]
100. Le Goff, W.; Dallinga-Thie, G.M. ABCG1: Not as good as expected? *Atherosclerosis* **2011**, *219*, 393–394. [CrossRef] [PubMed]
101. Xu, M.; Zhou, H.; Tan, K.C.B.; Guo, R.; Shiu, S.W.M.; Wong, Y. ABCG1 mediated oxidized LDL-derived oxysterol efflux from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 1349–1354. [CrossRef] [PubMed]
102. Terasaka, N.; Westerterp, M.; Koetsveld, J.; Fernández-Hernando, C.; Yvan-Charvet, L.; Wang, N.; Sessa, W.C.; Tall, A.R. ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 2219–2225. [CrossRef] [PubMed]
103. Mauldin, J.P.; Srinivasan, S.; Mulya, A.; Gebre, A.; Parks, J.S.; Daugherty, A.; Hedrick, C.C. Reduction in ABCG1 in Type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 21216–21224. [CrossRef] [PubMed]
104. Daffu, G.; Shen, X.; Senatus, L.; Thiagarajan, D.; Abedini, A.; Hurtado Del Pozo, C.; Rosario, R.; Song, F.; Friedman, R.A.; Ramasamy, R.; et al. RAGE suppresses ABCG1-mediated macrophage cholesterol efflux in diabetes. *Diabetes* **2015**, *64*, 4046–4060. [CrossRef] [PubMed]
105. Nagelin, M.H.; Srinivasan, S.; Lee, J.; Nadler, J.L.; Hedrick, C.C. 12/15-Lipoxygenase activity increases the degradation of macrophage ATP-binding cassette transporter G1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1811–1819. [CrossRef] [PubMed]
106. Nagelin, M.H.; Srinivasan, S.; Nadler, J.L.; Hedrick, C.C. Murine 12/15-lipoxygenase regulates ATP-binding cassette transporter G1 protein degradation through p38- and JNK2-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 31303–31314. [CrossRef] [PubMed]

107. Sturek, J.M.; Castle, J.D.; Trace, A.P.; Page, L.C.; Castle, A.M.; Evans-Molina, C.; Parks, J.S.; Mirmira, R.G.; Hedrick, C.C. An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 2575–2589. [CrossRef] [PubMed]
108. Kruit, J.K.; Wijesekara, N.; Westwell-Roper, C.; Vanmierlo, T.; de Haan, W.; Bhattacharjee, A.; Tang, R.; Wellington, C.L.; LütJohann, D.; Johnson, J.D.; et al. Loss of both ABCA1 and ABCG1 results in increased disturbances in islet sterol homeostasis, inflammation, and impaired β-cell function. *Diabetes* **2012**, *61*, 659–664. [CrossRef] [PubMed]
109. Buchmann, J.; Meyer, C.; Neschen, S.; Augustin, R.; Schmolz, K.; Kluge, R.; Al-Hasani, H.; Jürgens, H.; Eulenberg, K.; Wehr, R.; et al. Ablation of the cholesterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 reduces adipose cell size and protects against diet-induced obesity. *Endocrinology* **2007**, *148*, 1561–1573. [CrossRef] [PubMed]
110. Mauldin, J.P.; Nagelin, M.H.; Wojcik, A.J.; Srinivasan, S.; Skaflen, M.D.; Ayers, C.R.; McNamara, C.A.; Hedrick, C.C. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **2008**, *117*, 2785–2792. [CrossRef] [PubMed]
111. Tavoosi, Z.; Moradi-Sardareh, H.; Saidijam, M.; Yadegarazari, R.; Borzuei, S.; Soltanian, A.; Goodarzi, M.T. Cholesterol transporters ABCA1 and ABCG1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells in patients with metabolic syndrome. *Cholesterol* **2015**, *2015*, 682904. [CrossRef] [PubMed]
112. Uehara, Y.; Miura, S.; von Eckardstein, A.; Abe, S.; Fujii, A.; Matsuo, Y.; Rust, S.; Lorkowski, S.; Assmann, G.; Yamada, T.; et al. Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element. *Atherosclerosis* **2007**, *191*, 11–21. [CrossRef] [PubMed]
113. Mauerer, R.; Ebert, S.; Langmann, T. High glucose, unsaturated and saturated fatty acids differentially regulate expression of ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1 in human macrophages. *Exp. Mol. Med.* **2009**, *41*, 126–132. [CrossRef] [PubMed]
114. Ecker, J.; Langmann, T.; Moehle, C.; Schmitz, G. Isomer specific effects of conjugated linoleic acid on macrophage ABCG1 transcription by a SREBP-1c dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *352*, 805–811. [CrossRef] [PubMed]
115. Schou, J.; Tybjærg-Hansen, A.; Møller, H.J.; Nordestgaard, B.G.; Frikke-Schmidt, R. ABC transporter genes and risk of type 2 diabetes: A study of 40,000 individuals from the general population. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 2600–2606. [CrossRef] [PubMed]
116. Hidalgo, B.; Irvin, M.R.; Sha, J.; Zhi, D.; Aslibekyan, S.; Absher, D.; Tiwari, H.K.; Kabagambe, E.K.; Ordovas, J.M.; Arnett, D.K. Epigenome-wide association study of fasting measures of glucose, insulin, and HOMA-IR in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study. *Diabetes* **2014**, *63*, 801–807. [CrossRef] [PubMed]
117. Kriebel, J.; Herder, C.; Rathmann, W.; Wahl, S.; Kunze, S.; Molnos, S.; Volkova, N.; Schramm, K.; Carstensen-Kirberg, M.; Waldenberger, M.; et al. Association between DNA methylation in whole blood and measures of glucose metabolism: KORA F4 study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152314. [CrossRef] [PubMed]
118. Chambers, J.C.; Loh, M.; Lehne, B.; Drong, A.; Kriebel, J.; Motta, V.; Wahl, S.; Elliott, H.R.; Rota, F.; Scott, W.R.; et al. Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: A nested case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2015**, *3*, 526–534. [CrossRef]
119. Kulkarni, H.; Kos, M.Z.; Neary, J.; Dyer, T.D.; Kent, J.W.; Göring, H.H.H.; Cole, S.A.; Comuzzie, A.G.; Almasy, L.; Mahaney, M.C.; et al. Novel epigenetic determinants of type 2 diabetes in Mexican-American families. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 5330–5344. [CrossRef] [PubMed]
120. Mamtani, M.; Kulkarni, H.; Dyer, T.D.; Göring, H.H.H.; Neary, J.L.; Cole, S.A.; Kent, J.W.; Kumar, S.; Glahn, D.C.; Mahaney, M.C.; et al. Genome- and epigenome-wide association study of hypertriglyceridemic waist in Mexican American families. *Clin. Epigenet.* **2016**, *8*, 6. [CrossRef] [PubMed]
121. Umemoto, T.; Han, C.Y.; Mitra, P.; Averill, M.M.; Tang, C.; Goodspeed, L.; Omer, M.; Subramanian, S.; Wang, S.; Den Hartigh, L.J.; et al. Apolipoprotein AI and high-density lipoprotein have anti-inflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 1345–1354. [CrossRef] [PubMed]

122. Wei, H.; Tarling, E.J.; McMillen, T.S.; Tang, C.; LeBoeuf, R.C. ABCG1 regulates mouse adipose tissue macrophage cholesterol levels and ratio of M1 to M2 cells in obesity and caloric restriction. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2337–2347. [CrossRef] [PubMed]
123. Edgel, K.A.; McMillen, T.S.; Wei, H.; Pamir, N.; Houston, B.A.; Caldwell, M.T.; Mai, P.-O.T.; Oram, J.F.; Tang, C.; Leboeuf, R.C. Obesity and weight loss result in increased adipose tissue ABCG1 expression in db/db mice. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 425–434. [CrossRef] [PubMed]
124. Mostafa, A.M.; Hamdy, N.M.; El-Mesallamy, H.O.; Abdel-Rahman, S.Z. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)-based therapy upregulates LXR-ABCA1/ABCG1 cascade in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *468*, 900–905. [CrossRef] [PubMed]
125. Frisdal, E.; Le Goff, W. Adipose ABCG1: A potential therapeutic target in obesity? *Adipocyte* **2015**, *4*, 315–318. [CrossRef] [PubMed]
126. Campbell, K.L.; Foster-Schubert, K.E.; Makar, K.W.; Kratz, M.; Hagman, D.; Schur, E.A.; Habermann, N.; Horton, M.; Abbenhardt, C.; Kuan, L.-Y.; et al. Gene expression changes in adipose tissue with diet- and/or exercise-induced weight loss. *Cancer Prev. Res.* **2013**, *6*, 217–231. [CrossRef] [PubMed]
127. Nookaew, I.; Svensson, P.-A.; Jacobson, P.; Jernås, M.; Taube, M.; Larsson, I.; Andersson-Assarsson, J.C.; Sjöström, L.; Froguel, P.; Walley, A.; et al. Adipose tissue resting energy expenditure and expression of genes involved in mitochondrial function are higher in women than in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E370–E378. [CrossRef] [PubMed]
128. Rizkalla, S.W.; Prifti, E.; Cotillard, A.; Pelloux, V.; Rouault, C.; Allouche, R.; Laromiguière, M.; Kong, L.; Darakhshan, F.; Massiera, F.; et al. Differential effects of macronutrient content in 2 energy-restricted diets on cardiovascular risk factors and adipose tissue cell size in moderately obese individuals: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 49–63. [CrossRef] [PubMed]
129. Mutch, D.M.; Pers, T.H.; Temanni, M.R.; Pelloux, V.; Marquez-Quiñones, A.; Holst, C.; Martinez, J.A.; Babalis, D.; van Baak, M.A.; Handjieva-Darlenska, T.; et al. DiOGenes Project A distinct adipose tissue gene expression response to caloric restriction predicts 6-mo weight maintenance in obese subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *94*, 1399–1409. [CrossRef] [PubMed]
130. Hoggard, N.; Cruickshank, M.; Moar, K.-M.; Bashir, S.; Mayer, C.-D. Using gene expression to predict differences in the secretome of human omental vs. subcutaneous adipose tissue. *Obesity* **2012**, *20*, 1158–1167. [CrossRef] [PubMed]
131. Johansson, L.E.; Danielsson, A.P.H.; Parikh, H.; Klintenberg, M.; Norström, F.; Groop, L.; Ridderstråle, M. Differential gene expression in adipose tissue from obese human subjects during weight loss and weight maintenance. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 196–207. [CrossRef] [PubMed]
132. Dahlman, I.; Sinha, I.; Gao, H.; Brodin, D.; Thorell, A.; Rydén, M.; Andersson, D.P.; Henriksson, J.; Perfilyev, A.; Ling, C.; et al. The fat cell epigenetic signature in post-obese women is characterized by global hypomethylation and differential DNA methylation of adipogenesis genes. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 910–919. [CrossRef] [PubMed]
133. Ding, J.; Reynolds, L.M.; Zeller, T.; Müller, C.; Lohman, K.; Nicklas, B.J.; Kritchevsky, S.B.; Huang, Z.; de la Fuente, A.; Soranzo, N.; et al. Alterations of a cellular cholesterol metabolism network are a molecular feature of obesity-related type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes* **2015**, *64*, 3464–3474. [CrossRef] [PubMed]
134. Demerath, E.W.; Guan, W.; Grove, M.L.; Aslibekyan, S.; Mendelson, M.; Zhou, Y.-H.; Hedman, Å.K.; Sandling, J.K.; Li, L.-A.; Irvin, M.R.; et al. Epigenome-wide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 4464–4479. [CrossRef] [PubMed]
135. Wilson, L.E.; Harlid, S.; Xu, Z.; Sandler, D.P.; Taylor, J.A. An epigenome-wide study of body mass index and DNA methylation in blood using participants from the Sister Study cohort. *Int. J. Obes.* **2017**, *41*, 194–199. [CrossRef] [PubMed]
136. Hoekstra, M.; Kruijt, J.K.; van Eck, M.; van Berkel, T.J.C. Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25448–25453. [CrossRef] [PubMed]

137. Caballero, F.; Fernández, A.; de Lacy, A.M.; Fernández-Checa, J.C.; Caballería, J.; García-Ruiz, C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J. Hepatol.* **2009**, *50*, 789–796. [CrossRef] [PubMed]
138. Vega-Badillo, J.; Gutiérrez-Vidal, R.; Hernández-Pérez, H.A.; Villamil-Ramírez, H.; León-Mimila, P.; Sánchez-Muñoz, F.; Morán-Ramos, S.; Larrieta-Carrasco, E.; Fernández-Silva, I.; Méndez-Sánchez, N.; et al. Hepatic miR-33a/miR-144 and their target gene ABCA1 are associated with steatohepatitis in morbidly obese subjects. *Liver Int.* **2016**, *36*, 1383–1391. [CrossRef] [PubMed]

© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

DISCUSSION GENERALE

L'ensemble de mes travaux de recherches m'ont permis d'identifier de nouveaux acteurs notamment génétique et épigénétique, impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines HDL.

La première étude menée identifie le rôle du transporteur ABCG1 dans la détermination des fonctions des HDL, via une modulation de leur phospholipidome. Notre laboratoire a précédemment montré que le phospholipidome des différentes sous-fractions de HDL modulait leurs activités. L'enrichissement en PS est positivement corrélé avec l'amélioration des fonctions testées : capacité d'efflux de cholestérol, activité anti-oxydative, anti-apoptotique, anti-inflammatoire et anti-thrombotique (Camont et al., 2013; Kontush et al., 2015b). De la même manière, un groupe canadien a montré que des HDL reconstituées enrichies en PI ont des capacités à promouvoir l'efflux de cholestérol améliorées (Burgess et al., 2003).

J'ai mis en lumière le rôle d'ABCG1 dans l'hépatocyte, qui semble favoriser un réarrangement du contenu en PL des HDL. En conséquence, les HDL voient leurs fonctions athéroprotectrices, telle que leur capacité à réaliser de l'efflux de cholestérol, modulées. ABCG1 est donc le premier acteur proposé comme remodelant le phospholipidome des HDL, déterminant ainsi leurs fonctions athéroprotectrices.

J'ai en effet observé dans nos différents modèles que le remodelage opéré par ABCG1 stimulait notamment l'efflux de cholestérol des lipoprotéines HDL. Les résultats obtenus chez la souris n'entrainent pour autant pas de modifications des concentrations de HDL-C plasmatiques. De même, le contenu de chacune des classes de lipides mesurées chez la souris par les analyses lipidomiques n'est pas impacté par l'expression d'ABCG1 humain. Ces résultats sont en faveur d'un remodelage et d'un enrichissement en certains lipides spécifiques, plutôt qu'une accumulation globale dans la lipoprotéine. L'enrichissement pour certaines espèces moléculaires de PL et la diminution de la quantité de certaines autres dans les HDL suggèrent un déplacement d'espèces lipidiques suite à l'action d'ABCG1. De façon cohérente, l'expression d'*ABCG1* humain chez la souris, ainsi que les variations d'expression associées aux variants d'*ABCG1* chez l'Homme sont associés à des modifications similaires.

Ces changements subtils du phospholipidome des HDL sont cependant associés à des variations de fonctionnalités de ces particules. Parmi les espèces lipidiques identifiées dans nos différents modèles, nous avons montré que le remodelage des HDL par ABCG1 induisait une perte du PE (36:5), ce qui semble améliorer les fonctions athéroprotectrices des HDL. L'hypothèse du rôle

délétère du PE (36:5) est plébiscitée par des travaux menés dans une population d'individus atteints de maladie coronaire. Les auteurs ont réalisé des analyses lipidomiques du plasma et suggèrent que le profil lipidique pourrait être un outil de stratification des patients concernant leur risque CV. Dans cette étude, les concentrations plasmatiques de PE (36:5) sont augmentées chez les patients atteints de pathologie coronaire stable par rapport aux contrôles (Meikle et al., 2011). Une seconde étude identifie le PE (36:5) mesuré dans le plasma comme un facteur de risque de la survenue d'évènements CV, même après ajustement sur différents facteurs, dont les concentrations de HDL-C (Stegemann et al., 2014). Nous proposons donc qu'ABCG1, en modulant le contenu en PE (36:5) des HDL, pourrait ainsi impacter le risque de développer une ASCVD.

Pour mieux caractériser le rôle du PE (36:5) dans ce processus, nous allons produire des lipoprotéines HDL reconstituées à partir d'apo A-I isolée puis lipidée avec un PE (20:4 / 16:1) ($rHDL_{PE\ (36:5)}$) de synthèse. Les différentes fonctionnalités des $rHDL_{PE\ (36:5)}$ seront évaluées et comparées à des rHDL contrôles. La production et la sécrétion de chimiokines et cytokines inflammatoires après incubation des différentes rHDL sur des macrophages permettront d'évaluer les fonctions anti-inflammatoires des HDL. La capacité des $rHDL_{PE\ (36:5)}$ à faire de l'efflux de cholestérol sera également mesurée. Enfin, l'incubation de rHDL en présence de LDL permettra de déterminer les capacités anti-oxydatives des HDL.

L'identification de l'ensemble des lipides modulés par ABCG1 et impliqués dans la fonction des HDL mènera à d'autres expériences qui viseront à déterminer par quel(s) mécanisme(s) le contenu des HDL peut impacter leurs fonctions. Plusieurs types de rHDL pourront être produits et testés *in vitro*. Les HDL agissent sur les cellules via différents récepteurs (S1P notamment) et transporteurs (ABCG1, SR-BI) (voir « Etude bibliogrpahique », partie B.3.) : il serait dont intéressant de déterminer quelles sont les voies de signalisation impliquées selon le PL utilisé pour produire les rHDL, particulièrement $rHDL_{PE\ (36:5)}$. Ces expériences pourront être menées sur des lignées de cellules endothéliales, de macrophages ou encore sur d'hépatocytes, principaux acteurs du remodelage du phospholipidome par ABCG1 comme je l'ai mis en évidence.

En parallèle des tests de fonctionnalités des $rHDL_{PE\ (36:5)}$, il conviendra d'évaluer l'impact du PE (36:5) des HDL sur l'ASCVD dans une cohorte plus importante. Les données obtenues dans l'étude chez 12 patientes permettent de mettre en évidence une forte association entre l'épaisseur de l'espace *intima-media* carotidien et la quantité de PE (36:5) et de PI (38:6) des HDL plasmatiques. Dans un premier temps, nous allons poursuivre les explorations dans

cette cohorte afin de confirmer les corrélations observées. Au total, la cohorte inclue 118 femmes dont le développement de l'athérosclérose a été évalué par score calcique et épaisseur de l'espace *intima-media*. Des analyses lipidomiques vont être effectuées sur HDL_2 isolées du plasma prélevé sur les individus à jeun. D'autre part le génotype du polymorphisme rs1378577 de ces patientes sera déterminé afin de confirmer le rôle d'ABCG1 dans l'association entre le contenu des HDL en PE (36:5) et PI (38:6) et l'athérosclérose.

Par ailleurs, nous avons accès à une cohorte de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, avec un phénotypage cardiaque complet : l'épaisseur de l'espace *intima-media*, le score calcique, mais aussi un scanner des artères coronaires (coroscanner). Ce dernier présente plusieurs avantages : il est très reproductible, à la différence de la mesure de l'IMT, qui dépend de la pression artérielle et de l'âge du patient notamment, et il permet d'évaluer la qualité des artères des patients. Il renseigne simultanément sur le volume de la plaque, le degré d'infiltration cellulaire, et le niveau de calcification des artères. Les patients recrutés (n=300) ont des concentrations circulantes de LDL-C contrôlées et normalisées car ils sont sous traitement avec les statines.

Ces explorations à plus grande échelle nous permettront de vérifier et compléter les corrélations entre la plaque d'athérosclérose (son étendue et sa nature) et les concentrations de PE (36:5) des HDL_2 isolées des patients. Au-delà du PE (36 :5), d'autres lipides pourront être identifiés comme liés à l'apparition d'ASCVD. Le génotypage des patients permettra également de mesurer l'impact du polymorphisme rs1378577 du gène ABCG1 dans ces corrélations.

Au sein de la cohorte avec coroscanner, des hommes pourront également être étudié. Dans notre première étude, le rôle du polymorphisme d'*ABCG1* rs1378577 dans la modulation du phospholipidome des HDL a été mis en évidence chez les femmes. Il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure le polymorphisme peut également être impliqué chez les hommes.

Le PE (36:5) est un phospholipide peu représenté dans les HDL. Toutefois aucune donnée de la littérature ne documente la présence de ce lipide dans les lésions athérosclérotiques. Il serait donc intéressant de quantifier le PE36 :5 dans des lésions d'athérosclérose humaines. Cela pourrait permettre de déteminer la quantité de PE36 :5 dans la plaque d'athérome est positivement corrélée à la progression de la plaque, son niveau inflammatoire, ou encore sa composition. Cependant, parmi les autres lipides identifiés comme modulés dans notre étude, les familles des espèces contenant des AG monoinsaturés ou

polyinsaturés de 16 à 20 carbones sont retrouvées modulées par ABCG1, notamment les espèces de type 36:2 (PA (36:2), PI (36:2), PG (36:2) et PC (36:2)). Dans les plaques d'athérome, le PC (36:2) est l'un des PC les plus abondants. De plus, sa concentration plasmatique reflète son abondance dans les plaques (Stegemann et al., 2011). Notre étude n'a pas mis en évidence de lien entre la concentration de PC (36:2) dans les HDL_2 et le génotype du rs1378577, mais nous avons pu montrer que l'abondance de PA (36:2) est diminuée dans les HDL_2 chez les patients homozygotes TT, avec la plus forte expression d'*ABCG1*. PA (36:2) étant le précurseur de PC (36:2) notamment, il serait intéressant de déterminer si des différences pourraient être observées au sein des nouvelles cohortes étudiées. Certains travaux ont en effet montré que PA (36:2) était enrichi dans les HDL_2 de patients ayant fait un infarctus du myocarde, par rapport aux patients contrôles (Zakiev et al., 2018). Nous espérons que ces études nous permettrons d'identifier toutes les espèces dont la répartition est modulée dans les HDL_2 de patients atteints d'ASCVD.

Chez les patients à haut risque CV, les HDL présentent différentes dysfonctions (Rosenson et al., 2016). De plus, les HDL_2 dysfonctionnelles de patients déficients pour l'apo A-I sont enrichies en PA (36:2), mais aussi en d'autres PL (Zakiev et al., 2019), lesquels sont trouvés diminués dans notre étude suite à l'expression d'*ABCG1*. Ainsi, le remodelage altéré par la déficience en apo A-I entraîne une dysfonction des grandes HDL_2. L'ensemble de ces observations renforce l'idée que les variations de l'expression d'ABCG1, en modulant le phospholipidome des lipoprotéines HDL, affecte également les fonctions de celles-ci.

