



**HAL**  
open science

# Contribution respective des récepteurs P2Y13 et SR-BI dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose

Sara Espinosa Delgado

► **To cite this version:**

Sara Espinosa Delgado. Contribution respective des récepteurs P2Y13 et SR-BI dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30053 . tel-03667325

**HAL Id: tel-03667325**

**<https://theses.hal.science/tel-03667325v1>**

Submitted on 13 May 2022

**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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Sara ESPINOSA DELGADO**

le jeudi 12 janvier 2017

**Titre :**

Contribution respective des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI  
dans le métabolisme du HDL-C  
et le développement de l'athérosclérose

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Physiopathologie

**Unité de recherche :**

INSERM U1048 - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires - équipe 5

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr Laurent MARTINEZ et Dr Laeticia LICHTENSTEIN

**Jury :**

Pr Sophie LESTAVEL - rapporteur

Pr Gilles LAMBERT - rapporteur

Pr David MASSON - rapporteur

Pr Bertrand PERRET - examinateur

Dr Laurent MARTINEZ - directeur de thèse

Dr Laeticia LICHTENSTEIN - directeur de thèse



A mes parents, mon frère et ma sœur,



## REMERCIEMENTS

**Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury de thèse.**

Monsieur le **Professeur Bertrand Perret** merci de m'avoir fait l'honneur de présider ma soutenance de thèse. Je tiens également à vous remercier pour votre soutien et votre grande disponibilité durant la finalisation de l'écriture de ce manuscrit.

Madame le **Professeur Sophie Lestavel**, Messieurs le **Professeur Gilles Lambert** et le **Professeur David Masson**, je suis reconnaissante de votre investissement dans la lecture de ce manuscrit de thèse et je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le **Docteur Laetitia Lichtenstein**, merci d'avoir supervisé ce travail. Je te remercie pour le temps conséquent que tu m'as consacré et pour ton importante implication dans mon projet de thèse. Merci pour le partage de tes connaissances scientifiques et techniques, ainsi que pour tes idées et tes conseils. Je te remercie également pour tes encouragements, ta patience et ton aide considérable. Finalement merci pour ta disponibilité durant l'écriture de ce manuscrit.

Monsieur le **Docteur Laurent Martinez**, merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et d'avoir supervisé ce travail. Merci également pour les conseils qui nous ont permis d'avancer.

Je voudrais également remercier tous les membres de l'équipe 5 de l'I2MC pour leur gentillesse et leur soutien. J'ai eu la chance durant ces années de thèse de rencontrer des personnes extraordinaires.

**Véro**, vraiment une belle personne, sincère et agréable, qui restera dans un petit coin de mon cœur. Merci pour toutes les journées chargées que tu as su rendre plus faciles grâce à une tablette de chocolat. Ta présence et même tes gâteaux ont manqué au labo quand tu es partie. Je pense que si tu recevais de l'argent pour toutes les minutes que tu as consacrées à faire des corrections pour les personnes que tu apprécies, tu n'aurais plus besoin de jouer au loto avec les filles pour devenir milliardaire. Véro, 'l'ange de l'orthographe'. Je crois que tu as fini par connaître ma thèse par cœur... Je ne pourrai jamais assez te remercier pour cela, mais bon j'essayerai quand même avec de la Tequila ('jeje').

**Steph**, on a passé des moments agréables, d'autres presque gênants ('ups!..) mais qui ont fini par devenir drôles et qui, je pense, resteront dans nos mémoires. Merci pour ton écoute et nos fous rires, je crois que tu sais que tu es une personne que j'apprécie beaucoup.

**Nicole**, merci pour tous tes conseils de maman. Je garde un très bon souvenir de toutes nos discussions au labo, tu fais partie des personnes qui rendaient les journées au labo agréables.

**Michel**, ce fut agréable de t'avoir dans le laboratoire, de discuter et de rigoler avec toi.

**Souad**, un grand merci pour toutes les fois où tu m'as écoutée, où tu m'as encouragée et soutenue. A plusieurs moments tu as été d'une grande aide morale, et je ne l'oublierai jamais. Merci pour les bons moments que nous avons partagés, les repas, les goûters, les pauses café, et les petites discussions de couloir.

**Thibaut**, merci beaucoup pour ton aide dans ce projet, j'en suis très reconnaissante. Je te souhaite le meilleur dans ton avenir professionnel.