L'ensemble des données obtenues dans cette étude font d'ABCG1 un transporteur potentiellement bénéfique dans les ASCVD. Quoique le rôle d'ABCG1 dans le développement de l'athérosclérose et les MCV apparait complexe (voir « Etude bibliogrpahique », partie A.2.b.i.) une étude précédente menée par notre groupe prêtait à ABCG1 un rôle délétère favorisant la formation de cellules spumeuses en contrôlant l'activité de la LPL (Olivier et al., 2012). La LPL est majoritairement produite par le tissu adipeux et les muscles, mais elle peut être produite dans les macrophages, où ABCG1 potentialise son action en présence de lipoprotéines riches en triglycérides. Ceci suggère un rôle ambivalent du transporteur ABCG1, dépendant de l'environnement plasmatique, et notamment de la présence de lipoprotéines TRL ou HDL. Ceci fait parfaitement écho au rôle d'ABCG1 décrit par notre groupe dans les maladies cardiométaboliques : en présence d'un environnement riche en cholestérol, ABCG1 va privilégier l'efflux de cholestérol vers les lipoprotéines de type HDL. En revanche, dans un contexte riche en TRL, ABCG1 favoriserait l'accumulation de lipides en stimulant l'expression

de la LPL (Frisdal and Le Goff, 2015). D'autre part, les études GWAS ont mis en évidence que la méthylation des sites CpG du gène *ABCG1* (associée négativement à son expression) était positivement associée aux maladies cardiométaboliques (Hardy et al., 2017), suggérant un rôle protecteur d'ABCG1, ce qui est cohérent avec les résultats présentés ici. L'ensemble de ces données montrent l'importance du contexte environnemental dans la détermination de l'expression d'ABCG1, ainsi que de ses fonctions.

Les résultats obtenus dans la seconde étude me permettent de proposer un mécanisme dans ce contexte : ZNF471 pourrait agir comme acteur du métabolisme des lipoprotéines, notamment des HDL. En effet, notre étude suggère que l'expression de ce facteur de transcription est impliquée dans la modulation de la méthylation de l'ADN et de l'expression de gènes clés du métabolisme des lipides, tels que les gènes codant la *CETP*, la *PLTP*, la *LPL* et le transporteur *ABCG1*. En conséquence, les concentrations de HDL-C sont modulées. Nous avons vu dans l'étude bibliographique (voir « Etude bibliogrpahique », partie A.2.b.) que ces protéines étaient toutes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines HDL : de façon cohérente, l'inhibition de la CETP augmente les concentrations plasmatiques de HDL-C (Tall and Rader, 2018) et diminue, comme l'inhibition de la PLTP (Luo et al., 2010), celles de LDL-C.

Les expériences menées chez la souris hApoB/CETP m'ont permis d'identifier certains gènes dont l'expression est modulée par la protéine ZNF471 humaine. Pour le gène *CETP*, nous avons pu tester l'hypothèse émise suite aux résultats épidémiologiques : ZNF471 agit en tant que modulateur de la méthylation de l'ADN. En effet, les résultats ont indiqué que l'expression de *ZNF471* dans le foie des souris augmentait la méthylation de sites CpG du promoteur du gène *CETP* et réduisait son expression.

Nous avons donc mené ensuite au sein de la cohorte Cardiogenics, une étude *a priori* pour vérifier chez l'Homme que la méthylation des sites CpG du gène *CETP* était modulée similairement. D'autre part, cette analyse visait à déterminer si les gènes codant les autres protéines modulées chez la souris voyaient la méthylation de leur séquence impactée par ZNF471. Les résultats ont confirmé le rôle de ZNF471 comme un facteur de transcription impactant la méthylation de l'ADN.

Afin de déterminer l'ensemble des gènes cibles de ZNF471, nous avons initié une analyse globale de la méthylation par RRBS (*Reduced Representation Bisulfite Sequencing*) sur les hépatocytes isolés des souris injectées avec le plasmide contrôle ou codant ZNF471 lors de

la seconde étude présentée dans ce document. En parallèle, est menée sur les mêmes échantillons une analyse transcriptomique (*RNA sequencing*). Les résultats fourniront des informations importantes sur l'ensemble des gènes cibles de ZNF471, et des associations pourront être établies entre l'expression de *ZNF471*, celle de ses gènes cibles, et le niveau de méthylation de ceux-ci. Ainsi, nous espérons pouvoir mieux comprendre le rôle de ZNF471 dans la régulation épigénétique du métabolisme des lipides.

Cependant, il convient de rester prudent quant au rôle global de ZNF471 au sein de la cellule, particulièrement de l'hépatocyte. En tant que facteur de transcription, il peut avoir de nombreux gènes cibles impactant diverses fonctions cellulaires. *ZNF471* a en effet été étudié chez des patients atteints de cancers de la langue (Bhat et al., 2017) et de l'estomac (Cao et al., 2018). Chez les patients atteints, le gène qui code *ZNF471* est hyperméthylé et son expression est réduite, en comparaison à une zone non atteinte adjacente de la tumeur. Cette hyperméthylation est associée à une diminution de la survie des patients (Cao et al., 2018). Ces données suggèrent un rôle protecteur de ZNF471 dans le cancer. *In vitro*, dans des lignées cellulaires de cancer de l'estomac, les auteurs confirment ces données en montrant que l'expression nucléaire de *ZNF471* diminue la prolifération et la migration cellulaire, et induit l'apoptose (Cao et al., 2018). Dans le contexte du cancer de l'estomac, ZNF471 inhibe l'expression de deux gènes associés à l'expansion tumorale : *TFAP2α* (*Transcription Factor AP-2 α*), un facteur de transcription, et *PLS3* (Plastin 3), une protéine structurale impliquée dans les réseaux d'actine. Cette étude suggère que les effets de ZNF471 sont complexes, et peuvent impliquer d'autres voies cellulaires que celles régulant le métabolisme des lipides. Les données transcriptomiques me permettront de m'assurer que l'expression de ZNF471 n'impacte pas les voies de prolifération et d'apoptose.

Dans la suite de notre étude, il sera nécessaire de décrypter le mode d'action de ZNF471. Ce facteur de transcription appartient à la grande famille des protéines à doigt de zinc (*Zinc Finger Proteins*, ZNF). Elles doivent leur nom à l'ion zinc qui permet une stabilisation tridimensionnelle : au sein de la protéine, les hélices α et les feuillets β peuvent être liés *via* des résidus cystéines (C) et histidines (H) sur l'ion zinc. La majorité des ZNF sont de type C_2H_2 (figure 17) (Cassandri et al., 2017).

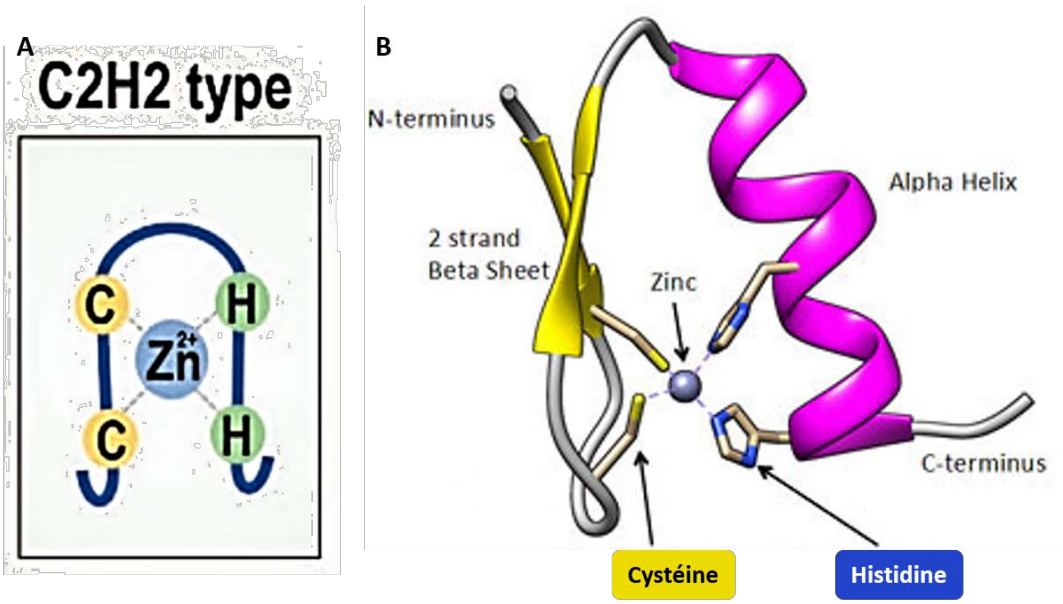


Figure 17 : Structure d'une structure protéique en doigt de zinc type C_2H_2.
*Représentation plane (**A**) et en 3 dimensions (**B**) du doigt de zinc de type C_2H_2. Deux cystéines d'un feuillet β et deux histidines d'une hélice α d'une protéine se lient à un atome de zinc, conférant ainsi une structure tridimensionnelle particulière à la protéine.*

Plus précisément, le motif des ZNF de type C_2H_2 est le suivant : C-X_{2-4}-C-X_{12}-H-X_3-H (avec X un acide aminé). Cette structure permet une fixation sur l'ADN, et le rôle principal de ces protéines est de réguler la transcription des gènes (Jantz et al., 2004; Cassandri et al., 2017). Cependant, il a récemment été suggéré d'autres fonctions aux protéines ZNFs, qui seraient aussi capable de se fixer sur l'ARN, les protéines, des lipides ou autres molécules (Eom et al., 2016). Les protéines ZNF contiennent en N-terminal un domaine KRAB (*Krüppel Associated Box*), l'un des domaines répresseurs les plus puissants chez les mammifères. Ce domaine KRAB permet le recrutement de la protéine KAP1 (*KRAB-Associated Protein 1*). Le complexe ZNF-KRAB-KAP1 peut alors moduler son activité en recrutant d'autres protéines (figure 18) (Urrutia, 2003; Feschotte and Gilbert, 2012) :

- HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), protéine capable de lire les marques de méthylation du site H3K9 et, le cas échéant, peut recruter la méthylase SETDB1 (*Histone-Lysine N-Methyltransferase*) et/ou la déméthylase KDM1A (*Lysine Demethylase 1A*).
- des protéines HDAC, responsables de la déacétylation d'histones.
- DNMT3A et DNMT3B, responsables de la méthylation de l'ADN.

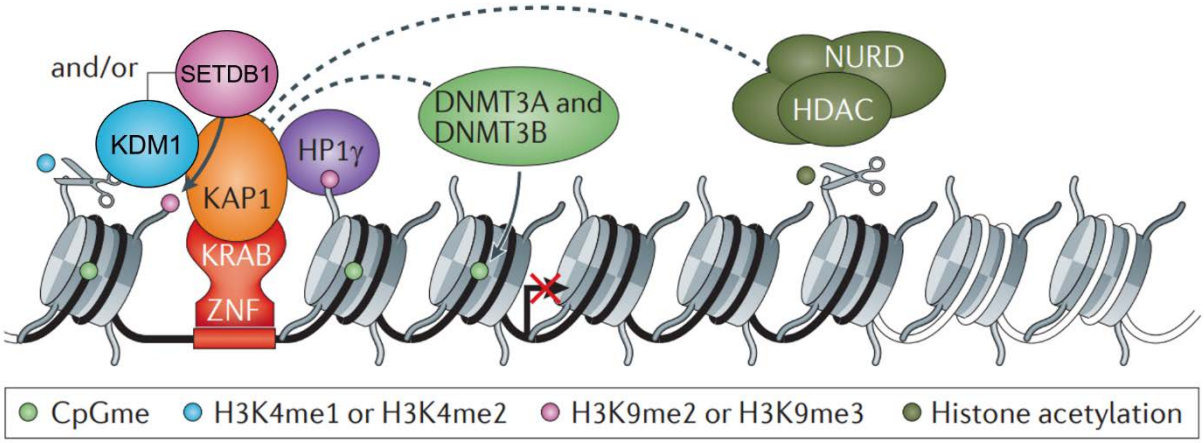


Figure 18 : Le domaine KRAB des protéines de type ZNF recrute les cofacteurs.
KAP1 (KRAB-associated protein 1) se fixe sur le domaine KRAB (Krüppel associated box) des protéines ZNF, et permet le recrutement d'autres protéines régulatrices, comme HP1 (heterochromatin protein 1), des protéines HDAC (histones déacétylases) ou DNMTs (DNA méthyltransférase). HP1 peut à son tour recruter la méthylase SETDB1 (Histone-lysine N-methyltransferase) et/ou la déméthylase KDM1A (lysine demethylase 1A).

Ces différents acteurs ont tous un rôle important pour le fonctionnement du complexe ZNF-KRAB-KAP1. Une étude menée *in vitro* dans les cellules HEK293 montre que l'inhibition de KRAB, ou KAP1, ou HP1, ou SETDB1 réduisait significativement la répression induite par le complexe ZNF-KRAB-KAP1 (Sripathy et al., 2006). Ainsi, KRAB et son microenvironnement sont nécessaire à la répression de la transcription.

Nos expérimentations ne nous permettent pas de déterminer si ZNF471 agit de la même manière que les autres ZNF, dont le mécanisme d'action est décrit ci-dessus. L'expression de la forme humaine de ZNF471 chez la souris ne m'a pas permis de mettre en évidence une modulation de l'expression des gènes murins codant *Kap1*, *Dnmt3* ou même *Kdm1a*. Cependant, il est probable que ZNF471 permette le recrutement physique, au site d'intérêt sur la séquence d'ADN, de ces protéines, sans en moduler l'expression. Il nous faudrait toutefois vérifier si ZNF471 humain est capable de recruter des cofacteurs murins. Pour cela, nous pourrions réaliser des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) de ZNF471, afin d'identifier les protéines formant un complexe avec le facteur de transcription.

De plus, nous pourrions tester *in vitro* dans des cultures primaires d'hépatocytes humains si les protéines suspectées partenaires de ZNF471 chez l'Homme le sont réellement : la stratégie des ARN interférents dirigés contre les ARNm des gènes *KAP1*, *HP1*, *DNMT3*, *KDM1*… permettra de déterminer si l'effet de ZNF471 sur ces gènes cibles est aboli lorsque l'expression, et le recrutement par conséquent d'un de ses partenaires potentiels est inhibée. En parallèle, des expériences de Ch-IP (*Chromatin Immunoprecipitation*) nous renseigneraient sur une éventuelle séquence consensus sur laquelle se fixe ZNF471, présente dans tous les gènes qu'il

module. Ces résultats seront à confronter à ceux obtenus par l'étude transcriptomique chez la souris.

Au-delà des récepteurs X du foie bien caractérisés, des facteurs de transcription de type ZNF sont impliqués dans le métabolisme lipidique. C'est par exemple le cas de ZNF202, un facteur de transcription de type C_2H_2 pour lequel une séquence consensus a d'ailleurs été retrouvée dans l'ensemble de ces gènes cibles. Il a été montré que ZNF202 pouvait réprimer l'expression de certaines apolipoprotéines (*apo A-IV*, *apo C-III* et *apo E*) (Wagner et al., 2000), mais aussi *ABCA1* et *ABCG1*, en interagissant avec KAP1 via le domaine KRAB de ZNF202 (Porsch-Ozcurumez et al., 2001). En conséquence, les capacités d'efflux de phospholipides et de cholestérol des macrophages murins Raw 264.7 vers l'apo A-I et les HDL_3 est fortement réduite en présence de ZNF202.

Nous avons cependant d'ores et déjà identifié certaines cibles de ZNF471, notamment la CETP, dont la méthylation et l'expression sont respectivement augmentée et réduite suite à l'expression de *ZNF471*. La CETP, protéine clé du métabolisme des lipides, est largement étudiée depuis de nombreuses années. Les inhibiteurs développés, hormis l'Anacetrapib, ont été inefficaces voire délétères pour réduire le risque CV (Tall and Rader, 2018). Récemment, de nouveaux outils pharmacogénomiques apparaissent et pourraient permettre une reconsidération de l'utilisation des inhibiteurs de la CETP. Ainsi, l'entreprise Dalcor Pharmaceuticals, a identifié le polymorphisme rs1967309 (G (0,59) > A (0,41)) dans le gène codant la protéine ADCY9, l'adénylate cyclase 9, comme déterminant dans la réponse à l'inhibiteur de la CETP développé par Roche, le Dalcetrapib. En comparaison aux patients inclus dans l'étude recevant le placebo, les patients homozygotes AA pour ce polymorphisme sous Dalcetrapib ont une diminution de la survenue d'évènements CV (-39%), alors que pour les patients GG, le nombre d'évènements CV est augmenté (+27%) (Tardif et al., 2015). Qu'en est-il de ZNF471 : pourrait-il être utilisé, à terme, comme cible thérapeutique régulant le métabolisme des lipides via la CETP, malgré l'échec des stratégies inhibitrices ? Comme je l'ai évoqué auparavant, les protéines ZNF sont connues pour leur rôle de répresseur tumoral (Jen and Wang, 2016). Donc moduler directement ZNF471 risquerait des conséquences trop importantes sur d'autres voies métaboliques, notamment cancéreuses, et pourrait induire de trop grandes perturbations pour les cellules. En revanche, ZNF471 pourrait être un outil utile de pharmacogénomique. Il serait intéressant de tester la réponse aux inhibiteurs de la CETP en fonction du polymorphisme rs11667052 de ZNF471. En effet, ce polymorphisme, en modulant la méthylation de l'ADN du promoteur du gène *CETP*, impacte l'expression et l'activité de la

CETP. Les variations d'expression de la CETP peuvent donc modifier la réponse à l'inhibiteur, celui-ci pouvant être faiblement efficace si les concentrations de CETP circulantes sont basses chez les patients avant traitement. Ainsi, notre étude pourrait fournir un nouveau biomarqueur génétique, le polymorphisme rs11667052, qui pourrait être utilisé en clinique comme outil de stratification de réponse aux inhibiteurs de la CETP chez des patients à haut risque cardiovasculaire qui présentent des concentrations basses de HDL-C.

Le polymorphisme rs11667052 du gène *ZNF471* affecterait la méthylation des séquences d'ADN codant ses gènes cibles, notamment *ABCG1*, et modulerait ainsi son expression et son activité. Nous pouvons supposer que ZNF471 ait un impact dans le remodelage des lipoprotéines, notamment du phospholipidome des HDL, *via* ABCG1.

Cependant, il est également possible que les deux mécanismes soient indépendants. En effet, il a été montré que l'expression d'ABCG1 ne modulait pas les concentrations plasmatiques de HDL-C (Furuyama et al., 2009; Xu et al., 2011; Liu et al., 2014). Nous proposons d'ailleurs que les variations d'expression d'ABCG1 potentialisent plutôt les fonctionnalités des HDL. Or, l'analyse globale de la méthylation de l'ADN dans la cohorte REGICOR (Registre Gironi Del Cor) n'a pas permis d'identifier ABCG1 comme un gène dont la méthylation affecte la fonction des lipoprotéines HDL, mesurée ici par la capacité d'efflux de cholestérol et les propriétés anti-inflammatoires (Sayols-Baixeras et al., 2017). Ainsi, il semble que l'effet de ZNF471 sur les concentrations de HDL-C plasmatiques soit indépendant de son effet sur l'expression hépatique d'ABCG1.

D'importantes explorations complémentaires restent nécessaires pour comprendre les mécanismes de régulation globale du métabolisme des lipides. Mon travail a cependant permis la mise en lumière de nouveaux acteurs fonctionnels du métabolisme des HDL, et leur(s) rôle(s) dans les maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose.

ARTICLE COLLABORATIF

A Genome Wide Association Study on plasma FV levels identified PLXDC2 as a new modifier of the coagulation process

Florian Thibord, Lise Hardy, Manal Ibrahim-Kosta, Noémie Saut, Anne-Sophie Pulcrano-Nicolas, Louisa Goumidi, Mete Civelek, Per Eriksson, Jean-François Deleuze, Wilfried Le Goff, David-Alexandre Trégouët and Pierre-Emmanuel Morange

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2019, 17 (11), 1808-1814

Received: 6 March 2019 Accepted: 1 July 2019
DOI: 10.1111/jth.14562

ORIGINAL ARTICLE

A Genome Wide Association Study on plasma FV levels identified *PLXDC2* as a new modifier of the coagulation process

Florian Thibord[1,2,3] | Lise Hardy[3,4] | Manal Ibrahim-Kosta[5,6] | Noémie Saut[5,6] | Anne-Sophie Pulcrano-Nicolas[1,3,4] | Louisa Goumidi[6] | Mete Civelek[7] | Per Eriksson[8,9] | Jean-François Deleuze[10,11] | Wilfried Le Goff[3,4] | David-Alexandre Trégouët[2,3] | Pierre-Emmanuel Morange[5,6,12]

[1]Pierre Louis Doctoral School of Public Health, Sorbonne-Université, Paris, France

[2]Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR_S) 1219, Bordeaux Population Health Research Center, University of Bordeaux, Bordeaux, France

[3]INSERM UMR_S 1166, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06), Sorbonne Université, Paris, France

[4]ICAN Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

[5]Laboratory of Haematology, La Timone Hospital, Marseille, France

[6]C2VN, Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, Marseille, France

[7]Department of Biomedical Engineering, Center for Public Health Genomics, University of Virginia, Charlottesville, Virginia

[8]Department of Medicine, Cardiovascular Medicine Unit, BioClinicum, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

[9]Karolinska University Hospital, Solna, Sweden

[10]Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Direction de la Recherche Fondamentale, CEA, Evry, France

[11]CEPH, Fondation Jean Dausset, Paris, France

[12]CRB Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, HemoVasc (CRB AP-HM HemoVasc), Marseille, France

Correspondence
Pierre-Emmanuel Morange, Department of Haematology, CHU Timone, 264 rue Saint-Pierre, 13385 Marseille Cedex 05, France.
Email: pierre.morange@ap-hm.fr

Funding information
EPIDEMIOM-VTE Senior Chair from the Initiative of Excellence of the University of Bordeaux; GENMED Laboratory of Excellence on Medical Genomics, Grant/Award Number: ANR-10-LABX-0013

Abstract

Background: Factor V (FV) is a circulating protein primarily synthesized in the liver, and mainly present in plasma. It is a major component of the coagulation process.

Objective: To detect novel genetic loci participating to the regulation of FV plasma levels.

Methods: We conducted the first Genome Wide Association Study on FV plasma levels in a sample of 510 individuals and replicated the main findings in an independent sample of 1156 individuals.

Results: In addition to genetic variations at the *F5* locus, we identified novel associations at the *PLXDC2* locus, with the lead *PLXDC2* rs927826 polymorphism explaining ~3.7% ($P = 7.5 \times 10^{-15}$ in the combined discovery and replication samples) of the variability of FV plasma levels. In silico transcriptomic analyses in various cell types confirmed that *PLXDC2* expression is positively correlated to *F5* expression. SiRNA

Manuscript handled by: John-Bjarne Hansen

Final decision: John-Bjarne Hansen, 1 July 2019

David-Alexandre Trégouët and Pierre-Emmanuel Morange contributed equally to this study.

 © 2019 International Society on Thrombosis and Haemostasis

PLXDC2 in modulating factor *F5* gene expression, and revealed further influences on *F2* and *F10* expressions.

Conclusion: Our study identified *PLXDC2* as a new molecular player of the coagulation process.

KEYWORDS

biomarkers, coagulation factor, computational biology, factor V, genetics

1 | INTRODUCTION

Coagulation factor V (FV) plays an important and dual role in the regulation of blood coagulation by exhibiting both pro- and anticoagu- lant functions (reviewed in[1]). In plasma, single-chain FV expresses anticoagulant activity as a cofactor of both TFPI and activated pro- tein C. In situations where the coagulation system is triggered, FV is converted to a highly effective procoagulant cofactor to activated factor X (FXa), which activates prothrombin to thrombin, which in turn catalyzes fibrin deposition and activates platelets. Although FV deficiency is known to associate with bleeding tendency, it has re- cently been proposed that FV plasma levels were associated with the risk of venous thrombosis (VT) in an ambiguous pattern. Indeed, in 2377 VT patients and 2943 controls of the MEGA study, individu- als with either high (>1.22 IU/mL) or low (<0.57 IU/mL) FV levels were at higher risk of disease.[2]

Until now, only one genetic factor, the HR2 haplotype located in the *F5* gene, has been robustly found associated with FV plasma levels[3] even though it has been hypothesized that FV Leiden genotype could also modulate FV plasma levels.[2,4]

We here report the results of the first genome wide association study (GWAS) aiming to identify new genetic determinants of FV plasma levels.

Essentials

- Little is known about the regulation of Factor V plasma levels.
- A Genome Wide Association Study (GWAS) was performed on Factor V plasma levels.
- Genetic variations at the PLXDC2 gene are associated with plasma levels of Factor V.
- This study identifies a novel player of the coagulation process.

2 | MATERIAL S AND METHODS

2.1 | Study description

This work builds on two independent samples of unrelated VT pa- tients of European ancestry recruited at the Thrombophilia center of La Timone Hospital (Marseille, France), the MARseille THrombosis Association (MARTHA) and MARTHA12 cohorts.[5] MARTHA pa- tients were used for the discovery GWAS, whereas MARTHA12 in- dividuals were considered for the replication step. All participants provided written informed consent, and the protocol was approved by the ethics committee of the participating institution.

The MARTHA project has already been extensively described.[6,7] It is composed of unrelated subjects of European origin, with the majority being of French ancestry, consecutively recruited at the Thrombophilia center of La Timone hospital (Marseille, France) between January 1994 and October 2012. All patients had a documented history of VT and are free of well-characterized genetic risk factors including AT (Antithrombin), PC (Protein C), or PS (Protein S) deficiency, homozygosity for FV Leiden or FII G20210A, and lupus anticoagulant. The MARTHA12 study is an independent sample of 1245 VT patients recruited between 2010 and 2012, according to the same criteria as the MARTHA patients.[5,8]

2.2 | Hemostatic traits measurements

FV activity plasma levels (FV:C) were measured using human FV de- ficient plasma on automated coagulometers (STA® analysers from Diagnostica Stago). Activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT) were measured in plasma with the use of automated coagulometers. Tests were conducted on the same day as blood collection or within a few weeks (after freezing). PT was re- corded as a ratio of the patient's PT to the mean normal PT, and aPTT was recorded in seconds (s). FV:C plasma levels were available in 510 participants of the discovery phase and 1156 participants of the rep- lication. FV antigen plasma levels (FV:Ag) were measured by ELISA on freezing samples using the ZYMUTEST Factor V kit (Hyphen Biomed) in a random sample of 60 patients from the MARTHA study (n = 20 per rs927826 genotypes). Factor II (FII) and Factor X (FX) activity levels in plasma were measured in MARTHA and MATHA12 cohorts by using human FII- or FX-deficient plasma on automated coagulometers in a total of 738 patients with no anti-vitamin K an- tagonists (VKA) at the time of blood sampling.

2.3 | Genotyping

DNA samples of the MARTHA participants were typed with high- density genotyping arrays and imputed for single nucleotide

TABLE 1 Description of the MARTHA and MARTHA12 cohorts

	Discovery MARTHA N = 510	Replication MARTHA12 N = 1156
Age	47.3 ± 16.0	50.4 ± 15.4
Gender (M/F)	176/334	527/629
Current smoker (%)	24.1	20.2
FV Leiden carriers (%)	15.5	11.0
BMI, kg/m^2	25.34 ± 4.96	26.26 ± 5.06
Vitamin K antagonist users (%)	3.7	28
FV:C plasma levels (IU/mL)	1.068 ± 0.235	1.089 ± 0.217
Activated partial thromboplastin time, s	31.68 ± 3.71	33.61 ± 6.95
Prothrombin time (%)	99.11 ± 14.72	83.64 ± 30.03

Note: Mean ± standard deviation.

polymorphisms (SNPs) available in the 1000G reference as previously described.[5] In MARTHA12, wet-lab genotyping was per- formed using Taqman assay. Genotyping was done using Taqman 5' nuclease assay (ThermoFischer Scientific, ref. C___2386120_10 (rs27218, *MAST4*), C___8879235_10 (rs1409338, *PLXDC2*)), following the supplier instructions, on an LC480® Real time PCR Instrument (Roche Life sciences), using dedicated Dual Color Hydrolysis Probe program. Reactions were made in a 10 μL final volume in a 1 × final concentration of Genotyping Master Mix (ThermoFischer Scientific ref. 4371355), with 25 ng of DNA, and 0,1 μL of 20× Genotyping Assay containing probes, nucleotides, and DNA Taq Polymerase.

2.4 | Genetic association analyses

For the GWAS discovery phase, association analyses of imputed SNPs with plasma FV levels were performed using linear regression analysis adjusted for age, sex, and the four first principal components derived from the GWAS data as implemented in the Mach2QTL program.[9] Only SNPs with acceptable imputation quality ($r^2 > .5$) and minor allele frequency >0.05 were considered. At the replication stage, associations of SNPs with plasma FV levels were assessed using standard linear regression analysis adjusted for age and sex. Haplotype association analyses were conducted using THESIAS software.[10] Results from the discovery and replication studies were meta-analyzed via a fixed-effects model based on the inverse-variance weighting method. A replicated SNP was further tested for association with additional hemostatic traits including PT, aPTT, FII, and FX circulating levels. For these analyses, patients with VKA at the time of blood sampling were excluded.

2.5 | RNA interference mediated PLXDC2 silencing experiments

Small interfering RNA (siRNA) *PLXDC2* gene silencing was conducted in human hepatocytes, a key cell type for *F5* regulation, to validate in vitro the association between *PLXDC2* and *F5* gene expressions. Additional expression of coagulation factors *F2*, *F7,* and *F10* were also measured to assess the specificity of the *PLXDC2* association with *F5* expression.

The human hepatocellular carcinoma cell line Hep3B (American Type Culture Collection) was grown at 37°C in 5% CO2 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 10% fetal calf serum, 2 mmol/L glutamine and 100 U/mL penicillin/streptomycin. Cells were seeded on 12-well plates at 100 000 cells per well and were transfected 72 hours later with 50 nmol/L control siRNA or an siRNA target- ing the *PLXDC2* gene, s39607 (sequence ctacagaagatgataccaa from Thermofisher) using lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours following transfection, total RNA was extracted (NucleoSpin RNA II kit; Macherey-Nagel) and reverse transcribed (high-capacity cDNA reverse transcription kit, Life Technologies) and gene expression was analyzed by real-time qPCR using a LightCycler LC480 (Roche). Primers used for quantification of *PLXDC2* and *F5*, *F2*, *F7,* and *F10* are provided as Supporting Information. Expression of mRNA lev- els was normalized to human non-POU domain containing, oct- amer-binding housekeeping gene (NONO), human alanin (ALA) and human heat shock protein 90 kDa alpha (cytosolic) class B member 1 (HSP90AB1). Data (Table S1) were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control cells.

The impact of *PLXDC2* knock-down on gene expression was tested via two-way analysis of variance.

3 | RESULTS

FV activity plasma levels (FV:C) were measured using human FV deficient plasma on automated coagulometers. The discovery GWAS was composed of 510 patients with venous thromboembolism (VTE) assessed for 6 264 382 SNPs and main significant findings were tested for replication in an independent sample of 1156 patients (see Materials & Methods). Main clinical and biological characteristics of the studied samples are shown in Table 1.

The Manhattan and Quantile-Quantile plots summarizing the GWAS results are shown in Figures S1-S4. About 70 SNPs achieved genome-wide significance ($P < 5 \times 10^{-8}$), with all SNPs mapping to the *F5* locus on chromosome 1q24.2. The lead SNP, rs72708008, with association P value = 8.43×10^{-12}, was in high linkage disequilibrium (LD) ($r^2 > .80$) with several SNPs including the rs6027 (p.Asp2222Gly, $P = 1.27 \times 10^{-11}$) known to tag the *F5* HR2 haplotype whose association with FV:C plasma levels has already been established.[11] After conditioning on rs6027, no additional signal reached genome-wide significance (Figure S3 and Table S2), the smallest P value being now $P = 3.05 \times 10^{-7}$ and observed at the *PLXDC2* locus. Because two other

TA B LE 2 Association with FV activity plasma levels of lead SNPs at two loci that reached suggestive evidence for association in the discovery GWAS

	MAST4 rs27218[a]				*PLXDC2* rs927826[a,b]			
	CC	CT	TT	MAF	TT	TG	GG	MAF
Discovery								
Mean FV plasma levels ± SD	1.03 ± 0.22 N = 271	1.09 ± 0.23 N = 199	1.23 ± 0.29 N = 40	0.274	1.11 ± 0.22 N = 249	1.04 ± 0.24 N = 224	0.95 ± 0.19 N = 37	0.293
Additive allele effect[c]		+0.075 ± 0.015 $P = 9.02 \times 10^{-7}$				−0.076 ± 0.016 $P = 1.10 \times 10^{-6}$		
Replication								
Mean FV plasma levels ± SD	1.102 ± 0.21 N = 605	1.07 ± 0.22 N = 434	1.101 ± 0.21 N = 89	0.271	1.13 ± 0.22 N = 537	1.05 ± 0.21 N = 461	1.02 ± 0.20 N = 87	0.293
Additive allele effect		−0.019 ± 0.010 $P = .054$				−0.062 ± 0.010 $P = 2.89 \times 10^{-10}$		

Abbreviations: MAF, minor allele frequency; SD, standard deviation.
[a]Imputation quality criterion was .984 and .996 for *MAST4* rs27218 and *PLXDC2* rs927826, respectively, in the discovery GWAS.
[b]In the replication study, rs927826 was substituted by rs1409338 that served as a proxy ($r^2 = .97$) because of some technical issues in wet-lab genotyping the rs927826.
[c]Association testing was adjusted for age, sex, and the four main genetics components in the discovery cohort and on age and sex in the replication study.

SNPs at the *F5* locus, rs6025 (p.Arg534Gln) and rs4524 (p.Lys858Arg), have been extensively studied in relation to VT risk,[5] we further analyzed their joint association with rs6027 with respect to FV:C plasma levels in both the discovery and replication cohorts using haplotype analysis. This analysis revealed that in addition to the strong decreasing effect of the rs6027-C allele ($\beta = -.151 \pm .02$, $P = 1.93 \times 10^{-12}$), the rs4524-C allele was associated with a slight decrease ($\beta = -.033 \pm .01$, $P = .003$) in FV:C plasma levels (Table S3). Altogether, these two *F5* SNPs explained ~7% of the variability of FV:C plasma levels.

Aside the aforementioned *F5* association signal, two other loci with several SNPs in LD exhibited suggestive statistical evidence for association with FV:C plasma levels in the dis- covery cohort, with *P*-values ranging between ~10^{-6} and 10^{-5} (Figure S1, Table S2). These loci were *MAST4* and *PLXDC2* where lead SNPs, rs27218 (intronic; $P = 9.02 \times 10^{-7}$) and rs927826 (in- tronic; $P = 1.10 \times 10^{-6}$), respectively, were looked for replication. Although the association of *MAST4* rs27218 did not replicate (Table 2), the association of *PLXDC2* rs927826 with plasma FV:C levels was confirmed ($P = 2.89 \times 10^{-10}$). In both the discovery and replication samples, the rs927826-G allele was associated with decreased FV:C plasma levels, $\beta = -.076 \pm .016$ ($P = 1.10 \times 10^{-6}$) and $\beta = -.062 \pm .010$ ($P = 2.89 \times 10^{-10}$), respectively. When both samples were combined, the overall statistical evidence for as- sociation of rs927826 with FV:C levels reached $P = 7.54 \times 10^{-15}$, with no evidence for heterogeneity across the two samples ($P = .458$), and with the rs927826 explaining ~3.5% of FV:C plasma variability. As a reminder, the *PLXDC2* locus was the top locus in the GWAS analysis conditioned on *F5* rs6027 (Table S2) and the rs927826 ranked 4th ($P = 3.13 \times 10^{-7}$) in this conditional GWAS.

To assess whether *PLXDC2* could be a true determinant of FV lev- els and not a determinant of the clotting assay used to measure FV:C levels, we measured FV antigen (FV:Ag) levels by ELISA in a random sample of 60 patients from the MARTHA study. The ELISA data confirmed the specificity of the association of PLXDC2 genotypes with FV plasma levels as the rs927826-G allele was associated with signif- icant ($P = .028$) decrease of FV:Ag levels (Table 3). Note, in this subsa- mple, the correlation between the two FV measurements was 0.76.

We further examined the correlation between *PLXDC2* and *F5* gene expression in several genome-wide gene expression data from multiple cell lines and tissues.[12–17] In all investigated resources except macrophages, we observed positive correlations between *PLXDC2* and *F5* expressions, the strongest correlation ($r = .45$, $P = 3.94 \times 10^{-14}$) being observed in liver (Figure S5) where FV synthe- sis mainly occurs (Table 4). We also assessed the correlation of liver *PLXDC2* expression with that of other coagulation genes expressed in the liver *(F2*, *F7* and *F10)*. We observed a significant positive, but less strong, correlation with *F2* expression ($r = .17$, $P = .007$) and a very low correlation, if any, with *F7* and *F10* expressions (Table 4).

To strengthen the perspective of a specific effect of the rs927826 variant on FV levels, we tested its association with FII and FX plasma levels in 738 participants. Even though FII and FX were moderately correlated with FV plasma levels ($r = .35$, $P = 4.8 \times 10^{-17}$ and $r = .32$, $P = 4.40 \times 10^{-14}$ for FII and FX, respectively), we did not find any association between rs927826 and both FII ($\beta = -.002 \pm .01$, $P = .83$) and FX ($\beta = .003 \pm .01$, $P = .81$) plasma levels (Table S4).

To follow up on these genetic epidemiological findings, we conducted preliminary in vitro study to assess whether *PLXDC2* gene expression could associate with *F5* gene expression in human liver cells (see Materials and Methods). As shown in Figure 1, knock-down expression of *PLXDC2* using siRNA was associated with a significant decrease liver expression of *F5* ($P = .020$). Concurrently, expressions of other coagula- tion genes (*F2*, *F7*, and *F10*) were also measured, and we also observed a significant decrease of *F2* ($P = .004$) and *F10* ($P = .0003$) expressions when *PLXDC2* is silenced. *F7* expression remained unchanged ($P = .1$).

TABLE 3 Association of rs927826 genotypes with plasma FV antigen (FV:Ag) and activity (FV:C) in a sample of 60 patients from the MARTHA cohort

rs927826	FV:Ag (IU/mL)	FV:C (IU/mL)
TT (n = 20)	0.647 ± 0.163	1.182 ± 0.271
TG (n = 20)	0.621 ± 0.133	1.204 ± 0.265
GG (n = 20)	0.545 ± 0.140	1.006 ± 0.200
P value[a]	*P* = 0.0286	*P* = 0.0263

Note: Mean ± standard deviation.
[a]Associations were tested using a linear regression model adjusted for age and sex, under the assumption of an additive model.

4 | DISCUSSION

Altogether, these results strongly support the role of *PLXDC2* in the regulation of *F5* gene, and more generally in the coagulation cas- cade. Interestingly, the *PLXDC2* rs927826 has recently been found associated with activated partial thromboplastin time in a Japanese population, but with no formal replication of the statistical findings or experimental validation.[18] We did not observe such association in our population but did observe an association of rs927826 with prothrombin time (Table S4). This polymorphism is in very strong LD (r^2 > .80) with other *PLXDC2* SNPs (Table S5), all located in intronic regions subject to epigenetic regulation,[19] but only the rs927826 is so far predicted to affect transcription factors' binding.[20]

Little is known about the PLXDC2 gene/protein. It is recognized as a cell surface transmembrane receptor expressed in various tis- sues (see, e.g., GTEx Portal[21]) without so far clear arguments that it could be directly involved in mRNA regulation. We showed that *PLXDC2* expression correlated with *F5* expression in different cell lines and that *F5* mRNA expression was significantly reduced in the liver in the *PLXDC2* knock-down experiment. Interestingly, the siRNA experiment revealed that the *PLXDC2* gene expression could also modulate the liver expression of *F2* and *F10* genes that might indicate a more generalized effect on coagulation. However, we did not find any association between the rs927826 variant and either FII or FX plasma levels.

Of interest, in a recent plasma proteomic profiling study,[22] the *F5* rs6027 and *PLXDC2* rs927826 variants we found here associated

TABLE 4 Correlations between *PLXDC2* and *F2*/*F5*/*F7*/*F10* gene expressions in six different tissues

	Macrophages[a] N = 684	Whole blood[b] N = 78	Monocytes[c] N = 849	Endothelial cells[d] N = 157	Adipose tissue[e] N = 200	Liver[f] N = 253
F2	NA	−0.27 *P* = 0.02	NA	0.16 *P* = 0.05	NA	0.17 *P* = 0.007
F5	0.03 *P* = .45	0.39 *P* = 0.001	0.17 $P = 5.83 \times 10^{-6}$	0.33 $P = 4.87 \times 10^{-5}$	0.31 $P = 6.32 \times 10^{-6}$	0.45 $P = 3.94 \times 10^{-14}$
F7	−0.02 *P* = 0.56	−0.33 *P* = 0.003	−0.05 *P* = 0.18	−0.08 *P* = 0.31	−0.06 *P* = 0.37	0.03 *P* = 0.61
F10	NA	NA	NA	−0.06 *P* = 0.49	−0.08 *P* = 0.26	0.08 *P* = 0.21

NA: Expressions were not available
Corresponding publication for each study: a[12]; b[13]; c[14]; d[15]; e[16]; f[17]

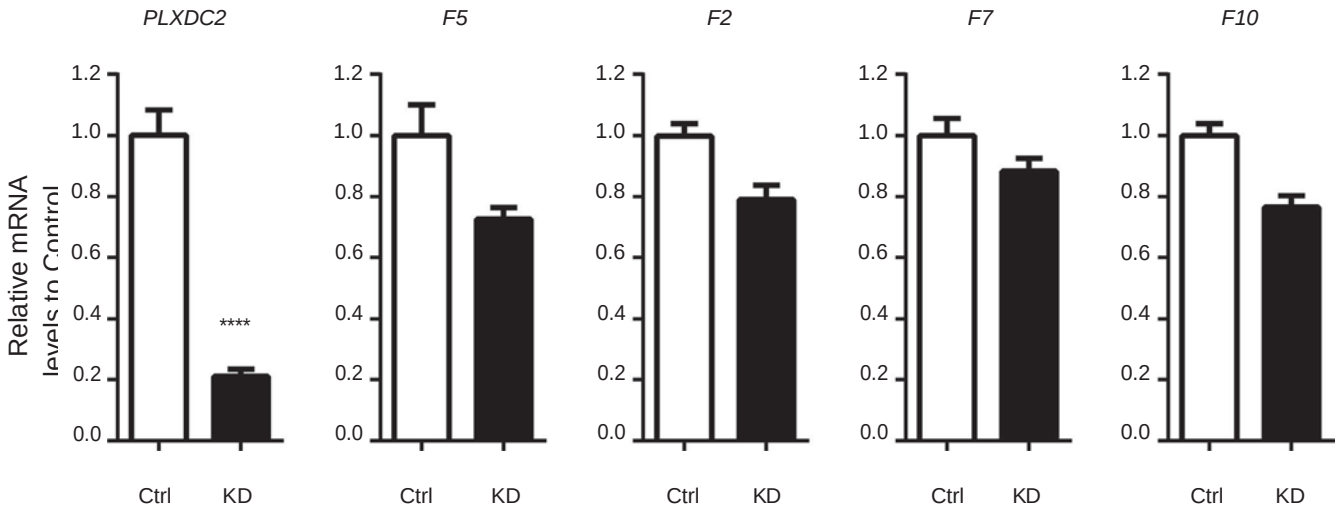


FIGURE 1 Impact of *PLXDC2* gene silencing on *F5* gene expression in liver. Abbreviation: KD = siRNA KnockDown. Quantification of *PLXDC2* and *F5*, *F2*, *F7,* and *F10* mRNA levels in Hep3B cells after 24 hours of treatment with 50 nM siRNA directed to *PLXDC2* gene (n = 9 for both controls and siRNA KD). A 79% decrease ($P < 10^{-8}$) in *PLXDC2* gene expression was followed by a significant decrease in *F5* (−27%, *P* = .02), *F2* (−21%, *P* = .004), and *F10* (−23%, *P* = .0003) gene expression, whereas *F7* expression was not significantly decreased (−12%, *P* = .11)

with plasma FV levels were both found influencing the plasma levels of the same four proteins (CD3E, CDH7, SLC22A16, and TOR1AIP1), such observations adding support for *PLXDC2* and *F5* belonging to a same regulatory pathway.

The strength of our study lies in its novelty. Indeed, there is limited information currently available regarding the regulation of plasma levels of FV. We performed the first GWAS on FV plasma levels and replicated the findings in an independent sample of sub- jects that limited the risk of spurious findings. Moreover, we in- creased the specificity of the finding by replicating the observed association between *PLXDC2* rs927826 genotypes and FV activ- ity plasma levels by using an ELISA measuring FV antigen levels in plasma. Several limitations must be acknowledged. First, this study was performed in VT patients, and validation of the ob- served genetic association deserves to be investigated in healthy individuals to assess whether the observed effect size also holds in non-diseased individuals. Second, the size of our discovery cohort was relatively modest compared with what is currently done in a GWAS context, which has likely hampered our chance to detect additional loci participating to FV regulation. Additional efforts would be needed to measure FV plasma levels in independent co- horts with both available plasma and GWAS data to better charac- terize the genetic regulation underlying FV plasma variability. With large samples, it would also be interesting to assess the contribu- tion of rare variants which was not possible in the current GWAS study mainly focusing on common polymorphisms. Finally, PLXDC2 is recognized as a cell-surface transmembrane receptor and it is then unclear how it could be involved in the regulation of *F5* gene expression. Moreover, the correlation between *PLXDC2* and *F2* ex- pression in the liver and the significant decrease of *F2* and *F10* gene expressions in the *PLXDC2* knock-down experiment might indicate a more generalized effect on coagulation. Further experimental studies are mandatory to decipher the underlying mechanism.