**Muriel**, je te remercie pour ton soutien.

**Aurélie, Annelise, Céline, Ashraf**, merci pour vos encouragements.

**Mouin** "de los Monteros", tu es vraiment une personne avec un très grand cœur, un grand merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour toutes tes attentions, pour ton amitié et j'espère qu'on continuera de rigoler ensemble pendant les années à venir.

**Rana**, ("Rananoush") la reine du thé de l'équipe 5 et 11, toujours à nous faire rigoler avec son esprit d'enfant. Un immense merci puisque tu as toujours été là pour m'écouter, m'encourager, me conseiller. Ton soutien moral fut une immense aide durant la fin de ma thèse.

**Les Bee Gees, Adrianos, Gui, StevEn**, vous avez sans doute rendu mes journées au labo vraiment plus agréables. Merci pour tous les fous rires et les coups de mains. J'espère qu'on continuera à se faire des petites soirées et que Gui continuera à m'apprendre à danser la salsa (jaja). Je vous apprécie les gars.

**PA**, je suis très contente de t'avoir rencontré, ton amitié a toujours beaucoup compté pour moi.

**Julie, Cécile, Colin, Nizar, Natalia, Audrey, Abdul**, merci pour vos encouragements, et merci pour les bonnes soirées passés ensemble.

**Sami**, tu es vraiment une personne exceptionnelle, j'ai eu de la chance de rencontrer quelqu'un comme toi, un grand merci pour tout.

**Estelle**, merci pour tes conseils, je te souhaite une bonne continuation.

Aux personnes de la plateforme lipidomique (**Justine, Pauline** et notamment **Fabien**), merci pour toute votre aide et votre accueil agréable durant toutes ces journées d'extraction de lipides.



Aux personnes de la plateforme animalerie, et notamment à **Paolo**, merci pour votre aide et pour les bons moments passés.

**Madjid**, merci pour tout, je suis contente d'avoir fait ta connaissance.

Je tiens également à remercier **Jean François Arnal**, pour son soutien et ses encouragements. Ce fut un plaisir pour moi de faire votre connaissance.

Merci à tous mes amis du Mexique et d'ici, pour les encouragements, pour tous les bons moments passés.

**Laurène**, merci pour ton soutien notamment à la fin de cette thèse et pour ton amitié inconditionnelle.

**Mario**, merci beaucoup pour ton écoute, ton soutien et tous les bons moments partagés.

**Xavier**, 'mi colloco', ça m'a fait du bien que tu arrives durant mes derniers mois de thèse. Merci pour ta compréhension durant cette période, pour les bons petits repas, pour ton écoute et tous ces moments agréables.

Je souhaite adresser un remerciement spécial à **Daniel** pour son écoute, ses encouragements, ses conseils et sa patience.

**Liliane**, ou 'madamita', merci puisque c'est en grande partie grâce à vous que je me retrouve actuellement en France. Merci beaucoup pour votre aide et votre soutien inconditionnel, vous êtes comme une deuxième mamie pour moi.

Enfin un grand merci à mes parents, **Lourdes** et **Ricardo**, mon frère **Isaac** et ma sœur **Sofia** sans lesquels je ne serai pas venue en France faire mes études et réaliser cette thèse. Merci pour votre écoute, votre soutien et vos encouragements, et notamment merci pour votre amour qui compte énormément pour moi. Gracias por su apoyo y su amor sin en cual nada de esto hubiera sido posible, los amo. **Sofia**, ma meilleure amie, heureusement tu es arrivée en France me rejoindre dans cette aventure, c'est un des plus beaux cadeaux que m'a fait la vie. Los amo.