In conclusion, all these observations point out the existence of a new player in the coagulation cascade whose exact molecular contribution needs to be extensively investigated. Its impact on FV-mediated coagulation related disorders also warrants further investigations as whole blood *PLXDC2* expression levels have been reported to be associated with stroke.[23]

5 ACKNOWLEDGEMENTS

F.T. was financially supported by the GENMED Laboratory of Excellence on Medical Genomics (ANR-10-LABX-0013). MARTHA genetic investigations were also supported by the GENMED laboratory of Excellence. D-A.T. was financially supported by the «EPIDEMIOM-VTE» Senior Chair from the Initiative of Excellence of the University of Bordeaux.

6 CONFLIC T OF INTEREST

A patent deposit process has been initiated by J-F.D., D-A.T., and P-E.M. The other authors state that they have no conflict of interest.

7 AUTHOR CONTRIBUTIONS

All statistical analyses were performed by F. Thibord under the supervision of D-A. Trégouët who designed the study together with P.-E. Morange. Wet-lab genotyping was performed by N. Saut, FV:C measurements by M. Ibrahim-Kosta, FV:Ag measurements by L. Goumidi, and experimental works by L. Hardy under the joint supervision of D-A. Trégouët and W. Le Goff. A-S. Pulcrano-Nicolas performed additional bioinformatics analyses. M. Civelek and P. Eriksson provided supplemental datasets for replication. Genetic data acquisition was coordinated by D-A. Trégouët, J-F. Deleuze, and P-E. Morange. Manuscript was drafted by F. Thibord and D-A. Trégouët and further reviewed by all coauthors.

8 ORCID

Florian Thibord https://orcid.org/0000-0003-2229-8322

9 REFERENCE S

1. Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitorα, and protein S. J Thromb Haemost. 2017;15:1241–50.
2. Rietveld IM, Bos MHA, Lijfering WM, Li-Gao R, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. Factor V levels and risk of venous thrombosis: the MEGA case-control study. Res Pract Thromb Haemost. 2018;2:320–6.
3. Vos HL. Inherited defects of coagulation Factor V: the thrombotic side. J Thromb Haemost. 2006;4:35–40.
4. Kamphuisen PW, Rosendaal FR, Eikenboom JC, Bos R, Bertina RM. Factor V antigen levels and venous thrombosis: risk profile, interaction with factor V leiden, and relation with factor VIII antigen levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:1382–6.
5. Germain M, Chasman DI, de Haan H, Tang W, Lindström S, Weng L-C, et al. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. Am J Hum Genet. 2015;96:532–42.
6. Antoni G, Oudot-Mellakh T, Dimitromanolakis A, Germain M, Cohen W, Wells P, et al. Combined analysis of three genome-wide association studies on vWF and FVIII plasma levels. BMC Med Genet. 2011;12:102.
7. Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Kallel C, Zelenika D, et al. Genome wide association study for plasma levels of natural anticoagulant inhibitors and protein C anticoagulant pathway: the MARTHA project. Br J Haematol. 2012;157:230–9.
8. Suchon P, Germain M, Delluc A, Smadja D, Jouven X, Gyorgy B, et al. Protein S Heerlen mutation heterozygosity is associated with venous thrombosis risk. Sci Rep. 2017;7:45507.
9. Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR. MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. Genet Epidemiol. 2010;34:816–34.
10. Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. Bioinformatics. 2007;23:1038–9.
11. Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D, Dilasio MG, Castoldi E, Pinotti M, et al. Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. Thromb Haemost. 1996;75:45–8.
12. Codoni V, Blum Y, Civelek M, Proust C, Franzén O, Björkegren JLM, et al. Preservation analysis of macrophage gene coexpression

between human and mouse identifies PARK2 as a genetically con- trolled master regulator of oxidative phosphorylation in humans. G3 (Bethesda). 2016;6:3361–71.

13. Pulcrano-Nicolas A-S, Proust C, Clarençon F, Jacquens A, Perret C, Roux M, et al. Whole-blood miRNA sequencing profiling for va- sospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke. 2018;49:2220–3.
14. Rotival M, Zeller T, Wild PS, Maouche S, Szymczak S, Schillert A, et al. Integrating genome-wide genetic variations and monocyte expression data reveals trans-regulated gene modules in humans. PLoS Genet. 2011;7.
15. Erbilgin A, Civelek M, Romanoski CE, Pan C, Hagopian R, Berliner JA, et al. Identification of CAD candidate genes in GWAS loci and their expression in vascular cells. J Lipid Res. 2013;54:1894–905.
16. Stancáková A, Civelek M, Saleem NK, Soininen P, Kangas AJ, Cederberg H, et al. Hyperglycemia and a common variant of GCKR are associated with the levels of eight amino acids in 9,369 Finnish men. Diabetes. 2012;61:1895–902.
17. Folkersen L, van't HF, Chernogubova E, Agardh HE, Hansson GK, Hedin U, et al. Association of genetic risk variants with expression of proximal genes identifies novel susceptibility genes for cardio- vascular disease. Circ Cardiovasc Genet 2010;3:365–73.
18. Kanai M, Akiyama M, Takahashi A, Matoba N, Momozawa Y, Ikeda M, et al. Genetic analysis of quantitative traits in the Japanese population links cell types to complex human diseases. Nat Genet. 2018;50:390–400.
19. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. Nucleic Acids Res. 2012;40:D930–4.
20. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. Genome Res. 2012;22:1790–7.
21. GTEx Consortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in hu- mans. Science. 2015;348:648–60.
22. Sun BB, Maranville JC, Peters JE, Stacey D, Staley JR, Blackshaw J, et al. Genomic atlas of the human plasma proteome. Nature. 2018;558:73.
23. O'Connell GC, Petrone AB, Treadway MB, Tennant CS, Lucke-Wold N, Chantler PD, et al. Machine-learning approach identifies a pat- tern of gene expression in peripheral blood that can accurately de- tect ischaemic stroke. NPJ Genom Med. 2016;1:16038.

10 SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Thibord F, Hardy L, Ibrahim-Kosta M, et al. A Genome Wide Association Study on plasma FV levels identified *PLXDC2* as a new modifier of the coagulation process. *J Thromb Haemost*. 2019;17:1808–1814. https://doi.org/10.1111/jth.14562

BIBLIOGRAPHIE

Abellán, R., Mansego, M. L., Martínez-Hervás, S., Martín-Escudero, J. C., Carmena, R., Real, J. T., et al. (2010). Association of selected ABC gene family single nucleotide polymorphisms with postprandial lipoproteins: results from the population-based Hortega study. *Atherosclerosis* 211, 203–209. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.030.

Abellán, R., Mansego, M. L., Martínez-Hervás, S., Morcillo, S., Pineda-Alonso, M., Carmena, R., et al. (2011). Dietary polyunsaturated fatty acids may increase plasma LDL-cholesterol and plasma cholesterol concentrations in carriers of an ABCG1 gene single nucleotide polymorphism: study in two Spanish populations. *Atherosclerosis* 219, 900–906. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.018.

ACCORD Study Group, Ginsberg, H. N., Elam, M. B., Lovato, L. C., Crouse, J. R., Leiter, L. A., et al. (2010). Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 362, 1563–1574. doi:10.1056/NEJMoa1001282.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518–520. doi:10.1126/science.271.5248.518.

Adkins, R. M., Krushkal, J., Tylavsky, F. A., and Thomas, F. (2011). Racial differences in gene-specific DNA methylation levels are present at birth. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 91, 728–736. doi:10.1002/bdra.20770.

Agellon, L. B., Walsh, A., Hayek, T., Moulin, P., Jiang, X. C., Shelanski, S. A., et al. (1991). Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 266, 10796–10801.

Ageno, W., Becattini, C., Brighton, T., Selby, R., and Kamphuisen, P. W. (2008). Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation* 117, 93–102. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.709204.

AIM-HIGH Investigators, Boden, W. E., Probstfield, J. L., Anderson, T., Chaitman, B. R., Desvignes-Nickens, P., et al. (2011). Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 2255–2267. doi:10.1056/NEJMoa1107579.

Aleidi, S. M., Howe, V., Sharpe, L. J., Yang, A., Rao, G., Brown, A. J., et al. (2015). The E3 ubiquitin ligases, HUWE1 and NEDD4-1, are involved in the post-translational regulation of the ABCG1 and ABCG4 lipid transporters. *J. Biol. Chem.* 290, 24604–24613. doi:10.1074/jbc.M115.675579.

Altmann, S., Murani, E., Schwerin, M., Metges, C. C., Wimmers, K., and Ponsuksili, S. (2013). Dietary protein restriction and excess of pregnant German Landrace sows induce changes in hepatic gene expression and promoter methylation of key metabolic genes in the offspring. *J. Nutr. Biochem.* 24, 484–495. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.01.011.

Arai, T., Wang, N., Bezouevski, M., Welch, C., and Tall, A. R. (1999). Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J. Biol. Chem.* 274, 2366–2371. doi:10.1074/jbc.274.4.2366.

Arkensteijn, B. W. C., Berbée, J. F. P., Rensen, P. C. N., Nielsen, L. B., and Christoffersen, C. (2013). The apolipoprotein m-sphingosine-1-phosphate axis: biological relevance in lipoprotein metabolism, lipid disorders and atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 14, 4419–4431. doi:10.3390/ijms14034419.

Asselbergs, F. W., Williams, S. M., Hebert, P. R., Coffey, C. S., Hillege, H. L., Navis, G., et al. (2007). Gender-specific correlations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator levels with cardiovascular disease-related traits. *J. Thromb. Haemost.* 5, 313–320. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02311.x.

Asztalos, B. F., and HDL Atherosclerosis Treatment Study (2004). High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. *Curr. Opin. Cardiol.* 19, 385–391.

Atkinson, D., Smith, H. M., Dickson, J., and Austin, J. P. (1976). Interaction of apoprotein from porcine high-density lipoprotein with dimyristoyl lecithin. 1. The structure of the complexes. *Eur. J. Biochem.* 64, 541–547. doi:10.1111/j.1432-1033.1976.tb10334.x.

Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., et al. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366, 1267–1278. doi:10.1016/S0140-6736(05)67394-1.

Baker, P. W., Rye, K. A., Gamble, J. R., Vadas, M. A., and Barter, P. J. (1999). Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *J. Lipid Res.* 40, 345–353.

Baldán, A., Pei, L., Lee, R., Tarr, P., Tangirala, R. K., Weinstein, M. M., et al. (2006). Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr-/- and ApoE-/- mice transplanted with Abcg1-/- bone marrow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2301–2307. doi:10.1161/01.ATV.0000240051.22944.dc.

Barres, R., Kirchner, H., Rasmussen, M., Yan, J., Kantor, F. R., Krook, A., et al. (2013). Weight loss after gastric bypass surgery in human obesity remodels promoter methylation. *Cell Rep* 3, 1020–1027. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.018.

Barrès, R., Osler, M. E., Yan, J., Rune, A., Fritz, T., Caidahl, K., et al. (2009). Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab.* 10, 189–198. doi:10.1016/j.cmet.2009.07.011.

Barter, P., Gotto, A. M., LaRosa, J. C., Maroni, J., Szarek, M., Grundy, S. M., et al. (2007a). HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 357, 1301–1310. doi:10.1056/NEJMoa064278.

Barter, P. J. (1983). Evidence that lecithin:cholesterol acyltransferase acts on both high-density and low-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 751, 261–270. doi:10.1016/0005-2760(83)90283-7.

Barter, P. J., Brewer, H. B., Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J., and Tall, A. R. (2003). Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 160–167.

Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J. P., Komajda, M., et al. (2007b). Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* 357, 2109–2122. doi:10.1056/NEJMoa0706628.

Barter, P. J., Hopkins, G. J., and Calvert, G. D. (1982). Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem. J.* 208, 1–7. doi:10.1042/bj2080001.

Barter, P. J., and Lally, J. I. (1979). In vitro exchanges of esterified cholesterol between serum lipoprotein fractions: studies of humans and rabbits. *Metab. Clin. Exp.* 28, 230–236. doi:10.1016/0026-0495(79)90068-4.

Barter, P. J., and Rye, K.-A. (2012). Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J. Lipid Res.* 53, 1755–1766. doi:10.1194/jlr.R024075.

Basso, F., Amar, M. J., Wagner, E. M., Vaisman, B., Paigen, B., Santamarina-Fojo, S., et al. (2006). Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 398–404. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.044.

Bedi, O., Dhawan, V., Sharma, P. L., and Kumar, P. (2016). Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 389, 695–712. doi:10.1007/s00210-016-1252-4.

Beigneux, A. P., Davies, B. S. J., Gin, P., Weinstein, M. M., Farber, E., Qiao, X., et al. (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab.* 5, 279–291. doi:10.1016/j.cmet.2007.02.002.

Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Muñoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S., et al. (2008). A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 268–279. doi:10.1038/nsmb.1399.

Bergt, C., Pennathur, S., Fu, X., Byun, J., O'Brien, K., McDonald, T. O., et al. (2004). The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13032–13037. doi:10.1073/pnas.0405292101.

Bhat, S., Kabekkodu, S. P., Jayaprakash, C., Radhakrishnan, R., Ray, S., and Satyamoorthy, K. (2017). Gene promoter-associated CpG island hypermethylation in squamous cell carcinoma of the tongue. *Virchows Arch.* 470, 445–454. doi:10.1007/s00428-017-2094-2.

Bi, X., Zhu, X., Duong, M., Boudyguina, E. Y., Wilson, M. D., Gebre, A. K., et al. (2013). Liver ABCA1 deletion in LDLrKO mice does not impair macrophage reverse cholesterol transport or exacerbate atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2288–2296. doi:10.1161/ATVBAHA.112.301110.

Birjmohun, R. S., Hutten, B. A., Kastelein, J. J. P., and Stroes, E. S. G. (2005). Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 185–197. doi:10.1016/j.jacc.2004.10.031.

Birrane, G., Beigneux, A. P., Dwyer, B., Strack-Logue, B., Kristensen, K. K., Francone, O. L., et al. (2019). Structure of the lipoprotein lipase-GPIHBP1 complex that mediates plasma triglyceride hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 1723–1732. doi:10.1073/pnas.1817984116.

Bisgaier, C. L., Ackermann, R., Rea, T., Rodrigueza, W. V., and Hartman, D. (2016). ApoA-IMilano phospholipid complex (ETC-216) infusion in human volunteers. Insights into the phenotypic characteristics of ApoA-IMilano carriers. *Pharmacol. Res.* 111, 86–99. doi:10.1016/j.phrs.2016.05.001.

Blair, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Conrad, P. A., and Smart, E. J. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J. Biol. Chem.* 274, 32512–32519. doi:10.1074/jbc.274.45.32512.

Bodzioch, M., Orsó, E., Klucken, J., Langmann, T., Böttcher, A., Diederich, W., et al. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* 22, 347–351. doi:10.1038/11914.

Boekholdt, S. M., Hovingh, G. K., Mora, S., Arsenault, B. J., Amarenco, P., Pedersen, T. R., et al. (2014). Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of statin trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 485–494. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.615.

Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., and Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317, 1760–1764. doi:10.1126/science.1147939.

Braun, K. V. E., Dhana, K., de Vries, P. S., Voortman, T., van Meurs, J. B. J., Uitterlinden, A. G., et al. (2017). Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: the Rotterdam Study. *Clin Epigenetics* 9, 15. doi:10.1186/s13148-016-0304-4.

Brewer, H. B., Fairwell, T., LaRue, A., Ronan, R., Houser, A., and Bronzert, T. J. (1978). The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 623–630. doi:10.1016/0006-291x(78)91614-5.

Briel, M., Ferreira-Gonzalez, I., You, J. J., Karanicolas, P. J., Akl, E. A., Wu, P., et al. (2009). Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ* 338, b92. doi:10.1136/bmj.b92.

Brites, F., Martin, M., Guillas, I., and Kontush, A. (2017). Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin* 8, 66–77. doi:10.1016/j.bbacli.2017.07.002.

Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., et al. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22, 336–345. doi:10.1038/11905.

Brown, B. D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., et al. (2007). Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat. Biotechnol.* 25, 1457–1467. doi:10.1038/nbt1372.

Brown, M. L., Inazu, A., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Mann, C., Whitlock, M. E., et al. (1989). Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342, 448–451. doi:10.1038/342448a0.

Brown, R. J., Lagor, W. R., Sankaranaravanan, S., Yasuda, T., Quertermous, T., Rothblat, G. H., et al. (2010). Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Circ. Res.* 107, 357–364. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219188.

Bruckert, E., Labreuche, J., and Amarenco, P. (2010). Meta-analysis of the effect of nicotinic acid alone or in combination on cardiovascular events and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 210, 353–361. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.023.

Brunham, L. R., Kruit, J. K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J. M., Pape, T. D., et al. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* 116, 1052–1062. doi:10.1172/JCI27352.

Brunham, L. R., Singaraja, R. R., Duong, M., Timmins, J. M., Fievet, C., Bissada, N., et al. (2009). Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 548–554. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182303.

Burgess, B., Naus, K., Chan, J., Hirsch-Reinshagen, V., Tansley, G., Matzke, L., et al. (2008). Overexpression of human ABCG1 does not affect atherosclerosis in fat-fed ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1731–1737. doi:10.1161/ATVBAHA.108.168542.

Burgess, J. W., Boucher, J., Neville, T. A.-M., Rouillard, P., Stamler, C., Zachariah, S., et al. (2003). Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport and excretion. *J. Lipid Res.* 44, 1355–1363. doi:10.1194/jlr.M300062-JLR200.

Bursill, C. A., Castro, M. L., Beattie, D. T., Nakhla, S., van der Vorst, E., Heather, A. K., et al. (2010). High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1773–1778. doi:10.1161/ATVBAHA.110.211342.

Calabresi, L., Favari, E., Moleri, E., Adorni, M. P., Pedrelli, M., Costa, S., et al. (2009). Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis* 204, 141–146. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.038.

Calabresi, L., Gomaraschi, M., and Franceschini, G. (2003). Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1724–1731. doi:10.1161/01.ATV.0000094961.74697.54.

Calvente, C. J., Tameda, M., Johnson, C. D., Del Pilar, H., Lin, Y. C., Adronikou, N., et al. (2019). Neutrophils contribute to spontaneous resolution of liver inflammation and fibrosis via microRNA-223. *J. Clin. Invest.* 130. doi:10.1172/JCI122258.

Camont, L., Chapman, M. J., and Kontush, A. (2011). Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 17, 594–603. doi:10.1016/j.molmed.2011.05.013.

Camont, L., Lhomme, M., Rached, F., Le Goff, W., Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R., et al. (2013). Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2715–2723. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301468.

Cannon, C. P., Blazing, M. A., Giugliano, R. P., McCagg, A., White, J. A., Theroux, P., et al. (2015). Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 372, 2387–2397. doi:10.1056/NEJMoa1410489.

Cannon, C. P., Shah, S., Dansky, H. M., Davidson, M., Brinton, E. A., Gotto, A. M., et al. (2010). Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 363, 2406–2415. doi:10.1056/NEJMoa1009744.

Cao, G., Beyer, T. P., Yang, X. P., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Bensch, W. R., et al. (2002). Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 39561–39565. doi:10.1074/jbc.M207187200.

Cao, L., Wang, S., Zhang, Y., Wong, K.-C., Nakatsu, G., Wang, X., et al. (2018). Zinc-finger protein 471 suppresses gastric cancer through transcriptionally repressing downstream oncogenic PLS3 and TFAP2A. *Oncogene* 37, 3601–3616. doi:10.1038/s41388-018-0220-5.

Carrer, A., Parris, J. L. D., Trefely, S., Henry, R. A., Montgomery, D. C., Torres, A., et al. (2017). Impact of a High-fat Diet on Tissue Acyl-CoA and Histone Acetylation Levels. *J. Biol. Chem.* 292, 3312–3322. doi:10.1074/jbc.M116.750620.

Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., et al. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 3, 17071. doi:10.1038/cddiscovery.2017.71.

Castellano-Castillo, D., Denechaud, P.-D., Fajas, L., Moreno-Indias, I., Oliva-Olivera, W., Tinahones, F., et al. (2019). Human adipose tissue H3K4me3 histone mark in adipogenic, lipid metabolism and inflammatory genes is positively associated with BMI and HOMA-IR. *PLoS ONE* 14, e0215083. doi:10.1371/journal.pone.0215083.

Catapano, A. L., Graham, I., De Backer, G., Wiklund, O., Chapman, M. J., Drexel, H., et al. (2016). 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur. Heart J.* 37, 2999–3058. doi:10.1093/eurheartj/ehw272.

Chambenoit, O., Hamon, Y., Marguet, D., Rigneault, H., Rosseneu, M., and Chimini, G. (2001). Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem.* 276, 9955–9960. doi:10.1074/jbc.M010265200.

Chambers, J. C., Loh, M., Lehne, B., Drong, A., Kriebel, J., Motta, V., et al. (2015). Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: a nested case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 3, 526–534. doi:10.1016/S2213-8587(15)00127-8.

Chapman, M. J., Le Goff, W., Guerin, M., and Kontush, A. (2010). Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Eur. Heart J.* 31, 149–164. doi:10.1093/eurheartj/ehp399.

Chen, L., DeWispelaere, A., Dastvan, F., Osborne, W. R. A., Blechner, C., Windhorst, S., et al. (2016). Smooth Muscle-Alpha Actin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Inhibiting Rac1 Activity. *PLoS ONE* 11, e0155726. doi:10.1371/journal.pone.0155726.

Chirovsky, D. R., Fedirko, V., Cui, Y., Sazonov, V., and Barter, P. (2009). Prospective studies on the relationship between high-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular risk: a systematic review. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 16, 404–423. doi:10.1097/HJR.0b013e32832c8891.

Chisholm, J. W., Burleson, E. R., Shelness, G. S., and Parks, J. S. (2002). ApoA-I secretion from HepG2 cells: evidence for the secretion of both lipid-poor apoA-I and intracellularly assembled nascent HDL. *J. Lipid Res.* 43, 36–44.

Chow, M., Boheler, K. R., and Li, R. A. (2013). Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for heart regeneration, drug discovery and disease modeling: from the genetic, epigenetic, and tissue modeling perspectives. *Stem Cell Res Ther* 4, 97. doi:10.1186/scrt308.

Chrisman, T. D., Perkins, D. T., and Garbers, D. L. (2003). Identification of a potent serum factor that causes desensitization of the receptor for C-Type natriuretic peptide. *Cell Commun. Signal* 1, 4. doi:10.1186/1478-811X-1-4.