## Table des matières

<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>3</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>13</b>
<b>CHAPITRE I :</b> .....	<b>15</b>
<b>LES LIPOPROTÉINES DE HAUTE DENSITÉ</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Classification et structure.</b> .....	<b>18</b>
1.1. Classification. ....	18
1.2. Composition.....	20
1.2.1. Protéome. ....	21
1.2.2. Lipidome. ....	22
1.2.3. Métabolome. ....	22
1.2.4. Transcriptome. ....	23
<b>2. Les HDL et leurs fonctions.</b> .....	<b>23</b>
2.1. Propriétés pléiotropes des HDL. ....	23
2.1.1. Activité antioxydante. ....	25
2.1.2. Activité anti-inflammatoire. ....	26
2.1.3. Activités protectrices des HDL sur l'endothélium. ....	27
2.1.4. Propriétés antithrombotiques. ....	30
2.2. Le Transport Retour du Cholestérol (RCT). ....	33
2.2.1. La biogénèse des HDL : efflux cellulaire du cholestérol et remodelage plasmatique. ....	33
2.2.1.1. Lipidation de l'apoA-I et formation des particules HDL $\alpha$ : rôle de ABCA1. ....	33
2.2.1.2. Maturation et remodelage des HDL. ....	36
2.2.2. Captation hépatique du HDL-C : voies SR-BI et Ecto-F <sub>1</sub> -ATPase/P2Y <sub>13</sub> . ....	40
2.2.3. L'Élimination biliaire du cholestérol. ....	42
2.2.3.1. La biosynthèse des acides biliaires. ....	43
2.2.3.2. Transport hépato-biliaire des acides biliaires. ....	44
2.2.3.3. Transport hépato-biliaire du cholestérol. ....	45
2.2.3.4. Transport hépato-biliaire des phospholipides. ....	45
2.2.3.5. Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires. ....	46
2.2.4. Le transport intestinal du cholestérol. ....	48
2.2.4.1. L'absorption intestinale du cholestérol. ....	48
2.2.4.2. Excrétion Trans-intestinale du Cholestérol : TICE. ....	50
<b>CHAPITRE II :</b> .....	<b>57</b>
<b>CAPTATION HÉPATIQUE DES HDL PAR LES VOIES SR-BI ET ECTO-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub></b> .....	<b>57</b>
<b>1. Voie SR-BI</b> .....	<b>58</b>
1.1. Recherche fondamentale : Fonctions, mécanismes moléculaires impliqués et régulation... 58	
1.1.1. Description du récepteur SR-BI et ses fonctions. ....	58
1.1.2. Mécanisme moléculaire : Captation sélective du cholestérol estérifié. ....	60
1.1.3. Régulation de l'expression de SR-BI. ....	61
1.1.3.1. Régulation transcriptionnelle. ....	61
1.1.3.2. Régulation post-traductionnelle. ....	62
1.2. Rôles de SR-BI : l'apport des modèles animaux. ....	63
1.2.1. Invalidation ubiquitaire de SR-BI. ....	63
1.2.2. Invalidation ou surexpression de SR-BI spécifiquement au niveau du foie. ....	64

1.2.3. Invalidation de SR-BI dans le foie dans un modèle de souris exprimant la CETP.....	65
1.3. Variants nucléotidiques du récepteur SR-BI chez l'homme.....	67
1.3.1. Mutations de SR-BI. ....	67
1.3.2. Polymorphismes de SR-BI. ....	69
1.4. Perspectives thérapeutiques. ....	70
<b>2. Voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>.....</b>	<b>71</b>
2.1. Découverte et mécanismes moléculaires impliqués. ....	71
2.1.1. Rôle de la voie de l'ecto-F <sub>1</sub> -ATPase / P2Y <sub>13</sub> dans l'endocytose de l'holo-particule HDL. ....	71
2.1.2. La F <sub>1</sub> -ATPase : Structure, fonctions et implication dans l'endocytose des HDL. ....	72
2.1.3. Le récepteur P2Y <sub>13</sub> : caractéristiques et implication dans la voie d'endocytose des HDL.....	73
2.1.4. Régulation de l'ecto-F <sub>1</sub> -ATPase et du récepteur P2Y <sub>13</sub> .....	74
2.2. Etudes précliniques : rôle de P2Y <sub>13</sub> dans le RCT et l'athérosclérose.....	75
2.2.1. Invalidation ubiquitaire du récepteur P2Y <sub>13</sub> .....	75
2.2.2. Activation du récepteur P2Y <sub>13</sub> .....	77
2.3. Etudes cliniques. ....	77
2.3.1. IF1 : un biomarqueur des maladies coronariennes.....	77
2.4. Perspectives thérapeutiques. ....	80
<b>CHAPITRE III : .....</b>	<b>83</b>
<b>LES HDL DANS LA PRÉVENTION ET LE TRAITEMENT DU RISQUE CARDIOVASCULAIRE : UN CHANGEMENT DE PARADIGME?.....</b>	<b>83</b>
<b>1. HDL et génétique.....</b>	<b>84</b>
1.1. Mutations monogéniques et concentrations de HDL-C.....	84
1.2. Lien entre les SNPs régulant les taux de HDL-C et le risque coronarien.....	87
<b>2. Biomarqueurs associés aux HDL et leur intérêt dans la prédiction et le traitement du risque cardiovasculaire. ....</b>	<b>88</b>
<b>CHAPITRE IV : .....</b>	<b>93</b>
<b>RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX .....</b>	<b>93</b>
<b>1. Introduction générale.....</b>	<b>94</b>
<b>2. Rôle du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose dans le modèle murin pro-athérogène, apoE<sup>-/-</sup>. ....</b>	<b>96</b>
2.1. Article 1.....	96
2.2. Matériel et méthodes. ....	96
2.3. Résultats. ....	99
2.4. Discussion. ....	102
<b>3. ARTICLE 2 : CONTRIBUTION DES RECEPTEURS SR-BI HEPATIQUE ET P2Y<sub>13</sub> DANS LE METABOLISME HEPATO-BILAIRE DU CHOLESTEROL ET LE DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE.....</b>	<b>104</b>
3.1. Introduction.....	105
3.2. Matériel et méthodes. ....	106
3.3. Résultats. ....	111
3.4. Discussion. ....	117
<b>4. Conclusion générale. ....</b>	<b>123</b>
<b>5. Perspectives. ....</b>	<b>124</b>
5.1. Finalisation de la mise en évidence des contributions respectives de P2Y <sub>13</sub> et SR-BI hépatique dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose. ....	124
5.1.1. Analyse de l'expression génique hépatique et intestinale.....	124
5.1.2. Evaluation du RCT hépato-biliaire, du TICE et de l'absorption intestinale.....	125
5.2. Récepteurs SR-BI et P2Y <sub>13</sub> comme cibles potentielles pour lutter contre l'athérosclérose.....	127
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>129</b>

## ABRÉVIATIONS

<b>ABC</b>	Adenosine Triphosphate Binding Cassette
<b>ABCA1</b>	Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter A1
<b>ABCB11</b>	Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter B11
<b>ABCB4</b>	Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter B4
<b>ABCB4-KO</b>	Souris invalidées pour ABCB4
<b>ABCG1</b>	Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter G1
<b>ABCG5</b>	Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter G5
<b>ABCG5/8</b>	Les transporteurs ABCG5 et ABCG8
<b>ABCG8</b>	Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter G8
<b>ACAT2</b>	Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2
<b>Ach</b>	Acétylcholine
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>Alb-Cre</b>	Albumine-Cre
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>APC</b>	Protéine C activée
<b>Apo</b>	Apolipoprotéine
<b>apoE<sup>-/-</sup></b>	Souris invalidées pour l'apolipoprotéine E (aussi nommées <b>apoE-KO</b> )
<b>apoE-KO</b>	Souris invalidées pour l'apolipoprotéine E (aussi nommées <b>apoE<sup>-/-</sup></b> )
<b>apoER2</b>	Apolipoprotein E receptor type 2
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNm</b>	ARN messagers
<b>ASBT</b>	Apical Sodium-dependent Transporter
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BA</b>	Acides biliaires
<b>BAD</b>	Bcl-2-Associated Death promoter
<b>BAEC</b>	Cellules Endothéliales d'Aorte Bovine
<b>BCL-XL</b>	B-Cell Lymphoma-eXtra Large
<b>BSEP</b>	Bile Salt Export Pump
<b>CA</b>	Cholic acid ou acide cholique
<b>CCK</b>	Cholécystokinine
<b>CD</b>	Chow diet
<b>CDCA</b>	acide chénodésoxycholique
<b>CE</b>	Cholestérol estérifié
<b>CEC</b>	Capacités d'Efflux de Cholestérol
<b>CETP<sup>Tg</sup></b>	Souris transgéniques exprimant la CETP humaine
<b>CH25H</b>	cholesterol 25-hydroxylase
<b>CL</b>	Cholestérol libre
<b>CLA-I</b>	CD36 et LIMPII Analogue I
<b>CYP27A1</b>	Sterol 27-hydroxylase
<b>CYP7A1</b>	Cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase
<b>CYP8B1</b>	Stérol 12- $\alpha$ -hydroxylase