Christoffersen, C., Jauhiainen, M., Moser, M., Porse, B., Ehnholm, C., Boesl, M., et al. (2008). Effect of apolipoprotein M on high density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 283, 1839–1847. doi:10.1074/jbc.M704576200.

Clark, R. W., Ruggeri, R. B., Cunningham, D., and Bamberger, M. J. (2006). Description of the torcetrapib series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors, including mechanism of action. *J. Lipid Res.* 47, 537–552. doi:10.1194/jlr.M500349-JLR200.

Cockerill, G. W., Huehns, T. Y., Weerasinghe, A., Stocker, C., Lerch, P. G., Miller, N. E., et al. (2001). Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* 103, 108–112. doi:10.1161/01.cir.103.1.108.

Collet, X., Tall, A. R., Serajuddin, H., Guendouzi, K., Royer, L., Oliveira, H., et al. (1999). Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *J. Lipid Res.* 40, 1185–1193.

Cooke, A. L., Morris, J., Melchior, J. T., Street, S. E., Jerome, W. G., Huang, R., et al. (2018). A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL. *J. Lipid Res.* 59, 1244–1255. doi:10.1194/jlr.M085332.

Corsini, A., Bellosta, S., Baetta, R., Fumagalli, R., Paoletti, R., and Bernini, F. (1999). New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* 84, 413–428.

Couvert, P., Giral, P., Bonnefont-Rousselot, D., and Carrié, A. (2010). Les dyslipidémies héréditaires. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010, 73–85. doi:10.1016/S1773-035X(10)70646-8.

Croop, J. M., Tiller, G. E., Fletcher, J. A., Lux, M. L., Raab, E., Goldenson, D., et al. (1997). Isolation and characterization of a mammalian homolog of the Drosophila white gene. *Gene* 185, 77–85.

Cserepes, J., Szentpétery, Z., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., et al. (2004). Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 860–867. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.037.

Daniil, G., Phedonos, A. A. P., Holleboom, A. G., Motazacker, M. M., Argyri, L., Kuivenhoven, J. A., et al. (2011). Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apoA-I-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders. *Clin. Chim. Acta* 412, 1213–1220. doi:10.1016/j.cca.2011.03.011.

Davidson, W. S. (2015). LDL Proteome Watch pag. Available at: http://homepages.uc.edu/~davidswm/HDLproteome.html.

Davidson, W. S., and Thompson, T. B. (2007). The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 282, 22249–22253. doi:10.1074/jbc.R700014200.

Dayeh, T., Tuomi, T., Almgren, P., Perfilyev, A., Jansson, P.-A., de Mello, V. D., et al. (2016). DNA methylation of loci within ABCG1 and PHOSPHO1 in blood DNA is associated with future type 2 diabetes risk. *Epigenetics* 11, 482–488. doi:10.1080/15592294.2016.1178418.

de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J., Kim, T., Civelek, M., Baldán, Á., Esau, C., et al. (2013). MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. *Circ. Res.* 112, 1602–1612. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300648.

de Castro Barbosa, T., Ingerslev, L. R., Alm, P. S., Versteyhe, S., Massart, J., Rasmussen, M., et al. (2016). High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab* 5, 184–197. doi:10.1016/j.molmet.2015.12.002.

De Craene, J.-O., Bertazzi, D. L., Bär, S., and Friant, S. (2017). Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *Int J Mol Sci* 18. doi:10.3390/ijms18030634.

de Grooth, G. J., Smilde, T. J., Van Wissen, S., Klerkx, A. H. E. M., Zwinderman, A. H., Fruchart, J.-C., et al. (2004). The relationship between cholesteryl ester transfer protein levels and risk factor profile in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 173, 261–267. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2003.11.020.

de la Llera-Moya, M., Rothblat, G. H., Connelly, M. A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S. W., Phillips, M. C., et al. (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* 40, 575–580.

De Nardo, D., Labzin, L. I., Kono, H., Seki, R., Schmidt, S. V., Beyer, M., et al. (2014). High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat. Immunol.* 15, 152–160. doi:10.1038/ni.2784.

de Souza, J. A., Vindis, C., Nègre-Salvayre, A., Rye, K.-A., Couturier, M., Therond, P., et al. (2010). Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 608–620. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00713.x.

DeBose-Boyd, R. A., and Ye, J. (2018). SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond. *Trends Biochem. Sci.* 43, 358–368. doi:10.1016/j.tibs.2018.01.005.

Dekkers, K. F., van Iterson, M., Slieker, R. C., Moed, M. H., Bonder, M. J., van Galen, M., et al. (2016). Blood lipids influence DNA methylation in circulating cells. *Genome Biol.* 17, 138. doi:10.1186/s13059-016-1000-6.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 360, 2289–2301. doi:10.1056/NEJMoa0810069.

Denham, J., O'Brien, B. J., Harvey, J. T., and Charchar, F. J. (2015). Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. *Epigenomics* 7, 717–731. doi:10.2217/epi.15.29.

Dergunov, A. D., Shabrova, E. V., and Dobretsov, G. E. (2010). Composition, structure and substrate properties of reconstituted discoidal HDL with apolipoprotein A-I and cholesteryl ester. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 75, 1100–1107. doi:10.1016/j.saa.2009.12.064.

Desgagné, V., Bouchard, L., and Guérin, R. (2017). microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55, 667–686. doi:10.1515/cclm-2016-0575.

Desrumaux, C. M., Mak, P. A., Boisvert, W. A., Masson, D., Stupack, D., Jauhiainen, M., et al. (2003). Phospholipid transfer protein is present in human atherosclerotic lesions and is expressed by macrophages and foam cells. *J. Lipid Res.* 44, 1453–1461. doi:10.1194/jlr.M200281-JLR200.

Didichenko, S. A., Navdaev, A. V., Cukier, A. M. O., Gille, A., Schuetz, P., Spycher, M. O., et al. (2016). Enhanced HDL Functionality in Small HDL Species Produced Upon Remodeling of HDL by Reconstituted HDL, CSL112: Effects on Cholesterol Efflux, Anti-Inflammatory and Antioxidative Activity. *Circ. Res.* 119, 751–763. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308685.

Diditchenko, S., Gille, A., Pragst, I., Stadler, D., Waelchli, M., Hamilton, R., et al. (2013). Novel formulation of a reconstituted high-density lipoprotein (CSL112) dramatically enhances ABCA1-dependent cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2202–2211. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301981.

Diederich, W., Orsó, E., Drobnik, W., and Schmitz, G. (2001). Apolipoprotein AI and HDL(3) inhibit spreading of primary human monocytes through a mechanism that involves cholesterol depletion and regulation of CDC42. *Atherosclerosis* 159, 313–324. doi:10.1016/s0021-9150(01)00518-4.

Donkin, I., Versteyhe, S., Ingerslev, L. R., Qian, K., Mechta, M., Nordkap, L., et al. (2016). Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. *Cell Metab.* 23, 369–378. doi:10.1016/j.cmet.2015.11.004.

Du, X.-M., Kim, M.-J., Hou, L., Le Goff, W., Chapman, M. J., Van Eck, M., et al. (2015). HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export. *Circ. Res.* 116, 1133–1142. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305485.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357–1361. doi:10.1038/nature08938.

Dugué-Pujol, S., Rousset, X., Pastier, D., Quang, N. T., Pautre, V., Chambaz, J., et al. (2006). Human apolipoprotein A-II associates with triglyceride-rich lipoproteins in plasma and impairs their catabolism. *J. Lipid Res.* 47, 2631–2639. doi:10.1194/jlr.M600112-JLR200.

Dumont, L., Gautier, T., de Barros, J.-P. P., Laplanche, H., Blache, D., Ducoroy, P., et al. (2005). Molecular mechanism of the blockade of plasma cholesteryl ester transfer protein by its physiological inhibitor apolipoprotein CI. *J. Biol. Chem.* 280, 38108–38116. doi:10.1074/jbc.M504678200.

Duong, M., Psaltis, M., Rader, D. J., Marchadier, D., Barter, P. J., and Rye, K.-A. (2003). Evidence that hepatic lipase and endothelial lipase have different substrate specificities for high-density lipoprotein phospholipids. *Biochemistry* 42, 13778–13785. doi:10.1021/bi034990n.

Durbin, D. M., and Jonas, A. (1997). The effect of apolipoprotein A-II on the structure and function of apolipoprotein A-I in a homogeneous reconstituted high density lipoprotein particle. *J. Biol. Chem.* 272, 31333–31339. doi:10.1074/jbc.272.50.31333.

Edmondson, A. C., Braund, P. S., Stylianou, I. M., Khera, A. V., Nelson, C. P., Wolfe, M. L., et al. (2011). Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol. *Circ Cardiovasc Genet* 4, 145–155. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.957563.

El Khoudary, S. R., Ceponiene, I., Samargandy, S., Stein, J. H., Li, D., Tattersall, M. C., et al. (2018). HDL (High-Density Lipoprotein) Metrics and Atherosclerotic Risk in Women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 2236–2244. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311017.

Engel, T., Bode, G., Lueken, A., Knop, M., Kannenberg, F., Nofer, J.-R., et al. (2006). Expression and functional characterization of ABCG1 splice variant ABCG1(666). *FEBS Lett.* 580, 4551–4559. doi:10.1016/j.febslet.2006.07.006.

Engel, T., Fobker, M., Buchmann, J., Kannenberg, F., Rust, S., Nofer, J.-R., et al. (2014). 3β,5α,6β-Cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol accumulate in ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)-deficiency. *Atherosclerosis* 235, 122–129. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.023.

Engel, T., Kannenberg, F., Fobker, M., Nofer, J.-R., Bode, G., Lueken, A., et al. (2007). Expression of ATP binding cassette-transporter ABCG1 prevents cell death by transporting cytotoxic 7beta-hydroxycholesterol. *FEBS Lett.* 581, 1673–1680. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.038.

Eom, K. S., Cheong, J. S., and Lee, S. J. (2016). Structural Analyses of Zinc Finger Domains for Specific Interactions with DNA. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 2019–2029. doi:10.4014/jmb.1609.09021.

Fan, J., Krautkramer, K. A., Feldman, J. L., and Denu, J. M. (2015). Metabolic regulation of histone post-translational modifications. *ACS Chem. Biol.* 10, 95–108. doi:10.1021/cb500846u.

Fang, M., Chen, D., and Yang, C. S. (2007). Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J. Nutr.* 137, 223S-228S. doi:10.1093/jn/137.1.223S.

Farias, N., Ho, N., Butler, S., Delaney, L., Morrison, J., Shahrzad, S., et al. (2015). The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. *J. Nutr. Biochem.* 26, 818–826. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.02.002.

Favari, E., Calabresi, L., Adorni, M. P., Jessup, W., Simonelli, S., Franceschini, G., et al. (2009). Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry* 48, 11067–11074. doi:10.1021/bi901564g.

Fayad, Z. A., Mani, V., Woodward, M., Kallend, D., Abt, M., Burgess, T., et al. (2011a). Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *Lancet* 378, 1547–1559. doi:10.1016/S0140-6736(11)61383-4.

Fayad, Z. A., Mani, V., Woodward, M., Kallend, D., Bansilal, S., Pozza, J., et al. (2011b). Rationale and design of dal-PLAQUE: a study assessing efficacy and safety of dalcetrapib on progression or regression of atherosclerosis using magnetic resonance imaging and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography. *Am. Heart J.* 162, 214-221.e2. doi:10.1016/j.ahj.2011.05.006.

Feig, J. E., Pineda-Torra, I., Sanson, M., Bradley, M. N., Vengrenyuk, Y., Bogunovic, D., et al. (2010). LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic

plaques during atherosclerosis regression. *J. Clin. Invest.* 120, 4415–4424. doi:10.1172/JCI38911.

Feig, J. E., Rong, J. X., Shamir, R., Sanson, M., Vengrenyuk, Y., Liu, J., et al. (2011). HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7166–7171. doi:10.1073/pnas.1016086108.

Feinberg, A. P., Koldobskiy, M. A., and Göndör, A. (2016). Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat. Rev. Genet.* 17, 284–299. doi:10.1038/nrg.2016.13.

Feingold, K. R., and Grunfeld, C. (2000). "Introduction to Lipids and Lipoproteins," in *Endotext*, eds. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, et al. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/.

Feng, Y., Schouteden, S., Geenens, R., Van Duppen, V., Herijgers, P., Holvoet, P., et al. (2012). Hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and differentiation is differentially regulated by high-density and low-density lipoproteins in mice. *PLoS ONE* 7, e47286. doi:10.1371/journal.pone.0047286.

Ferrari, A., Fiorino, E., Giudici, M., Gilardi, F., Galmozzi, A., Mitro, N., et al. (2012). Linking epigenetics to lipid metabolism: focus on histone deacetylases. *Mol. Membr. Biol.* 29, 257–266. doi:10.3109/09687688.2012.729094.

Ferrari, L., Carugno, M., and Bollati, V. (2019). Particulate matter exposure shapes DNA methylation through the lifespan. *Clin Epigenetics* 11, 129. doi:10.1186/s13148-019-0726-x.

Feschotte, C., and Gilbert, C. (2012). Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat. Rev. Genet.* 13, 283–296. doi:10.1038/nrg3199.

Ficz, G. (2015). New insights into mechanisms that regulate DNA methylation patterning. *J. Exp. Biol.* 218, 14–20. doi:10.1242/jeb.107961.

Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36, 211–228.

Fielding, C. J., Shore, V. G., and Fielding, P. E. (1972). A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1493–1498. doi:10.1016/0006-291x(72)90776-0.

Fiorino, E., Giudici, M., Ferrari, A., Mitro, N., Caruso, D., De Fabiani, E., et al. (2014). The sirtuin class of histone deacetylases: regulation and roles in lipid metabolism. *IUBMB Life* 66, 89–99. doi:10.1002/iub.1246.

Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Chroni, A., Mendez, A. J., Zannis, V. I., and Freeman, M. W. (2004). ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 45, 287–294. doi:10.1194/jlr.M300355-JLR200.

Franceschini, G., Sirtori, C. R., Capurso, A., Weisgraber, K. H., and Mahley, R. W. (1980). A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J. Clin. Invest.* 66, 892–900. doi:10.1172/JCI109956.

Frank, P. G., and Marcel, Y. L. (2000). Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J. Lipid Res.* 41, 853–872.

Fraser, H. B., Lam, L. L., Neumann, S. M., and Kobor, M. S. (2012). Population-specificity of human DNA methylation. *Genome Biol.* 13, R8. doi:10.1186/gb-2012-13-2-r8.

Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.

Frisdal, E., and Le Goff, W. (2015). Adipose ABCG1: A potential therapeutic target in obesity? *Adipocyte* 4, 315–318. doi:10.1080/21623945.2015.1023491.

Fruchart, J.-C., Sacks, F. M., Hermans, M. P., Assmann, G., Brown, W. V., Ceska, R., et al. (2008). The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in dyslipidaemic patient. *Diab Vasc Dis Res* 5, 319–335. doi:10.3132/dvdr.2008.046.

Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., and Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat. Genet.* 24, 88–91. doi:10.1038/71750.

Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003a). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 31, 2305–2312. doi:10.1093/nar/gkg332.

Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P., and Kouzarides, T. (2003b). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 278, 4035–4040. doi:10.1074/jbc.M210256200.

Furuyama, S., Uehara, Y., Zhang, B., Baba, Y., Abe, S., Iwamoto, T., et al. (2009). Genotypic Effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men. *J. Atheroscler. Thromb.* 16, 194–200.

Galle-Treger, L., Moreau, M., Ballaire, R., Poupel, L., Huby, T., Sasso, E., et al. (2019). Targeted invalidation of SR-B1 in macrophages reduces macrophage apoptosis and accelerates atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* doi:10.1093/cvr/cvz138.

Ganjali, S., Gotto, A. M., Ruscica, M., Atkin, S. L., Butler, A. E., Banach, M., et al. (2018). Monocyte-to-HDL-cholesterol ratio as a prognostic marker in cardiovascular diseases. *J. Cell. Physiol.* 233, 9237–9246. doi:10.1002/jcp.27028.

Gao, S., Wang, X., Cheng, D., Li, J., Li, L., Ran, L., et al. (2017). Overexpression of Cholesteryl Ester Transfer Protein Increases Macrophage-Derived Foam Cell Accumulation in Atherosclerotic Lesions of Transgenic Rabbits. *Mediators Inflamm.* 2017, 3824276. doi:10.1155/2017/3824276.

García-Calzón, S., Perfilyev, A., de Mello, V. D., Pihlajamäki, J., and Ling, C. (2018). Sex Differences in the Methylome and Transcriptome of the Human Liver and Circulating HDL-Cholesterol Levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103, 4395–4408. doi:10.1210/jc.2018-00423.

Gautier, T., Klein, A., Deckert, V., Desrumaux, C., Ogier, N., Sberna, A.-L., et al. (2008). Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J. Biol. Chem.* 283, 18702–18710. doi:10.1074/jbc.M802802200.

Gautier, T., Masson, D., de Barros, J. P., Athias, A., Gambert, P., Aunis, D., et al. (2000). Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J. Biol. Chem.* 275, 37504–37509. doi:10.1074/jbc.M007210200.

Ge, L., Wang, J., Qi, W., Miao, H.-H., Cao, J., Qu, Y.-X., et al. (2008). The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab.* 7, 508–519. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.001.

Gelissen, I. C., Cartland, S., Brown, A. J., Sandoval, C., Kim, M., Dinnes, D. L., et al. (2010). Expression and stability of two isoforms of ABCG1 in human vascular cells. *Atherosclerosis* 208, 75–82. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.028.

Gelissen, I. C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A. J., Kockx, M., et al. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 534–540. doi:10.1161/01.ATV.0000200082.58536.e1.

Gelissen, I. C., Sharpe, L. J., Sandoval, C., Rao, G., Kockx, M., Kritharides, L., et al. (2012). Protein kinase A modulates the activity of a major human isoform of ABCG1. *J. Lipid Res.* 53, 2133–2140. doi:10.1194/jlr.M028795.

Gerin, I., Clerbaux, L.-A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A. K., Burant, C. F., et al. (2010). Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 285, 33652–33661. doi:10.1074/jbc.M110.152090.

Gille, A., Easton, R., D'Andrea, D., Wright, S. D., and Shear, C. L. (2014). CSL112 enhances biomarkers of reverse cholesterol transport after single and multiple infusions in healthy subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2106–2114. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303720.

Goedeke, L., Rotllan, N., Canfrán-Duque, A., Aranda, J. F., Ramírez, C. M., Araldi, E., et al. (2015a). MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. *Nat. Med.* 21, 1280–1289. doi:10.1038/nm.3949.

Goedeke, L., Rotllan, N., Ramírez, C. M., Aranda, J. F., Canfrán-Duque, A., Araldi, E., et al. (2015b). miR-27b inhibits LDLR and ABCA1 expression but does not influence plasma and hepatic lipid levels in mice. *Atherosclerosis* 243, 499–509. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.033.

Goedeke, L., Vales-Lara, F. M., Fenstermaker, M., Cirera-Salinas, D., Chamorro-Jorganes, A., Ramírez, C. M., et al. (2013). A regulatory role for microRNA 33* in controlling lipid metabolism gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2339–2352. doi:10.1128/MCB.01714-12.

Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., and Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 333–337. doi:10.1073/pnas.76.1.333.

Gonzalez, L., Qian, A. S., Tahir, U., Yu, P., and Trigatti, B. L. (2017). Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1, Expressed in Myeloid Cells, Slows Diet-Induced Atherosclerosis and Protects against Macrophage Apoptosis in Ldlr KO Mice. *Int J Mol Sci* 18. doi:10.3390/ijms18122721.

González-Díez, M., Rodríguez, C., Badimon, L., and Martínez-González, J. (2008). Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thromb. Haemost.* 100, 119–126. doi:10.1160/TH07-11-0675.

Gordon, D. J., Probstfield, J. L., Garrison, R. J., Neaton, J. D., Castelli, W. P., Knoke, J. D., et al. (1989). High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79, 8–15. doi:10.1161/01.cir.79.1.8.

Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., and Dawber, T. R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* 62, 707–714. doi:10.1016/0002-9343(77)90874-9.

Gotto, A. M., Pownall, H. J., and Havel, R. J. (1986). Introduction to the plasma lipoproteins. *Meth. Enzymol.* 128, 3–41. doi:10.1016/0076-6879(86)28061-1.

Greene, D. J., Skeggs, J. W., and Morton, R. E. (2001). Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J. Biol. Chem.* 276, 4804–4811. doi:10.1074/jbc.M008725200.

Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., and Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.

Gruaz, L., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., Dayer, J.-M., and Burger, D. (2010). Blockade of T Cell Contact-Activation of Human Monocytes by High-Density Lipoproteins Reveals a New Pattern of Cytokine and Inflammatory Genes. *PLOS ONE* 5, e9418. doi:10.1371/journal.pone.0009418.

Gu, H., Li, G., Gao, X., Berthiaume, L. G., and Zhang, D. (2013). Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: effect on protein trafficking and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1067–1078. doi:10.1016/j.bbalip.2013.01.019.

Guay, S. P., Brisson, D., Lamarche, B., Marceau, P., Vohl, M. C., Gaudet, D., et al. (2013). DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: new molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis* 228, 413–420. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.033.

Guay, S.-P., Brisson, D., Lamarche, B., Gaudet, D., and Bouchard, L. (2014). Epipolymorphisms within lipoprotein genes contribute independently to plasma lipid

levels in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics* 9, 718–729. doi:10.4161/epi.27981.

Guay, S.-P., Brisson, D., Munger, J., Lamarche, B., Gaudet, D., and Bouchard, L. (2012). ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics* 7, 464–472. doi:10.4161/epi.19633.

Guérin, M., Le Goff, W., Lassel, T. S., Van Tol, A., Steiner, G., and Chapman, M. J. (2001). Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 282–288.

Guerin, M., Silvain, J., Gall, J., Darabi, M., Berthet, M., Frisdal, E., et al. (2018). Association of Serum Cholesterol Efflux Capacity With Mortality in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 72, 3259–3269. doi:10.1016/j.jacc.2018.09.080.

Gulshan, K., Brubaker, G., Conger, H., Wang, S., Zhang, R., Hazen, S. L., et al. (2016). PI(4,5)P2 Is Translocated by ABCA1 to the Cell Surface Where It Mediates Apolipoprotein A1 Binding and Nascent HDL Assembly. *Circ. Res.* 119, 827–838. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308856.

Guo, Z., Maki, M., Ding, R., Yang, Y., Zhang, B., and Xiong, L. (2014). Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. *Sci Rep* 4, 5150. doi:10.1038/srep05150.

Halcox, J. P. J., Donald, A. E., Ellins, E., Witte, D. R., Shipley, M. J., Brunner, E. J., et al. (2009). Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation* 119, 1005–1012. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.765701.

Han, L., Witmer, P. D., Casey, E., Valle, D., and Sukumar, S. (2007). DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1284–1288. doi:10.4161/cbt.6.8.4486.