<b>C<sup>14</sup>-cholestérol</b>	Cholestérol radiomarqué au carbone 14
<b>DCA</b>	Déoxycholate
<b>DAX-1</b>	Dorsal sensitive sex adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome gene 1
<b>eNOS</b>	Endothelial nitric oxide synthase ou oxyde nitrique synthase endothéliale
<b>EPC</b>	Cellules Progénitrices Endothéliales
<b>ER</b>	Estrogen receptors ou récepteurs des œstrogènes
<b>ERE</b>	Éléments de réponse aux œstrogènes
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
<b>E2</b>	Œstradiol
<b>FAS</b>	Fatty Acid Synthase
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid chromatography
<b>FT</b>	Facteur Tissulaire
<b>GFP</b>	Green Fluorescent protein
<b>GSPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GWAS</b>	Genome-Wide Association Studies ou études d'association pangénomique
<b>HCD</b>	High Cholesterol Diet ou régime riche en cholestérol
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein ou Lipoprotéines de Haute Densité
<b>HDL-C</b>	HDL-cholestérol
<b>HDL-CE</b>	HDL-cholestéryl estérifié
<b>HDL-CL</b>	HDL-cholestérol libre
<b>HDL-P</b>	Nombre des particules HDL
<b>HDL-S</b>	Taille des particules HDL
<b>HEPG2</b>	Lignées cellulaires issues d'hépatomes humains
<b>HMG-CoA</b>	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
<b>HUVEC</b>	Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
<b>hypomSR-BI</b>	Souris ayant le gene SR-BI floxé (aussi nommées <b>SR-BI<sup>flox/flox</sup></b> )
<b>hypomSR-BI-KO<sup>foie</sup></b>	Souris invalidées pour le récepteur SR-BI spécifiquement dans le foie (aussi nommées souris SR-BI-KO <sup>foie</sup> )
<b><sup>3</sup>H-cholestérol</b>	Cholestérol tritié
<b>IBABP</b>	Intestinal Bile Acid-Binding Protein
<b>ICAM-1</b>	InterCellular Adhesion Molecule-1 ou molécule intercellulaire d'adhésion-1
<b>IDM</b>	Infarctus Du Myocarde
<b>IF1</b>	Inhibitory Factor 1
<b>IL-1</b>	Interleukine-1
<b>iPSCs</b>	Cellules souches pluripotentes

<b>IRS-1</b> <sup>125</sup> I	Insulin receptor substrate 1 Iode 125
<b>LCA</b>	Lithocholate
<b>LCAT</b>	Lécithine Cholestérol Acyl Transférase
<b>LC-MS</b>	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein ou lipoprotéine de basse densité
<b>LDL-C</b>	LDL-cholestérol
<b>LDLR</b>	Récepteur des LDL
<b>LDLR-KO</b>	Souris invalidées pour le LDLR
<b>LDLR-KO/ApoB100</b>	Souris déficientes pour LDLR, manipulées génétiquement pour exprimer uniquement l'isoforme apoB100
<b>LDLox</b>	LDL oxydées
<b>LE</b>	Lipase Endothéliale
<b>LH</b>	Lipase Hépatique
<b>LOOH</b>	Lipides hydroperoxydes
<b>LPL</b>	Lipoprotéine Lipase
<b>LRH-1</b>	Liver receptor homolog-1
<b>LRP</b>	LDL receptor-related protein
<b>LSF</b>	Lysosulfatide
<b>LXR</b>	Liver X Receptor
<b>LXRE</b>	LXR Response Element
<b>MAF</b>	Minor allele frequency
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MCA</b>	Acide Muricholique
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein-1 ou protéine chimioattractante-1
<b>M-CSF</b>	Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>MDR1</b>	Multidrug Resistant protein
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>MMPs</b>	Matrix Metalloproteases
<b>MO</b>	Moelle osseuse
<b>MTP</b>	Microsomal triglyceride transfer protein ou protéine microsomale de transfert des triglycérides
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NCTP</b>	Na <sup>+</sup> /Taurocholate Cotransporting Polypeptides
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
<b>NPC1L1</b>	Niemann-Pick C1-like 1
<b>NPC1L1<sup>FoieTg</sup></b>	Souris transgéniques exprimant le gène NPC1L1 humain spécifiquement dans le foie
<b>NPC1L1-KO</b>	Souris invalidées pour NPC1L1
<b>OATP</b>	Organic Anion Transporting Polypeptides
<b>oxPL</b>	Phospholipides oxydés à courte chaîne

<b>PAF</b>	Platelet-Activating Factor
<b>PAF-AH</b>	Platelet-activating factor acétylhydrolase
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
<b>PCSK9</b>	Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9
<b>PDZK1</b>	PDZ-containing kidney protein 1
<b>PGI2</b>	Prostacycline
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PL</b>	Phospholipides
<b>PLTP</b>	PhosphoLipid Transfer Protein ou protéine de transfert des phospholipides
<b>PON1</b>	Paraoxonase
<b>PPAR</b>	Peroxisome Proliferator-Activating Receptor
<b>PPRE</b>	PPAR Response Element
<b>P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup></b>	Souris invalidées pour le récepteur P2Y <sub>13</sub> (aussi nommées <b>P2Y<sub>13</sub>-KO</b> )
<b>P2Y<sub>13</sub>-KO</b>	Souris invalidées pour le récepteur P2Y <sub>13</sub> (aussi nommées <b>P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup></b> )
<b>P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup></b>	Souris doublement invalidées pour le récepteur P2Y <sub>13</sub> et l'apolipoprotéine E (aussi nommées <b>P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO</b> )
<b>P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO</b>	Souris doublement invalidées pour le récepteur P2Y <sub>13</sub> et l'apolipoprotéine E (aussi nommées <b>P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup></b> )
<b>P2Y<sub>13</sub> x SR-BI-KO<sup>foie</sup></b>	Souris doublement invalidées pour le récepteur P2Y <sub>13</sub> et le récepteur SR-BI hépatique
<b>RCT</b>	Transport Retour du Cholestérol
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique nucléaire
<b>RNA</b>	RiboNucleic Acid ou acide ribonucléique
<b>Rt-qPCR</b>	Real time quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RXR</b>	Retinoid X Receptors
<b>SAA</b>	Sérum Amyloïde A
<b>SCARB1</b>	Scavenger Receptor Class B Member 1
<b>SF-1</b>	Steroidogenic factor-1
<b>shRNA</b>	Short hairpin RNA, molécule d'ARN interférence
<b>siRNA</b>	Petits ARN interférents
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SPC</b>	Sphingosylphosphorylcholine
<b>SR-AI</b>	Scavenger Recepteur class A type I
<b>SR-AII</b>	Scavenger Recepteur class A type II
<b>SR-BI</b>	Scavenger Recepteur class B type I
<b>SR-BII</b>	Scavenger Recepteur class B type II
<b>SR-BI<sup>flox/flox</sup></b>	Souris ayant le gène SR-BI floxé (aussi nommées hypomSR-BI)
<b>SR-BI-KO</b>	Souris invalidées pour le récepteur SR-BI
<b>SR-BI-KO x CETP</b>	Souris invalidées pour SR-BI exprimant la CETP humaine
<b>SR-BI-KO<sup>foie</sup></b>	Souris invalidées pour le récepteur SR-BI spécifiquement dans le foie
<b>SR-BI-KO<sup>foie</sup> x CETP</b>	Souris invalidées pour SR-BI spécifiquement dans le foie, exprimant la CETP humaine
<b>SREs</b>	Éléments de réponse aux stérols

<b>SREBPs</b>	Sterol Regulatory Element Binding Proteins
<b>S1P</b>	sphingosine-1-phosphate
<b>TG</b>	Triglycérides
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>TICE</b>	Trans-Intestinal Cholesterol Excretion
<b>TLR</b>	Toll-Like receptors
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ou facteur de nécrose tissulaire- $\alpha$
<b>T3</b>	Triiodothyronine
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cellular Adhesion Molecule-1 ou molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein ou lipoprotéine de très basse densité
<b>VLDLR</b>	Very Low Density Lipoprotein Receptor
<b>vWF</b>	Facteur de von Villebrand
<b>WT</b>	Wild Type