Han, S., Schroeder, E. A., Silva-García, C. G., Hebestreit, K., Mair, W. B., and Brunet, A. (2017). Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to C. elegans lifespan. *Nature* 544, 185–190. doi:10.1038/nature21686.

Hansel, B., Giral, P., Nobecourt, E., Chantepie, S., Bruckert, E., Chapman, M. J., et al. (2004). Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 4963–4971. doi:10.1210/jc.2004-0305.

Haraki, T., Inazu, A., Yagi, K., Kajinami, K., Koizumi, J., and Mabuchi, H. (1997). Clinical characteristics of double heterozygotes with familial hypercholesterolemia and cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* 132, 229–236. doi:10.1016/s0021-9150(97)00093-2.

Hardy, L. M., Frisdal, E., and Le Goff, W. (2017). Critical Role of the Human ATP-Binding Cassette G1 Transporter in Cardiometabolic Diseases. *Int J Mol Sci* 18. doi:10.3390/ijms18091892.

Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A., and Weisgraber, K. H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* 31, 445–454. doi:10.1016/j.tibs.2006.06.008.

Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J., and Zierath, J. R. (2014). Integrative biology of exercise. *Cell* 159, 738–749. doi:10.1016/j.cell.2014.10.029.

Hayek, T., Oiknine, J., Brook, J. G., and Aviram, M. (1994). Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 1567–1574. doi:10.1006/bbrc.1994.1883.

Hedman, Å. K., Mendelson, M. M., Marioni, R. E., Gustafsson, S., Joehanes, R., Irvin, M. R., et al. (2017). Epigenetic Patterns in Blood Associated With Lipid Traits Predict Incident Coronary Heart Disease Events and Are Enriched for Results From Genome-Wide Association StudiesCLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 10, e001487. doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001487.

Helgadottir, A., Sulem, P., Thorgeirsson, G., Gretarsdottir, S., Thorleifsson, G., Jensson, B. Ö., et al. (2018). Rare SCARB1 mutations associate with high-density lipoprotein cholesterol but not with coronary artery disease. *Eur Heart J* 39, 2172–2178. doi:10.1093/eurheartj/ehy169.

Hesler, C. B., Tall, A. R., Swenson, T. L., Weech, P. K., Marcel, Y. L., and Milne, R. W. (1988). Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J. Biol. Chem.* 263, 5020–5023.

Hessler, J. R., Robertson, A. L., and Chisolm, G. M. (1979). LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis* 32, 213–229. doi:10.1016/0021-9150(79)90166-7.

Hoekstra, M., Kruijt, J. K., Van Eck, M., and Van Berkel, T. J. C. (2003). Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* 278, 25448–25453. doi:10.1074/jbc.M301189200.

Horie, T., Ono, K., Horiguchi, M., Nishi, H., Nakamura, T., Nagao, K., et al. (2010). MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17321–17326. doi:10.1073/pnas.1008499107.

Hovingh, G. K., Smits, L. P., Stefanutti, C., Soran, H., Kwok, S., de Graaf, J., et al. (2015). The effect of an apolipoprotein A-I-containing high-density lipoprotein-mimetic particle (CER-001) on carotid artery wall thickness in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: The Modifying Orphan Disease Evaluation (MODE) study. *Am. Heart J.* 169, 736-742.e1. doi:10.1016/j.ahj.2015.01.008.

Howell, K. W., Meng, X., Fullerton, D. A., Jin, C., Reece, T. B., and Cleveland, J. C. (2011). Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells. *J. Surg. Res.* 171, e27-31. doi:10.1016/j.jss.2011.06.033.

HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group, Bowman, L., Hopewell, J. C., Chen, F., Wallendszus, K., Stevens, W., et al. (2017). Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 1217–1227. doi:10.1056/NEJMoa1706444.

Hsieh, V., Kim, M.-J., Gelissen, I. C., Brown, A. J., Sandoval, C., Hallab, J. C., et al. (2014). Cellular cholesterol regulates ubiquitination and degradation of the cholesterol export proteins ABCA1 and ABCG1. *J. Biol. Chem.* 289, 7524–7536. doi:10.1074/jbc.M113.515890.

Hu, Y.-W., Hu, Y.-R., Zhao, J.-Y., Li, S.-F., Ma, X., Wu, S.-G., et al. (2014). An agomir of miR-144-3p accelerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production. *PLoS ONE* 9, e94997. doi:10.1371/journal.pone.0094997.

Huang, J., Lee, H., Zivkovic, A. M., Smilowitz, J. T., Rivera, N., German, J. B., et al. (2014). Glycomic analysis of high density lipoprotein shows a highly sialylated particle. *J. Proteome Res.* 13, 681–691. doi:10.1021/pr4012393.

Huang, L., Chambliss, K. L., Gao, X., Yuhanna, I. S., Behling-Kelly, E., Bergaya, S., et al. (2019). SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. *Nature* 569, 565–569. doi:10.1038/s41586-019-1140-4.

Huby, T., Doucet, C., Dachet, C., Ouzilleau, B., Ueda, Y., Afzal, V., et al. (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J. Clin. Invest.* 116, 2767–2776. doi:10.1172/JCI26893.

Iida, A., Saito, S., Sekine, A., Mishima, C., Kitamura, Y., Kondo, K., et al. (2002). Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *J. Hum. Genet.* 47, 285–310. doi:10.1007/s100380200041.

Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J., Takata, K., et al. (1990). Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.* 323, 1234–1238. doi:10.1056/NEJM199011013231803.

Ingerslev, L. R., Donkin, I., Fabre, O., Versteyhe, S., Mechta, M., Pattamaprapanont, P., et al. (2018). Endurance training remodels sperm-borne small RNA expression and methylation at neurological gene hotspots. *Clin Epigenetics* 10, 12. doi:10.1186/s13148-018-0446-7.

Ioka, R. X., Kang, M.-J., Kamiyama, S., Kim, D.-H., Magoori, K., Kamataki, A., et al. (2003). Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *J. Biol. Chem.* 278, 7344–7349. doi:10.1074/jbc.M211932200.

Iwakawa, H.-O., and Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* 25, 651–665. doi:10.1016/j.tcb.2015.07.011.

Iwamoto, N., Abe-Dohmae, S., Sato, R., and Yokoyama, S. (2006). ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis. *J. Lipid Res.* 47, 1915–1927. doi:10.1194/jlr.M600127-JLR200.

Jacob, R. A., Gretz, D. M., Taylor, P. C., James, S. J., Pogribny, I. P., Miller, B. J., et al. (1998). Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J. Nutr.* 128, 1204–1212. doi:10.1093/jn/128.7.1204.

Jantz, D., Amann, B. T., Gatto, G. J., and Berg, J. M. (2004). The design of functional DNA-binding proteins based on zinc finger domains. *Chem. Rev.* 104, 789–799. doi:10.1021/cr020603o.

Jauhiainen, M., Metso, J., Pahlman, R., Blomqvist, S., van Tol, A., and Ehnholm, C. (1993). Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J. Biol. Chem.* 268, 4032–4036.

Jaye, M., Lynch, K. J., Krawiec, J., Marchadier, D., Maugeais, C., Doan, K., et al. (1999). A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat. Genet.* 21, 424–428. doi:10.1038/7766.

Jen, J., and Wang, Y.-C. (2016). Zinc finger proteins in cancer progression. *J. Biomed. Sci.* 23, 53. doi:10.1186/s12929-016-0269-9.

Jensen, M. K., Rimm, E. B., Furtado, J. D., and Sacks, F. M. (2012). Apolipoprotein C-III as a Potential Modulator of the Association Between HDL-Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease. *J Am Heart Assoc* 1. doi:10.1161/JAHA.111.000232.

Ji, A., Wroblewski, J. M., Webb, N. R., and van der Westhuyzen, D. R. (2014). Impact of phospholipid transfer protein on nascent high-density lipoprotein formation and remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1910–1916. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303533.

Jiang, H., Zhang, J., Du, Y., Jia, X., Yang, F., Si, S., et al. (2015). microRNA-185 modulates low density lipoprotein receptor expression as a key posttranscriptional regulator. *Atherosclerosis* 243, 523–532. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.026.

Jiang, X. C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O. L., et al. (1999). Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J. Clin. Invest.* 103, 907–914. doi:10.1172/JCI5578.

Jiang, X.-C. (2018). Phospholipid transfer protein: its impact on lipoprotein homeostasis and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 59, 764–771. doi:10.1194/jlr.R082503.

Jin, Z., and Liu, Y. (2018). DNA methylation in human diseases. *Genes Dis* 5, 1–8. doi:10.1016/j.gendis.2018.01.002.

Johannsen, T. H., Frikke-Schmidt, R., Schou, J., Nordestgaard, B. G., and Tybjærg-Hansen, A. (2012). Genetic inhibition of CETP, ischemic vascular disease and mortality, and possible adverse effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 2041–2048. doi:10.1016/j.jacc.2012.07.045.

Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 16, 421–433. doi:10.1038/nrg3965.

Jones, P. H., Davidson, M. H., Stein, E. A., Bays, H. E., McKenney, J. M., Miller, E., et al. (2003). Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). *Am. J. Cardiol.* 92, 152–160. doi:10.1016/s0002-9149(03)00530-7.

Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., et al. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187–191. doi:10.1038/561.

Joubert, B. R., Håberg, S. E., Nilsen, R. M., Wang, X., Vollset, S. E., Murphy, S. K., et al. (2012). 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 120, 1425–1431. doi:10.1289/ehp.1205412.

Julve, J., Escolà-Gil, J. C., Rotllan, N., Fiévet, C., Vallez, E., de la Torre, C., et al. (2010). Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 232–238. doi:10.1161/ATVBAHA.109.198226.

Jun, H.-J., Kim, J., Hoang, M.-H., and Lee, S.-J. (2012). Hepatic lipid accumulation alters global histone h3 lysine 9 and 4 trimethylation in the peroxisome proliferator-activated receptor alpha network. *PLoS ONE* 7, e44345. doi:10.1371/journal.pone.0044345.

Jun, M., Foote, C., Lv, J., Neal, B., Patel, A., Nicholls, S. J., et al. (2010). Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375, 1875–1884. doi:10.1016/S0140-6736(10)60656-3.

Kader, F., and Ghai, M. (2017). DNA methylation-based variation between human populations. *Mol. Genet. Genomics* 292, 5–35. doi:10.1007/s00438-016-1264-2.

Kallend, D. G., Reijers, J. a. A., Bellibas, S. E., Bobillier, A., Kempen, H., Burggraaf, J., et al. (2016). A single infusion of MDCO-216 (ApoA-1 Milano/POPC) increases ABCA1-mediated cholesterol efflux and pre-beta 1 HDL in healthy volunteers and patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 2, 23–29. doi:10.1093/ehjcvp/pvv041.

Kamata, H., Honda, S.-I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649–661. doi:10.1016/j.cell.2004.12.041.

Kanzleiter, T., Jähnert, M., Schulze, G., Selbig, J., Hallahan, N., Schwenk, R. W., et al. (2015). Exercise training alters DNA methylation patterns in genes related to muscle growth and differentiation in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308, E912-920. doi:10.1152/ajpendo.00289.2014.

Kataoka, Y., Andrews, J., Duong, M., Nguyen, T., Schwarz, N., Fendler, J., et al. (2017). Regression of coronary atherosclerosis with infusions of the high-density lipoprotein

mimetic CER-001 in patients with more extensive plaque burden. *Cardiovasc Diagn Ther* 7, 252–263. doi:10.21037/cdt.2017.02.01.

Kato, K., Long, N. K., Makita, H., Toida, M., Yamashita, T., Hatakeyama, D., et al. (2008). Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 99, 647–654. doi:10.1038/sj.bjc.6604521.

Keating, S. T., and El-Osta, A. (2015). Epigenetics and metabolism. *Circ. Res.* 116, 715–736. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303936.

Keene, D., Price, C., Shun-Shin, M. J., and Francis, D. P. (2014). Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *BMJ* 349, g4379. doi:10.1136/bmj.g4379.

Kempen, H. J., Asztalos, B. F., Moerland, M., Jeyarajah, E., Otvos, J., Kallend, D. G., et al. (2016). High-Density Lipoprotein Subfractions and Cholesterol Efflux Capacities After Infusion of MDCO-216 (Apolipoprotein A-IMilano/Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine) in Healthy Volunteers and Stable Coronary Artery Disease Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 736–742. doi:10.1161/ATVBAHA.115.307052.

Kennedy, M. A., Barrera, G. C., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M. C., et al. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 1, 121–131. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.002.

Kennedy, M. A., Venkateswaran, A., Tarr, P. T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., et al. (2001). 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. *J. Biol. Chem.* 276, 39438–39447. doi:10.1074/jbc.M105863200.

Khera, A. V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M. F., Jafri, K., et al. (2011). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 364, 127–135. doi:10.1056/NEJMoa1001689.

Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216. doi:10.1016/s0092-8674(03)00801-8.

Kim, V. N., and Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 22, 165–173. doi:10.1016/j.tig.2006.01.003.

Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., et al. (2003). High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1283–1288. doi:10.1161/01.ATV.0000079011.67194.5A.

King, K., Murphy, S., and Hoyo, C. (2015). Epigenetic regulation of Newborns' imprinted genes related to gestational growth: patterning by parental race/ethnicity and maternal socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health* 69, 639–647. doi:10.1136/jech-2014-204781.

Klucken, J., Büchler, C., Orsó, E., Kaminski, W. E., Porsch-Özcürümez, M., Liebisch, G., et al. (2000). 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* 97, 817–822.

Knutson, S. K., Chyla, B. J., Amann, J. M., Bhaskara, S., Huppert, S. S., and Hiebert, S. W. (2008). Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J.* 27, 1017–1028. doi:10.1038/emboj.2008.51.

Ko, D. T., Alter, D. A., Guo, H., Koh, M., Lau, G., Austin, P. C., et al. (2016). High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cause-Specific Mortality in Individuals Without Previous Cardiovascular Conditions: The CANHEART Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 2073–2083. doi:10.1016/j.jacc.2016.08.038.

Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., et al. (2006). Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J. Lipid Res.* 47, 1791–1802. doi:10.1194/jlr.M500546-JLR200.

Koch, A., Joosten, S. C., Feng, Z., de Ruijter, T. C., Draht, M. X., Melotte, V., et al. (2018). Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 459–466. doi:10.1038/s41571-018-0004-4.

Konno, M., Koseki, J., Asai, A., Yamagata, A., Shimamura, T., Motooka, D., et al. (2019). Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers. *Nat Commun* 10, 3888. doi:10.1038/s41467-019-11826-1.

Kontush, A., and Chapman, M. J. (2012). *High-density lipoproteins: structure, metabolism, function, and therapeutics*. Hoboken, NJ: Wiley.

Kontush, A., Lhomme, M., and Chapman, M. J. (2013). Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J. Lipid Res.* 54, 2950–2963. doi:10.1194/jlr.R036095.

Kontush, A., Lindahl, M., Lhomme, M., Calabresi, L., Chapman, M. J., and Davidson, W. S. (2015a). Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol* 224, 3–51. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_1.

Kontush, A., Therond, P., Zerrad, A., Couturier, M., Négre-Salvayre, A., de Souza, J. A., et al. (2007). Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1843–1849. doi:10.1161/ATVBAHA.107.145672.

Kontush, A., Tubeuf, E., Le Goff, W., Dauteuille, C., Guillas-Baudouin, I., Lhomme, M., et al. (2015b). Phosphatidylserine potently enhances anti-inflammatory activities of reconstituted HDL. *Atherosclerosis* 241, e30. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.112.

Kootte, R. S., Smits, L. P., van der Valk, F. M., Dasseux, J.-L., Keyserling, C. H., Barbaras, R., et al. (2015). Effect of open-label infusion of an apoA-I-containing particle (CER-001) on RCT and artery wall thickness in patients with FHA. *J. Lipid Res.* 56, 703–712. doi:10.1194/jlr.M055665.

Korporaal, S. J. A., Meurs, I., Hauer, A. D., Hildebrand, R. B., Hoekstra, M., Cate, H. T., et al. (2011). Deletion of the high-density lipoprotein receptor scavenger receptor BI in mice modulates thrombosis susceptibility and indirectly affects platelet function by elevation of plasma free cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 34–42. doi:10.1161/ATVBAHA.110.210252.

Kribelbauer, J. F., Laptenko, O., Chen, S., Martini, G. D., Freed-Pastor, W. A., Prives, C., et al. (2017). Quantitative Analysis of the DNA Methylation Sensitivity of Transcription Factor Complexes. *Cell Rep* 19, 2383–2395. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.069.

Krieger, M. (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 523–558. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.523.

Krieger, M., and Herz, J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63, 601–637. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.003125.

Krishnan, S., Huang, J., Lee, H., Guerrero, A., Berglund, L., Anuurad, E., et al. (2015). Combined High-Density Lipoprotein Proteomic and Glycomic Profiles in Patients at Risk for Coronary Artery Disease. *J. Proteome Res.* 14, 5109–5118. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00730.

Kujiraoka, T., Nanjee, M. N., Oka, T., Ito, M., Nagano, M., Cooke, C. J., et al. (2003). Effects of intravenous apolipoprotein A-I/phosphatidylcholine discs on LCAT, PLTP, and CETP in plasma and peripheral lymph in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1653–1659. doi:10.1161/01.ATV.0000089328.23279.3F.

Kulis, M., and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* 70, 27–56. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.

Lacoste, N., and Côté, J. (2003). [The epigenetic code of histones]. *Med Sci (Paris)* 19, 955–959. doi:10.1051/medsci/20031910955.

Lagrost, L., Gambert, P., Dangremont, V., Athias, A., and Lallemant, C. (1990). Role of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in the HDL conversion process as evidenced by using anti-CETP monoclonal antibodies. *J. Lipid Res.* 31, 1569–1575.

Larrede, S., Quinn, C. M., Jessup, W., Frisdal, E., Olivier, M., Hsieh, V., et al. (2009). Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1930–1936. doi:10.1161/ATVBAHA.109.194548.

Lawrence, M., Daujat, S., and Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 32, 42–56. doi:10.1016/j.tig.2015.10.007.

Le Goff, W., Peng, D.-Q., Settle, M., Brubaker, G., Morton, R. E., and Smith, J. D. (2004). Cyclosporin A traps ABCA1 at the plasma membrane and inhibits ABCA1-mediated lipid efflux to apolipoprotein A-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2155–2161. doi:10.1161/01.ATV.0000144811.94581.52.

Lemire, M., Zaidi, S. H. E., Ban, M., Ge, B., Aïssi, D., Germain, M., et al. (2015). Long-range epigenetic regulation is conferred by genetic variation located at thousands of independent loci. *Nat Commun* 6, 6326. doi:10.1038/ncomms7326.

Levine, Y. C., Li, G. K., and Michel, T. (2007). Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK -> Rac1 -> Akt -> endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 20351–20364. doi:10.1074/jbc.M702182200.

Lhomme, M. C., Camont, L., Chapman, M. J., and Kontush, A. (2012). "Lipidomics in Lipoprotein Biology," in *Lipidomics* (John Wiley & Sons, Ltd), 197–217. doi:10.1002/9783527655946.ch10.

Li, D., Zhang, Y., Ma, J., Ling, W., and Xia, M. (2010). Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1354–1362. doi:10.1161/ATVBAHA.110.204230.

Liao, T., Wang, Y.-J., Hu, J.-Q., Wang, Y., Han, L.-T., Ma, B., et al. (2018). Histone methyltransferase KMT5A gene modulates oncogenesis and lipid metabolism of papillary thyroid cancer in vitro. *Oncol. Rep.* 39, 2185–2192. doi:10.3892/or.2018.6295.

Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., et al. (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 5, 56. doi:10.1038/s41572-019-0106-z.

Lim, H. Y., Thiam, C. H., Yeo, K. P., Bisoendial, R., Hii, C. S., McGrath, K. C. Y., et al. (2013). Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL. *Cell Metab.* 17, 671–684. doi:10.1016/j.cmet.2013.04.002.

Lincoff, A. M., Nicholls, S. J., Riesmeyer, J. S., Barter, P. J., Brewer, H. B., Fox, K. A. A., et al. (2017). Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 376, 1933–1942. doi:10.1056/NEJMoa1609581.

Lindholm, M. E., Marabita, F., Gomez-Cabrero, D., Rundqvist, H., Ekström, T. J., Tegnér, J., et al. (2014). An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. *Epigenetics* 9, 1557–1569. doi:10.4161/15592294.2014.982445.

Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G., Linton, E. F., Song, W. L., et al. (2019). "The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis," in *Endotext*, eds. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, et al. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/.

Lipina, C., and Hundal, H. S. (2011). Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia* 54, 1596–1607. doi:10.1007/s00125-011-2127-3.

Liu, F., Wang, W., Xu, Y., Wang, Y., Chen, L.-F., Fang, Q., et al. (2014). ABCG1 rs57137919G>a polymorphism is functionally associated with varying gene expression

and apoptosis of macrophages. *PLoS ONE* 9, e97044. doi:10.1371/journal.pone.0097044.

Llodrá, J., Angeli, V., Liu, J., Trogan, E., Fisher, E. A., and Randolph, G. J. (2004). Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11779–11784. doi:10.1073/pnas.0403259101.

Lucke, S., and Levkau, B. (2010). Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate. *Cell. Physiol. Biochem.* 26, 87–96. doi:10.1159/000315109.

Lumey, L. H., Stein, A. D., Kahn, H. S., and Romijn, J. A. (2009). Lipid profiles in middle-aged men and women after famine exposure during gestation: the Dutch Hunger Winter Families Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1737–1743. doi:10.3945/ajcn.2008.27038.

Lumey, L. H., Stein, A. D., Kahn, H. S., van der Pal-de Bruin, K. M., Blauw, G. J., Zybert, P. A., et al. (2007). Cohort profile: the Dutch Hunger Winter families study. *Int J Epidemiol* 36, 1196–1204. doi:10.1093/ije/dym126.

Lund-Katz, S., Liu, L., Thuahnai, S. T., and Phillips, M. C. (2003). High density lipoprotein structure. *Front. Biosci.* 8, d1044-1054.

Luo, Y., Shelly, L., Sand, T., Reidich, B., Chang, G., Macdougall, M., et al. (2010). Pharmacologic inhibition of phospholipid transfer protein activity reduces apolipoprotein-B secretion from hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 1100–1106. doi:10.1124/jpet.109.161232.

Maeba, R., and Ueta, N. (2003). Ethanolamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers. *J. Lipid Res.* 44, 164–171. doi:10.1194/jlr.m200340-jlr200.

Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., et al. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J. Lipid Res.* 42, 170–180.

Marotti, K. R., Castle, C. K., Boyle, T. P., Lin, A. H., Murray, R. W., and Melchior, G. W. (1993). Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 364, 73–75. doi:10.1038/364073a0.

Marquart, T. J., Allen, R. M., Ory, D. S., and Baldán, A. (2010). miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12228–12232. doi:10.1073/pnas.1005191107.