## RÉSUMÉ

L'effet athéroprotecteur des Lipoprotéines de Haute Densité (HDL) est principalement attribué à leur rôle clé dans Transport Retour du Cholestérol (RCT), un processus par lequel le cholestérol excédentaire des cellules périphériques est capté par les particules HDL pour être amené au foie où il sera préférentiellement sécrété dans la bile sous forme de cholestérol libre ou après transformation en acides biliaires, puis ultérieurement excrété dans les fèces. Deux voies indépendantes ont été identifiées comme étant impliquées dans captation hépatique du HDL. La première concerne la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> dans laquelle l'apoA-I (apolipoprotéine majoritaire des HDL) se lie à la F<sub>1</sub>-ATPase exprimée à la surface des hépatocytes (ecto-F<sub>1</sub>-ATPase) et stimule l'hydrolyse d'ATP extracellulaire en ADP. L'ADP ainsi généré active spécifiquement le récepteur purinergique P2Y<sub>13</sub> pour stimuler l'endocytose de l'holoparticule HDL (i.e. composante protéique et lipidique) *via* un récepteur de basse affinité différent de SR-BI. Les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> (P2Y<sub>13</sub>-KO) présentent une diminution des sécrétions de lipides biliaires accompagnée d'une diminution du RCT des macrophages vers les fèces sous régime normolipidique. Un régime riche en cholestérol (1,25% cholestérol) accentue ce phénotype. La voie SR-BI, quant à elle, est responsable de la captation sélective du cholestérol estérifié par le foie. Les souris invalidées pour SR-BI spécifiquement au niveau du foie (SR-BI-KO<sup>foie</sup>) présentent une hypercholestérolémie principalement attribuée à une augmentation du HDL-Cholestérol (HDL-C) et du LDL-Cholestérol (LDL-C) et développent des plaques d'athérosclérose sous régime hypercholestérolémique. Dans une étude récente, nous avons montré que l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> dans le modèle murin pro-athérogène apoE-KO induit une augmentation du développement d'athérosclérose associée à une diminution des sécrétions de lipides biliaires et du RCT des macrophages vers les fèces. De plus, dans ces souris, l'expression hépatique transcriptionnelle et protéique de SR-BI était fortement augmentée par rapport aux souris apoE-KO, suggérant qu'un possible mécanisme de compensation pourrait exister entre les récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier la contribution respective des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose. Nous avons croisé des souris P2Y<sub>13</sub>-KO avec des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> pour obtenir des souris doublement invalidées (P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO). Le phénotype métabolique des souris dKO a été étudié sous régime normolipidique et hypercholestérolémique ainsi que le développement d'athérosclérose sous régime hypercholestérolémique. Par rapport aux souris sauvages (WT), les souris dKO sous régime normolipidique, présentent une augmentation du cholestérol plasmatique similaire à celle observée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, principalement imputable à une augmentation du HDL-C et du LDL-C. Les souris dKO, mais pas les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, montrent une diminution des sécrétions de lipides biliaires comparable à celle observée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO. Ce phénotype métabolique observé chez les souris dKO est accentué sous régime hypercholestérolémique et est associé à une augmentation des plaques d'athérosclérose par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>.

L'ensemble des résultats montre que la délétion hépatique de SR-BI contribue essentiellement à une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol, et plus

particulièrement HDL-C. La délétion de P2Y<sub>13</sub>, quant à elle, n'induit aucune variation des taux plasmatiques de lipoprotéines mais contribue principalement à une diminution des sécrétions de lipides biliaires qui contribue au développement de l'athérosclérose chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique. Ces résultats soutiennent le concept selon lequel le flux de cholestérol transporté par les HDL des tissus périphériques vers le foie et les voies de sécrétions biliaires est plus important dans l'athéroprotection que la concentration statique en HDL-C. L'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> constitue une approche thérapeutique intéressante pour cibler les HDL contre le développement de l'athérosclérose.