Martinez, L. O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W., and Tall, A. R. (2003). Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J. Biol. Chem.* 278, 37368–37374. doi:10.1074/jbc.M307161200.

Maruyama, T., Sakai, N., Ishigami, M., Hirano, K., Arai, T., Okada, S., et al. (2003). Prevalence and phenotypic spectrum of cholesteryl ester transfer protein gene mutations in Japanese hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 166, 177–185. doi:10.1016/s0021-9150(02)00327-1.

Masson, D., Deckert, V., Gautier, T., Klein, A., Desrumaux, C., Viglietta, C., et al. (2011). Worsening of diet-induced atherosclerosis in a new model of transgenic rabbit expressing the human plasma phospholipid transfer protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 766–774. doi:10.1161/ATVBAHA.110.215756.

Matz, C. E., and Jonas, A. (1982). Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J. Biol. Chem.* 257, 4535–4540.

McDonnell, E., Crown, S. B., Fox, D. B., Kitir, B., Ilkayeva, O. R., Olsen, C. A., et al. (2016). Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. *Cell Rep* 17, 1463–1472. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.012.

McLachlan, A. D. (1977). Repeated helical pattern in apolipoprotein-A-I. *Nature* 267, 465–466. doi:10.1038/267465a0.

Mehedint, M. G., Craciunescu, C. N., and Zeisel, S. H. (2010). Maternal dietary choline deficiency alters angiogenesis in fetal mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12834–12839. doi:10.1073/pnas.0914328107.

Meikle, P. J., Wong, G., Tsorotes, D., Barlow, C. K., Weir, J. M., Christopher, M. J., et al. (2011). Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2723–2732. doi:10.1161/ATVBAHA.111.234096.

Melchior, J. T., Street, S. E., Andraski, A. B., Furtado, J. D., Sacks, F. M., Shute, R. L., et al. (2017). Apolipoprotein A-II alters the proteome of human lipoproteins and enhances cholesterol efflux from ABCA1. *J. Lipid Res.* 58, 1374–1385. doi:10.1194/jlr.M075382.

Meurs, I., Lammers, B., Zhao, Y., Out, R., Hildebrand, R. B., Hoekstra, M., et al. (2012). The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. *Atherosclerosis* 221, 41–47. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.024.

Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D., and Michel, T. (1997). Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca2+-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272, 15583–15586. doi:10.1074/jbc.272.25.15583.

Michelsen, K. S., Wong, M. H., Shah, P. K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T. M., et al. (2004). Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10679–10684. doi:10.1073/pnas.0403249101.

Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., and Shaul, P. W. (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ. Res.* 98, 1352–1364. doi:10.1161/01.RES.0000225982.01988.93.

Miyazaki, A., Sakuma, S., Morikawa, W., Takiue, T., Miake, F., Terano, T., et al. (1995). Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 1882–1888.

Miyazaki, O., Fukamachi, I., Mori, A., Hashimoto, H., Kawashiri, M., Nohara, A., et al. (2009). Formation of prebeta1-HDL during lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 55–59. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.146.

Moldovan, L., Batte, K., Wang, Y., Wisler, J., and Piper, M. (2013). Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR. *Methods Mol. Biol.* 1024, 129–145. doi:10.1007/978-1-62703-453-1_10.

Monick, M. M., Beach, S. R. H., Plume, J., Sears, R., Gerrard, M., Brody, G. H., et al. (2012). Coordinated changes in AHRR methylation in lymphoblasts and pulmonary macrophages from smokers. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 159B, 141–151. doi:10.1002/ajmg.b.32021.

Montine, K. S., Reich, E., Neely, M. D., Sidell, K. R., Olson, S. J., Markesbery, W. R., et al. (1998). Distribution of reducible 4-hydroxynonenal adduct immunoreactivity in Alzheimer disease is associated with APOE genotype. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 415–425. doi:10.1097/00005072-199805000-00005.

Moore, K. J., Sheedy, F. J., and Fisher, E. A. (2013a). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 709–721. doi:10.1038/nri3520.

Moore, L. D., Le, T., and Fan, G. (2013b). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38. doi:10.1038/npp.2012.112.

Mozhui, K., Smith, A. K., and Tylavsky, F. A. (2015). Ancestry dependent DNA methylation and influence of maternal nutrition. *PLoS ONE* 10, e0118466. doi:10.1371/journal.pone.0118466.

Multhaup, M. L., Seldin, M. M., Jaffe, A. E., Lei, X., Kirchner, H., Mondal, P., et al. (2015). Mouse-human experimental epigenetic analysis unmasks dietary targets and genetic liability for diabetic phenotypes. *Cell Metab.* 21, 138–149. doi:10.1016/j.cmet.2014.12.014.

Murphy, A. J., Akhtari, M., Tolani, S., Pagler, T., Bijl, N., Kuo, C.-L., et al. (2011). ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4138–4149. doi:10.1172/JCI57559.

Murphy, A. J., Bijl, N., Yvan-Charvet, L., Welch, C. B., Bhagwat, N., Reheman, A., et al. (2013). Cholesterol efflux in megakaryocyte progenitors suppresses platelet production and thrombocytosis. *Nat. Med.* 19, 586–594. doi:10.1038/nm.3150.

Murphy, A. J., Westerterp, M., Yvan-Charvet, L., and Tall, A. R. (2012). Anti-atherogenic mechanisms of high density lipoprotein: effects on myeloid cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 513–521. doi:10.1016/j.bbalip.2011.08.003.

Murphy, A. J., Woollard, K. J., Hoang, A., Mukhamedova, N., Stirzaker, R. A., McCormick, S. P. A., et al. (2008). High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 2071–2077. doi:10.1161/ATVBAHA.108.168690.

Nagano, M., Yamashita, S., Hirano, K., Ito, M., Maruyama, T., Ishihara, M., et al. (2002). Two novel missense mutations in the CETP gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects: high-throughput assay by Invader assay. *J. Lipid Res.* 43, 1011–1018. doi:10.1194/jlr.m200024-jlr200.

Nagao, K., Takahashi, K., Azuma, Y., Takada, M., Kimura, Y., Matsuo, M., et al. (2012). ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. *J. Lipid Res.* 53, 126–136. doi:10.1194/jlr.M019976.

Nagaoka, K., Hino, S., Sakamoto, A., Anan, K., Takase, R., Umehara, T., et al. (2015). Lysine-specific demethylase 2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1068–1080. doi:10.1128/MCB.01404-14.

Najafi-Shoushtari, S. H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D. E., Gerszten, R. E., et al. (2010). MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 328, 1566–1569. doi:10.1126/science.1189123.

Nakamura, Y., Kotite, L., Gan, Y., Spencer, T. A., Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (2004). Molecular mechanism of reverse cholesterol transport: reaction of pre-beta-migrating high-density lipoprotein with plasma lecithin/cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 43, 14811–14820. doi:10.1021/bi0485629.

Nanjee, M. N., Cooke, C. J., Garvin, R., Semeria, F., Lewis, G., Olszewski, W. L., et al. (2001). Intravenous apoA-I/lecithin discs increase pre-beta-HDL concentration in tissue fluid and stimulate reverse cholesterol transport in humans. *J. Lipid Res.* 42, 1586–1593.

Nanjee, M. N., Doran, J. E., Lerch, P. G., and Miller, N. E. (1999). Acute effects of intravenous infusion of ApoA1/phosphatidylcholine discs on plasma lipoproteins in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 979–989.

Neufeld, E. B., O'Brien, K., Walts, A. D., Stonik, J. A., Malide, D., Combs, C. A., et al. (2014). The Human ABCG1 Transporter Mobilizes Plasma Membrane and Late Endosomal Non-Sphingomyelin-Associated-Cholesterol for Efflux and Esterification. *Biology (Basel)* 3, 866–891. doi:10.3390/biology3040866.

Neufeld, E. B., Remaley, A. T., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Cooney, A. M., Comly, M., et al. (2001). Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem.* 276, 27584–27590. doi:10.1074/jbc.M103264200.

Neumann, J., Rose-Sperling, D., and Hellmich, U. A. (2017). Diverse relations between ABC transporters and lipids: An overview. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859, 605–618. doi:10.1016/j.bbamem.2016.09.023.

Nicholls, S. J., Andrews, J., Kastelein, J. J. P., Merkely, B., Nissen, S. E., Ray, K. K., et al. (2018a). Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre-β High-Density Lipoprotein Mimetic, on Coronary Atherosclerosis in Patients Following Acute Coronary Syndromes in the CER-001 Atherosclerosis Regression Acute Coronary Syndrome Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol* 3, 815–822. doi:10.1001/jamacardio.2018.2121.

Nicholls, S. J., Puri, R., Ballantyne, C. M., Jukema, J. W., Kastelein, J. J. P., Koenig, W., et al. (2018b). Effect of Infusion of High-Density Lipoprotein Mimetic Containing Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Coronary Disease in Patients With an Acute Coronary Syndrome in the MILANO-PILOT Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol* 3, 806–814. doi:10.1001/jamacardio.2018.2112.

Nichols, A. V., Gong, E. L., Blanche, P. J., and Forte, T. M. (1983). Characterization of discoidal complexes of phosphatidylcholine, apolipoprotein A-I and cholesterol by gradient gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 750, 353–364. doi:10.1016/0005-2760(83)90040-1.

Niesor, E. J., Magg, C., Ogawa, N., Okamoto, H., von der Mark, E., Matile, H., et al. (2010). Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-β-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 51, 3443–3454. doi:10.1194/jlr.M008706.

Nilsson, A., and Duan, R.-D. (2006). Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *J. Lipid Res.* 47, 154–171. doi:10.1194/jlr.M500357-JLR200.

Nilsson, E., Matte, A., Perfilyev, A., de Mello, V. D., Käkelä, P., Pihlajamäki, J., et al. (2015). Epigenetic Alterations in Human Liver From Subjects With Type 2 Diabetes in Parallel With Reduced Folate Levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E1491-1501. doi:10.1210/jc.2015-3204.

Nissen, S. E., Pillai, S. G., Nicholls, S. J., Wolski, K., Riesmeyer, J. S., Weerakkody, G. J., et al. (2018). ADCY9 Genetic Variants and Cardiovascular Outcomes With Evacetrapib in Patients With High-Risk Vascular Disease: A Nested Case-Control Study. *JAMA Cardiol* 3, 401–408. doi:10.1001/jamacardio.2018.0569.

Nissen, S. E., Tsunoda, T., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Cooper, C. J., Yasin, M., et al. (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 2292–2300. doi:10.1001/jama.290.17.2292.

Nofer, J.-R., Geigenmüller, S., Göpfert, C., Assmann, G., Buddecke, E., and Schmidt, A. (2003). High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 98–103. doi:10.1016/j.bbrc.2003.08.126.

Norata, G. D., Banfi, C., Pirillo, A., Tremoli, E., Hamsten, A., Catapano, A. L., et al. (2004). Oxidised-HDL3 induces the expression of PAI-1 in human endothelial cells. Role of p38MAPK activation and mRNA stabilization. *Br. J. Haematol.* 127, 97–104. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05163.x.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257. doi:10.1016/s0092-8674(00)81656-6.

Oldoni, F., Baldassarre, D., Castelnuovo, S., Ossoli, A., Amato, M., van Capelleveen, J., et al. (2018). Complete and Partial Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Deficiency Is Differentially Associated With Atherosclerosis. *Circulation* 138, 1000–1007. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034706.

Olivier, M., BottG, R., Frisdal, E., Nowick, M., Plengpanich, W., Desmarchelier, C., et al. (2014). ABCG1 is involved in vitamin E efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 1741–1751. doi:10.1016/j.bbalip.2014.10.003.

Olivier, M., Tanck, M. W., Out, R., Villard, E. F., Lammers, B., Bouchareychas, L., et al. (2012). Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2223–2231. doi:10.1161/ATVBAHA.111.243519.

Oltra, S. S., Peña-Chilet, M., Vidal-Tomas, V., Flower, K., Martinez, M. T., Alonso, E., et al. (2018). Methylation deregulation of miRNA promoters identifies miR124-2 as a survival biomarker in Breast Cancer in very young women. *Sci Rep* 8, 14373. doi:10.1038/s41598-018-32393-3.

Ooi, S. K. T., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., et al. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448, 714–717. doi:10.1038/nature05987.

Oram, J. F., Lawn, R. M., Garvin, M. R., and Wade, D. P. (2000). ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 34508–34511. doi:10.1074/jbc.M006738200.

Oram, J. F., Wolfbauer, G., Tang, C., Davidson, W. S., and Albers, J. J. (2008). An amphipathic helical region of the N-terminal barrel of phospholipid transfer protein is critical for ABCA1-dependent cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 283, 11541–11549. doi:10.1074/jbc.M800117200.

Oslakovic, C., Krisinger, M. J., Andersson, A., Jauhiainen, M., Ehnholm, C., and Dahlbäck, B. (2009). Anionic phospholipids lose their procoagulant properties when incorporated into high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 284, 5896–5904. doi:10.1074/jbc.M807286200.

Ouimet, M., Ediriweera, H. N., Gundra, U. M., Sheedy, F. J., Ramkhelawon, B., Hutchison, S. B., et al. (2015). MicroRNA-33-dependent regulation of macrophage metabolism directs immune cell polarization in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 125, 4334–4348. doi:10.1172/JCI81676.

Out, R., Hoekstra, M., de Jager, S. C. A., de Vos, P., van der Westhuyzen, D. R., Webb, N. R., et al. (2005). Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice. *J. Lipid Res.* 46, 1172–1181. doi:10.1194/jlr.M400361-JLR200.

Out, R., Hoekstra, M., Habets, K., Meurs, I., de Waard, V., Hildebrand, R. B., et al. (2008). Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 258–264. doi:10.1161/ATVBAHA.107.156935.

Out, R., Hoekstra, M., Hildebrand, R. B., Kruit, J. K., Meurs, I., Li, Z., et al. (2006). Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient

mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2295–2300. doi:10.1161/01.ATV.0000237629.29842.4c.

Out, R., Hoekstra, M., Meurs, I., de Vos, P., Kuiper, J., Van Eck, M., et al. (2007). Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 594–599. doi:10.1161/01.ATV.0000257136.24308.0c.

Out, R., Hoekstra, M., Spijkers, J. A. A., Kruijt, J. K., van Eck, M., Bos, I. S. T., et al. (2004). Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J. Lipid Res.* 45, 2088–2095. doi:10.1194/jlr.M400191-JLR200.

Patel, S., Drew, B. G., Nakhla, S., Duffy, S. J., Murphy, A. J., Barter, P. J., et al. (2009). Reconstituted high-density lipoprotein increases plasma high-density lipoprotein anti-inflammatory properties and cholesterol efflux capacity in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 962–971. doi:10.1016/j.jacc.2008.12.008.

Petersen, A.-K., Zeilinger, S., Kastenmüller, G., Römisch-Margl, W., Brugger, M., Peters, A., et al. (2014). Epigenetics meets metabolomics: an epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. *Hum. Mol. Genet.* 23, 534–545. doi:10.1093/hmg/ddt430.

Pfeiffer, L., Wahl, S., Pilling, L. C., Reischl, E., Sandling, J. K., Kunze, S., et al. (2015). DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ Cardiovasc Genet* 8, 334–342. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000804.

Pirillo, A., Uboldi, P., Bolego, C., Kuhn, H., and Catapano, A. L. (2008). The 15-lipoxygenase-modified high density lipoproteins 3 fail to inhibit the TNF-alpha-induced inflammatory response in human endothelial cells. *J. Immunol.* 181, 2821–2830. doi:10.4049/jimmunol.181.4.2821.

Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., et al. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343–353. doi:10.1016/0092-8674(92)90362-g.

Pogribny, I. P., Ross, S. A., Wise, C., Pogribna, M., Jones, E. A., Tryndyak, V. P., et al. (2006). Irreversible global DNA hypomethylation as a key step in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency. *Mutat. Res.* 593, 80–87. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.028.

Popović, M., Smiljanić, K., Dobutović, B., Syrovets, T., Simmet, T., and Isenović, E. R. (2012). Thrombin and vascular inflammation. *Mol. Cell. Biochem.* 359, 301–313. doi:10.1007/s11010-011-1024-x.

Porsch-Ozcurumez, M., Langmann, T., Heimerl, S., Borsukova, H., Kaminski, W. E., Drobnik, W., et al. (2001). The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux. *J. Biol. Chem.* 276, 12427–12433. doi:10.1074/jbc.M100218200.

Postmus, I., Trompet, S., Deshmukh, H. A., Barnes, M. R., Li, X., Warren, H. R., et al. (2014). Pharmacogenetic meta-analysis of genome-wide association studies of LDL cholesterol response to statins. *Nat Commun* 5, 5068. doi:10.1038/ncomms6068.

Pownall, H. J., Pao, Q., and Massey, J. B. (1985). Acyl chain and headgroup specificity of human plasma lecithin:cholesterol acyltransferase. Separation of matrix and molecular specificities. *J. Biol. Chem.* 260, 2146–2152.

Quazi, F., and Molday, R. S. (2013). Differential phospholipid substrates and directional transport by ATP-binding cassette proteins ABCA1, ABCA7, and ABCA4 and disease-causing mutants. *J. Biol. Chem.* 288, 34414–34426. doi:10.1074/jbc.M113.508812.

Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., and Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 5, 927–946.

Ramirez, C. M., Dávalos, A., Goedeke, L., Salerno, A. G., Warrier, N., Cirera-Salinas, D., et al. (2011). MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2707–2714. doi:10.1161/ATVBAHA.111.232066.

Ramírez, C. M., Rotllan, N., Vlassov, A. V., Dávalos, A., Li, M., Goedeke, L., et al. (2013). Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ. Res.* 112, 1592–1601. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300626.

Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Yvan-Charvet, L., Welch, C., and Tall, A. R. (2006). Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1-/- bone marrow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2308–2315. doi:10.1161/01.ATV.0000242275.92915.43.

Ravelli, A. C., van der Meulen, J. H., Michels, R. P., Osmond, C., Barker, D. J., Hales, C. N., et al. (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351, 173–177. doi:10.1016/s0140-6736(97)07244-9.

Ravelli, A. C., van Der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., and Bleker, O. P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 811–816. doi:10.1093/ajcn/70.5.811.

Rayner, K. J., and Moore, K. J. (2014). MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function. *Circ. Res.* 114, 183–192. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300645.

Rayner, K. J., Sheedy, F. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., Temel, R. E., Parathath, S., et al. (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 121, 2921–2931. doi:10.1172/JCI57275.

Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M. L., Tamehiro, N., et al. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 328, 1570–1573. doi:10.1126/science.1189862.

Régnier, M., Polizzi, A., Guillou, H., and Loiseau, N. (2019). Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie* 159, 9–22. doi:10.1016/j.biochi.2018.07.021.

Remaley, A. T., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Neufeld, E. B., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., et al. (2001). Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCAI transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 818–823. doi:10.1006/bbrc.2000.4219.

Riggs, A. D., Russo, V. E., and Martienssen, R. A. (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., and Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12610–12615. doi:10.1073/pnas.94.23.12610.

Rohatgi, A., Khera, A., Berry, J. D., Givens, E. G., Ayers, C. R., Wedin, K. E., et al. (2014). HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 371, 2383–2393. doi:10.1056/NEJMoa1409065.

Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., Dayeh, T., Hall, E., Olsson, A. H., et al. (2013). A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet.* 9, e1003572. doi:10.1371/journal.pgen.1003572.

Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Ansell, B. J., Barter, P., Chapman, M. J., Heinecke, J. W., et al. (2016). Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 13, 48–60. doi:10.1038/nrcardio.2015.124.

Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Chapman, M. J., Fazio, S., Hussain, M. M., Kontush, A., et al. (2011). HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin. Chem.* 57, 392–410. doi:10.1373/clinchem.2010.155333.

Roshan, M. H. K., Tambo, A., and Pace, N. P. (2016). The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Inflam* 2016, 1532832. doi:10.1155/2016/1532832.

Rossetto, D., Avvakumov, N., and Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7, 1098–1108. doi:10.4161/epi.21975.

Rouhani, N., Young, E., Chatterjee, C., and Sparks, D. L. (2008). HDL composition regulates displacement of cell surface-bound hepatic lipase. *Lipids* 43, 793–804. doi:10.1007/s11745-008-3214-1.

Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., et al. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* 22, 352–355. doi:10.1038/11921.

Rye, K. A., Hime, N. J., and Barter, P. J. (1996). The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 271, 4243–4250. doi:10.1074/jbc.271.8.4243.

Rye, K.-A., Bursill, C. A., Lambert, G., Tabet, F., and Barter, P. J. (2009). The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 50, S195–S200. doi:10.1194/jlr.R800034-JLR200.

Sabatine, M. S. (2019). PCSK9 inhibitors: clinical evidence and implementation. *Nat Rev Cardiol* 16, 155–165. doi:10.1038/s41569-018-0107-8.

Sabol, S. L., Brewer, H. B., and Santamarina-Fojo, S. (2005). The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J. Lipid Res.* 46, 2151–2167. doi:10.1194/jlr.M500080-JLR200.

Saito, H., Arimoto, I., Tanaka, M., Sasaki, T., Tanimoto, T., Okada, S., et al. (2000). Inhibition of lipoprotein lipase activity by sphingomyelin: role of membrane surface structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 312–320. doi:10.1016/s1388-1981(00)00071-8.

Samyn, H., Moerland, M., van Gent, T., van Haperen, R., Grosveld, F., van Tol, A., et al. (2009). Elevation of systemic PLTP, but not macrophage-PLTP, impairs macrophage reverse cholesterol transport in transgenic mice. *Atherosclerosis* 204, 429–434. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.020.

Sankaranarayanan, S., Oram, J. F., Asztalos, B. F., Vaughan, A. M., Lund-Katz, S., Adorni, M. P., et al. (2009). Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 50, 275–284. doi:10.1194/jlr.M800362-JLR200.

Savary, S., Denizot, F., Luciani, M., Mattei, M., and Chimini, G. (1996). Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to Drosophila white gene. *Mamm. Genome* 7, 673–676.

Sayols-Baixeras, S., Hernáez, A., Subirana, I., Lluis-Ganella, C., Muñoz, D., Fitó, M., et al. (2017). DNA Methylation and High-Density Lipoprotein Functionality-Brief Report: The REGICOR Study (Registre Gironi del Cor). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 567–569. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308831.

Schaap, F. G., Rensen, P. C. N., Voshol, P. J., Vrins, C., van der Vliet, H. N., Chamuleau, R. A. F. M., et al. (2004). ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 279, 27941–27947. doi:10.1074/jbc.M403240200.

Schmidt, A., Geigenmüller, S., Völker, W., and Buddecke, E. (2006). The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt -->NF-kappaB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic Res. Cardiol.* 101, 109–116. doi:10.1007/s00395-005-0582-z.

Schou, J., Frikke-Schmidt, R., Kardassis, D., Thymiakou, E., Nordestgaard, B. G., Jensen, G., et al. (2012). Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 506–515. doi:10.1161/ATVBAHA.111.234872.

Schwartz, G. G., Olsson, A. G., Abt, M., Ballantyne, C. M., Barter, P. J., Brumm, J., et al. (2012). Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 367, 2089–2099. doi:10.1056/NEJMoa1206797.

Seok, S., Kim, Y.-C., Byun, S., Choi, S., Xiao, Z., Iwamori, N., et al. (2018). Fasting-induced JMJD3 histone demethylase epigenetically activates mitochondrial fatty acid β-oxidation. *J. Clin. Invest.* 128, 3144–3159. doi:10.1172/JCI97736.

Shah, P. K., Yano, J., Reyes, O., Chyu, K. Y., Kaul, S., Bisgaier, C. L., et al. (2001). High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation* 103, 3047–3050. doi:10.1161/hc2501.092494.

Shaw, J. A., Bobik, A., Murphy, A., Kanellakis, P., Blombery, P., Mukhamedova, N., et al. (2008). Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ. Res.* 103, 1084–1091. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182063.

Shelly, L., Royer, L., Sand, T., Jensen, H., and Luo, Y. (2008). Phospholipid transfer protein deficiency ameliorates diet-induced hypercholesterolemia and inflammation in mice. *J. Lipid Res.* 49, 773–781. doi:10.1194/jlr.M700336-JLR200.

Shirasaki, T., Honda, M., Shimakami, T., Horii, R., Yamashita, T., Sakai, Y., et al. (2013). MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J. Virol.* 87, 5270–5286. doi:10.1128/JVI.03022-12.

Shivakumar, M., Lee, Y., Bang, L., Garg, T., Sohn, K.-A., and Kim, D. (2017). Identification of epigenetic interactions between miRNA and DNA methylation associated with gene expression as potential prognostic markers in bladder cancer. *BMC Med Genomics* 10, 30. doi:10.1186/s12920-017-0269-y.

Shrestha, S., Wu, B. J., Guiney, L., Barter, P. J., and Rye, K.-A. (2018). Cholesteryl ester transfer protein and its inhibitors. *J. Lipid Res.* 59, 772–783. doi:10.1194/jlr.R082735.

Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X., and Tall, A. R. (2001). High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J. Biol. Chem.* 276, 25287–25293. doi:10.1074/jbc.M101726200.

Simic, B., Hermann, M., Shaw, S. G., Bigler, L., Stalder, U., Dörries, C., et al. (2012). Torcetrapib impairs endothelial function in hypertension. *Eur. Heart J.* 33, 1615–1624. doi:10.1093/eurheartj/ehr348.

Smith, J. B. (1981). Prostaglandins and platelet aggregation. *Acta Med. Scand. Suppl.* 651, 91–99. doi:10.1111/j.0954-6820.1981.tb03638.x.

Smith, J. D., Le Goff, W., Settle, M., Brubaker, G., Waelde, C., Horwitz, A., et al. (2004). ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 45, 635–644. doi:10.1194/jlr.M300336-JLR200.

Smoak, K. A., Aloor, J. J., Madenspacher, J., Merrick, B. A., Collins, J. B., Zhu, X., et al. (2010). Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation. *Cell Metab.* 11, 493–502. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.006.

Sripathy, S. P., Stevens, J., and Schultz, D. C. (2006). The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8623–8638. doi:10.1128/MCB.00487-06.

Stace, C. L., and Ktistakis, N. T. (2006). Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 913–926. doi:10.1016/j.bbalip.2006.03.006.

Ståhlman, M., Fagerberg, B., Adiels, M., Ekroos, K., Chapman, J. M., Kontush, A., et al. (2013). Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: impact on small HDL particles. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1609–1617. doi:10.1016/j.bbalip.2013.07.009.

Stancu, C., and Sima, A. (2001). Statins: mechanism of action and effects. *J. Cell. Mol. Med.* 5, 378–387. doi:10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x.

Stegemann, C., Drozdov, I., Shalhoub, J., Humphries, J., Ladroue, C., Didangelos, A., et al. (2011). Comparative lipidomics profiling of human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet* 4, 232–242. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.959098.

Stegemann, C., Pechlaner, R., Willeit, P., Langley, S. R., Mangino, M., Mayr, U., et al. (2014). Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation* 129, 1821–1831. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002500.

Straughen, J. K., Sipahi, L., Uddin, M., Misra, D. P., and Misra, V. K. (2015). Racial differences in IGF1 methylation and birth weight. *Clin Epigenetics* 7, 47. doi:10.1186/s13148-015-0080-6.

Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (1997). HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2158–2166.

Sukhorukov, V., Gudelj, I., Pučić-Baković, M., Zakiev, E., Orekhov, A., Kontush, A., et al. (2019). Glycosylation of human plasma lipoproteins reveals a high level of diversity, which directly impacts their functional properties. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864, 643–653. doi:10.1016/j.bbalip.2019.01.005.

Summerhill, V. I., Grechko, A. V., Yet, S.-F., Sobenin, I. A., and Orekhov, A. N. (2019). The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 20. doi:10.3390/ijms20143561.

Suzuki, M., Pritchard, D. K., Becker, L., Hoofnagle, A. N., Tanimura, N., Bammler, T. K., et al. (2010). High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. *Circulation* 122, 1919–1927. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.961193.

Tabas, I., and Lichtman, A. H. (2017). Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity* 47, 621–634. doi:10.1016/j.immuni.2017.09.008.

Tabet, F., Vickers, K. C., Cuesta Torres, L. F., Wiese, C. B., Shoucri, B. M., Lambert, G., et al. (2014). HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat Commun* 5, 3292. doi:10.1038/ncomms4292.

Takahashi, Y., and Smith, J. D. (1999). Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11358–11363. doi:10.1073/pnas.96.20.11358.

Tall, A. R., and Rader, D. J. (2018). Trials and Tribulations of CETP Inhibitors. *Circ. Res.* 122, 106–112. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311978.

Tang, C., Liu, Y., Kessler, P. S., Vaughan, A. M., and Oram, J. F. (2009). The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 32336–32343. doi:10.1074/jbc.M109.047472.

Tardif, J.-C., Ballantyne, C. M., Barter, P., Dasseux, J.-L., Fayad, Z. A., Guertin, M.-C., et al. (2014). Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *Eur. Heart J.* 35, 3277–3286. doi:10.1093/eurheartj/ehu171.

Tardif, J.-C., Grégoire, J., L'Allier, P. L., Ibrahim, R., Lespérance, J., Heinonen, T. M., et al. (2007). Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 297, 1675–1682. doi:10.1001/jama.297.15.jpc70004.

Tardif, J.-C., Rhéaume, E., Lemieux Perreault, L.-P., Grégoire, J. C., Feroz Zada, Y., Asselin, G., et al. (2015). Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib. *Circ Cardiovasc Genet* 8, 372–382. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000663.

Tardy, C., Goffinet, M., Boubekeur, N., Ackermann, R., Sy, G., Bluteau, A., et al. (2014). CER-001, a HDL-mimetic, stimulates the reverse lipid transport and atherosclerosis regression in high cholesterol diet-fed LDL-receptor deficient mice. *Atherosclerosis* 232, 110–118. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.018.

Tarling, E. J., Bojanic, D. D., Tangirala, R. K., Wang, X., Lovgren-Sandblom, A., Lusis, A. J., et al. (2010). Impaired development of atherosclerosis in Abcg1-/- Apoe-/- mice: identification of specific oxysterols that both accumulate in Abcg1-/- Apoe-/- tissues and induce apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1174–1180. doi:10.1161/ATVBAHA.110.205617.

Tarling, E. J., and Edwards, P. A. (2011). ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19719–19724. doi:10.1073/pnas.1113021108.

Tatematsu, S., Francis, S. A., Natarajan, P., Rader, D. J., Saghatelian, A., Brown, J. D., et al. (2013). Endothelial lipase is a critical determinant of high-density lipoprotein-stimulated sphingosine 1-phosphate-dependent signaling in vascular endothelium.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33, 1788–1794. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301300.

Teh, E. M., Dolphin, P. J., Breckenridge, W. C., and Tan, M. H. (1998). Human plasma CETP deficiency: identification of a novel mutation in exon 9 of the CETP gene in a Caucasian subject from North America. *J. Lipid Res.* 39, 442–456.

Terasaka, N., Wang, N., Yvan-Charvet, L., and Tall, A. R. (2007). High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15093–15098. doi:10.1073/pnas.0704602104.

Terasaka, N., Westerterp, M., Koetsveld, J., Fernández-Hernando, C., Yvan-Charvet, L., Wang, N., et al. (2010). ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2219–2225. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213215.

Terry, M. B., Ferris, J. S., Pilsner, R., Flom, J. D., Tehranifar, P., Santella, R. M., et al. (2008). Genomic DNA methylation among women in a multiethnic New York City birth cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 2306–2310. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0312.

Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Dhanasekaran, P., de la Llera-Moya, M., Connelly, M. A., Williams, D. L., et al. (2004). Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. *J. Biol. Chem.* 279, 12448–12455. doi:10.1074/jbc.M311718200.

Timmins, J. M., Lee, J.-Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., et al. (2005). Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Invest.* 115, 1333–1342. doi:10.1172/JCI23915.

Tobi, E. W., Slieker, R. C., Luijk, R., Dekkers, K. F., Stein, A. D., Xu, K. M., et al. (2018). DNA methylation as a mediator of the association between prenatal adversity and risk factors for metabolic disease in adulthood. *Sci Adv* 4, eaao4364. doi:10.1126/sciadv.aao4364.

Tobi, E. W., Slieker, R. C., Stein, A. D., Suchiman, H. E. D., Slagboom, P. E., van Zwet, E. W., et al. (2015). Early gestation as the critical time-window for changes in the prenatal environment to affect the adult human blood methylome. *Int J Epidemiol* 44, 1211–1223. doi:10.1093/ije/dyv043.

Tölle, M., Pawlak, A., Schuchardt, M., Kawamura, A., Tietge, U. J., Lorkowski, S., et al. (2008). HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1542–1548. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161042.

Tricoci, P., D'Andrea, D. M., Gurbel, P. A., Yao, Z., Cuchel, M., Winston, B., et al. (2015). Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With

Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *J Am Heart Assoc* 4, e002171. doi:10.1161/JAHA.115.002171.

Trogan, E., Feig, J. E., Dogan, S., Rothblat, G. H., Angeli, V., Tacke, F., et al. (2006). Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3781–3786. doi:10.1073/pnas.0511043103.

Urrutia, R. (2003). KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol.* 4, 231. doi:10.1186/gb-2003-4-10-231.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., and Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. doi:10.1038/ncb1596.

Van den Bossche, J., Neele, A. E., Hoeksema, M. A., de Heij, F., Boshuizen, M. C. S., van der Velden, S., et al. (2014). Inhibiting epigenetic enzymes to improve atherogenic macrophage functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 455, 396–402. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.029.

van der Stoep, M., Korporaal, S. J. A., and Van Eck, M. (2014). High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. *Cardiovasc. Res.* 103, 362–371. doi:10.1093/cvr/cvu137.

van der Vorst, E. P. C., Theodorou, K., Wu, Y., Hoeksema, M. A., Goossens, P., Bursill, C. A., et al. (2017). High-Density Lipoproteins Exert Pro-inflammatory Effects on Macrophages via Passive Cholesterol Depletion and PKC-NF-κB/STAT1-IRF1 Signaling. *Cell Metab.* 25, 197–207. doi:10.1016/j.cmet.2016.10.013.

van Haperen, R., van Tol, A., Vermeulen, P., Jauhiainen, M., van Gent, T., van den Berg, P., et al. (2000). Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1082–1088. doi:10.1161/01.atv.20.4.1082.

Vaughan, A. M., and Oram, J. F. (2003). ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J. Lipid Res.* 44, 1373–1380. doi:10.1194/jlr.M300078-JLR200.

Vaughan, A. M., and Oram, J. F. (2005). ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* 280, 30150–30157. doi:10.1074/jbc.M505368200.

Vaughan, A. M., and Oram, J. F. (2006). ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* 47, 2433–2443. doi:10.1194/jlr.M600218-JLR200.

Vedhachalam, C., Duong, P. T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., et al. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 282, 25123–25130. doi:10.1074/jbc.M704590200.

Vergeer, M., Boekholdt, S. M., Sandhu, M. S., Ricketts, S. L., Wareham, N. J., Brown, M. J., et al. (2010). Genetic variation at the phospholipid transfer protein locus affects its activity and high-density lipoprotein size and is a novel marker of cardiovascular disease susceptibility. *Circulation* 122, 470–477. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.912519.

Vergeer, M., Korporaal, S. J. A., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G. K., et al. (2011). Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N. Engl. J. Med.* 364, 136–145. doi:10.1056/NEJMoa0907687.

Vickers, K. C., Landstreet, S. R., Levin, M. G., Shoucri, B. M., Toth, C. L., Taylor, R. C., et al. (2014). MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 14518–14523. doi:10.1073/pnas.1215767111.

Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., and Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–433. doi:10.1038/ncb2210.

Vieu, C., Jaspard, B., Barbaras, R., Manent, J., Chap, H., Perret, B., et al. (1996). Identification and quantification of diacylglycerols in HDL and accessibility to lipase. *J. Lipid Res.* 37, 1153–1161.

Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D., and Farb, A. (2002). Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 15, 439–446.

Volkmar, M., Dedeurwaerder, S., Cunha, D. A., Ndlovu, M. N., Defrance, M., Deplus, R., et al. (2012). DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J.* 31, 1405–1426. doi:10.1038/emboj.2011.503.

von Eckardstein, A., and Rohrer, L. (2009). Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 197–205. doi:10.1097/MOL.0b013e32832afd63.

Vuletic, S., Dong, W., Wolfbauer, G., Tang, C., and Albers, J. J. (2011). PLTP regulates STAT3 and NFκB in differentiated THP1 cells and human monocyte-derived macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1917–1924. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.013.

Wagner, S., Hess, M. A., Ormonde-Hanson, P., Malandro, J., Hu, H., Chen, M., et al. (2000). A broad role for the zinc finger protein ZNF202 in human lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 275, 15685–15690. doi:10.1074/jbc.M910152199.

Wahl, S., Drong, A., Lehne, B., Loh, M., Scott, W. R., Kunze, S., et al. (2017). Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature* 541, 81–86. doi:10.1038/nature20784.

Wang, G., Luo, X., Wang, J., Wan, J., Xia, S., Zhu, H., et al. (2018). MeDReaders: a database for transcription factors that bind to methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 46, D146–D151. doi:10.1093/nar/gkx1096.

Wang, L., Jia, X.-J., Jiang, H.-J., Du, Y., Yang, F., Si, S.-Y., et al. (2013). MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through

posttranscriptional inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1956–1964. doi:10.1128/MCB.01580-12.

Wang, M.-D., Franklin, V., and Marcel, Y. L. (2007). In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1837–1842. doi:10.1161/ATVBAHA.107.146068.

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A. R. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9774–9779. doi:10.1073/pnas.0403506101.

Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A. R. (2006). LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1310–1316. doi:10.1161/01.ATV.0000218998.75963.02.

Whitlock, M. E., Swenson, T. L., Ramakrishnan, R., Leonard, M. T., Marcel, Y. L., Milne, R. W., et al. (1989). Monoclonal antibody inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity in the rabbit. Effects on lipoprotein composition and high density lipoprotein cholesteryl ester metabolism. *J. Clin. Invest.* 84, 129–137. doi:10.1172/JCI114132.

Wiesner, P., Leidl, K., Boettcher, A., Schmitz, G., and Liebisch, G. (2009). Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 50, 574–585. doi:10.1194/jlr.D800028-JLR200.

Wu, B. J., Chen, K., Shrestha, S., Ong, K. L., Barter, P. J., and Rye, K.-A. (2013). High-density lipoproteins inhibit vascular endothelial inflammation by increasing 3β-hydroxysteroid-Δ24 reductase expression and inducing heme oxygenase-1. *Circ. Res.* 112, 278–288. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300104.

Wu, H., and Zhang, Y. (2014). Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156, 45–68. doi:10.1016/j.cell.2013.12.019.

Xu, M., Zhou, H., Tan, K. C. B., Guo, R., Shiu, S. W. M., and Wong, Y. (2009). ABCG1 mediated oxidized LDL-derived oxysterol efflux from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 1349–1354. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.152.

Xu, N., and Dahlbäck, B. (1999). A novel human apolipoprotein (apoM). *J. Biol. Chem.* 274, 31286–31290. doi:10.1074/jbc.274.44.31286.

Xu, Y., Wang, W., Zhang, L., Qi, L.-P., Li, L.-Y., Chen, L.-F., et al. (2011). A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis* 219, 648–654. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.043.

Xu, Y., Xu, Y., Zhu, Y., Sun, H., Juguilon, C., Li, F., et al. (2019). Macrophage miR-34a Is a Key Regulator of Cholesterol Efflux and Atherosclerosis. *Molecular Therapy* 0. doi:10.1016/j.ymthe.2019.09.008.

Yamauchi, Y., Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., and Yokoyama, S. (2003). Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding

cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *J. Biol. Chem.* 278, 47890–47897. doi:10.1074/jbc.M306258200.

Yan, J., Zierath, J. R., and Barrès, R. (2011a). Evidence for non-CpG methylation in mammals. *Exp. Cell Res.* 317, 2555–2561. doi:10.1016/j.yexcr.2011.08.019.

Yan, X.-J., Xu, J., Gu, Z.-H., Pan, C.-M., Lu, G., Shen, Y., et al. (2011b). Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat. Genet.* 43, 309–315. doi:10.1038/ng.788.

Yancey, P. G., de la Llera-Moya, M., Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S. M., Connelly, M. A., et al. (2000). High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.* 275, 36596–36604. doi:10.1074/jbc.M006924200.

Yeagle, P. L. (2014). Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1548–1559. doi:10.1016/j.bbamem.2013.11.009.

Yeboah, J., Folsom, A. R., Burke, G. L., Johnson, C., Polak, J. F., Post, W., et al. (2009). Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation* 120, 502–509. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.864801.

Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., et al. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science* 356. doi:10.1126/science.aaj2239.

Young, E. K., Chatterjee, C., and Sparks, D. L. (2009). HDL-ApoE content regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans. *Am. J. Pathol.* 175, 448–457. doi:10.2353/ajpath.2009.080989.

Yuhanna, I. S., Zhu, Y., Cox, B. E., Hahner, L. D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., et al. (2001). High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 7, 853–857. doi:10.1038/89986.

Yvan-Charvet, L., Pagler, T. A., Seimon, T. A., Thorp, E., Welch, C. L., Witztum, J. L., et al. (2010a). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. *Circ. Res.* 106, 1861–1869. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.217281.

Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E. L., Avagyan, S., Siry, R. L., Han, S., et al. (2010b). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science* 328, 1689–1693. doi:10.1126/science.1189731.

Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., et al. (2007). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3900–3908. doi:10.1172/JCI33372.

Yvan-Charvet, L., Welch, C., Pagler, T. A., Ranalletta, M., Lamkanfi, M., Han, S., et al. (2008). Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages:

free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* 118, 1837–1847. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.793869.

Zaghlool, S. B., Al-Shafai, M., Al Muftah, W. A., Kumar, P., Falchi, M., and Suhre, K. (2015). Association of DNA methylation with age, gender, and smoking in an Arab population. *Clin Epigenetics* 7, 6. doi:10.1186/s13148-014-0040-6.

Zakiev, E., Ma, F., Rached, F., Lhomme, M., Sukhorukov, V., Serrano, C. V., et al. (2018). Unsaturated, low-abundant species of HDL (Lyso)phospholipids are most affected by ST segment elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis* 275, e56–e57. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.152.

Zakiev, E., Rached, F., Lhomme, M., Darabi-Amin, M., Ponnaiah, M., Becker, P. H., et al. (2019). Distinct phospholipid and sphingolipid species are linked to altered HDL function in apolipoprotein A-I deficiency. *J Clin Lipidol* 13, 468-480.e8. doi:10.1016/j.jacl.2019.02.004.

Zannis, V. I., Koukos, G., Drosatos, K., Vezeridis, A., Zanni, E. E., Kypreos, K. E., et al. (2008). Discrete roles of apoA-I and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models. *Ann. Med.* 40 Suppl 1, 14–28. doi:10.1080/07853890701687219.

Zanoni, P., Khetarpal, S. A., Larach, D. B., Hancock-Cerutti, W. F., Millar, J. S., Cuchel, M., et al. (2016). Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease. *Science* 351, 1166–1171. doi:10.1126/science.aad3517.

Zeilinger, S., Kühnel, B., Klopp, N., Baurecht, H., Kleinschmidt, A., Gieger, C., et al. (2013). Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS ONE* 8, e63812. doi:10.1371/journal.pone.0063812.

Zhang, D., Cheng, L., Badner, J. A., Chen, C., Chen, Q., Luo, W., et al. (2010). Genetic control of individual differences in gene-specific methylation in human brain. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 411–419. doi:10.1016/j.ajhg.2010.02.005.

Zhang, F. F., Cardarelli, R., Carroll, J., Fulda, K. G., Kaur, M., Gonzalez, K., et al. (2011). Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics* 6, 623–629. doi:10.4161/epi.6.5.15335.

Zhang, L., Yan, F., Zhang, S., Lei, D., Charles, M. A., Cavigiolio, G., et al. (2012). Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nat. Chem. Biol.* 8, 342–349. doi:10.1038/nchembio.796.

Zhang, M., Charles, R., Tong, H., Zhang, L., Patel, M., Wang, F., et al. (2015). HDL surface lipids mediate CETP binding as revealed by electron microscopy and molecular dynamics simulation. *Sci Rep* 5, 8741. doi:10.1038/srep08741.

Zhang, M., Wu, J.-F., Chen, W.-J., Tang, S.-L., Mo, Z.-C., Tang, Y.-Y., et al. (2014). MicroRNA-27a/b regulates cellular cholesterol efflux, influx and esterification/hydrolysis in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 234, 54–64. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.008.

Zhang, N. (2015). Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Anim Nutr* 1, 144–151. doi:10.1016/j.aninu.2015.09.002.

Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468–471. doi:10.1126/science.1411543.

Zhang, Y., Bai, L., Shi, M., Lu, H., Wu, Y., Tu, J., et al. (2017). Features and risk factors of carotid atherosclerosis in a population with high stroke incidence in China. *Oncotarget* 8, 57477–57488. doi:10.18632/oncotarget.15415.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360. doi:10.1101/gad.927301.

Zhao, G.-J., Yin, K., Fu, Y.-C., and Tang, C.-K. (2012). The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol. Med.* 18, 149–158. doi:10.2119/molmed.2011.00183.

Zhao, Y., Thorngate, F. E., Weisgraber, K. H., Williams, D. L., and Parks, J. S. (2005). Apolipoprotein E is the major physiological activator of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on apolipoprotein B lipoproteins. *Biochemistry* 44, 1013–1025. doi:10.1021/bi0481489.