## ABSTRACT

The atheroprotective effect of High Density Lipoproteins (HDL) is mostly attributed to their central role in Reverse Cholesterol Transport (RCT), a process whereby excess cholesterol is taken up from peripheral cells to be processed into HDL particles, then later delivered to the liver where it is preferentially secreted into the bile, either as free cholesterol or after transformation into bile acids, to be further excreted into the feces. Two independent pathways have been identified as being involved in the hepatic HDL uptake. The first one involves the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> pathway. Briefly, apoA-I (main HDL apolipoprotein) binds to the F<sub>1</sub>-ATPase expressed ectopically at the surface of the hepatocyte (ecto-F<sub>1</sub>-ATPase) and stimulates hydrolysis of extracellular ATP into ADP. The generated ADP selectively activates the purinergic receptor P2Y<sub>13</sub> resulting in subsequent endocytosis of the HDL-holoparticle (i.e. protein and lipid moieties) through a low-affinity binding site distinct from SR-BI. Mice deficient for P2Y<sub>13</sub> display decreased biliary lipid secretion associated to an impaired macrophage-to-feces RCT when fed a Chow Diet (CD), phenotype emphasized when fed a High Cholesterol Diet (HCD). Differently, the SR-BI pathway mediates selective HDL-cholesteryl ester uptake by the liver. Mice with liver-specific SR-BI deficiency (SR-BI-KO<sup>liver</sup>) display a hypercholesterolemia mainly due to an increase on HDL-Cholesterol (HDL-C) and LDL-Cholesterol (LDL-C) and develop atherosclerosis when fed a HCD. In a recent study, we showed that P2Y<sub>13</sub> extinction in the pro-atherogenic mouse model apoE-KO resulted in an increase of atherosclerotic plaque development associated to a decreased biliary lipid secretion and macrophage-to-feces RCT. Moreover, in these mice, mRNA and protein level of hepatic SR-BI were consistently increased as compared to apoE KO mice, suggesting that a possible compensatory mechanism might exist between P2Y<sub>13</sub> and SR-BI receptors.

My thesis aimed to study the respective contribution of P2Y<sub>13</sub> and hepatic SR-BI in HDL-C metabolism and atherosclerosis development. We crossbred P2Y<sub>13</sub> KO with SR-BI KO<sup>liver</sup> mice and obtained double knockout mice (P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>liver</sup> dKO). The phenotype of dKO mice was analysed with regards to HDL-C metabolism either on CD or after 20 weeks of HCD, and to atherosclerosis development on HCD. When fed a CD, dKO mice, showed an increase in plasma cholesterol compared to WT mice similar to that observed in SR-BI KO<sup>liver</sup> mice, mainly due to an increase in HDL-C. DKO, but not SR-BI KO<sup>liver</sup> mice, showed impaired biliary lipid secretion to the same extent than P2Y<sub>13</sub> KO mice. HCD accentuated the metabolic phenotype of dKO mice, with an increase in atherosclerotic lipid lesions in dKO mice compared to SR-BI KO<sup>liver</sup> mice.

The phenotypic features of P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>liver</sup> dKO mice show that hepatic extinction of SR-BI essentially contributes to an increase of HDL-C levels. Conversely, P2Y<sub>13</sub> extinction does not induce any change in plasma lipoprotein levels but mainly contributes to a decrease of hepato-biliary cholesterol secretions, which translates into an increased atherosclerosis development, on top of SR-BI hepatic extinction. These results support the concept that the dynamic flux of cholesterol transported by HDL from macrophage foam cells to the liver for further bile secretion is essential for athero-protection rather than steady-state HDL-C concentration. In the future of HDL-therapies, P2Y<sub>13</sub> receptor activation constitutes an interesting therapeutic approach against atherosclerosis

development.

## AVANT-PROPOS

Les pathologies cardiovasculaires associées à l'athérosclérose représentent l'une des premières causes de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une association négative entre le taux plasmatique des lipoprotéines de haute densité (HDL) et l'incidence des maladies cardiovasculaires. Les HDL ont plusieurs effets athéroprotecteurs mais leur rôle athéroprotecteur est principalement attribué à leur participation dans le Transport Retour du Cholestérol (RCT) dans lequel les HDL captent le cholestérol des tissus périphériques pour le ramener vers le foie où il sera éliminé par les sécrétions biliaires sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires.

Dans ce contexte, notre équipe de recherche s'intéresse depuis plusieurs années au métabolisme des HDL et plus précisément à la captation hépatique de ces lipoprotéines qui constitue l'une des dernières étapes du RCT. Les travaux de l'équipe ont permis d'identifier une nouvelle voie de captation des HDL, la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>. Dans cette voie, la liaison de l'apoA-I, l'apolipoprotéine majoritaire des HDL, sur une F<sub>1</sub>-ATPase exprimée à la surface des hépatocytes (ecto-F<sub>1</sub>-ATPase) stimule son activité ATP hydrolase. L'ADP extracellulaire ainsi généré va induire l'activation du récepteur purinergique P2Y<sub>13</sub> conduisant à l'endocytose des holoparticules HDL (composante protéique et lipidique) par un site de liaison de basse affinité différent de SR-BI. Les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> (P2Y<sub>13</sub>-KO) présentent une diminution des sécrétions de lipides biliaires accompagnée d'une diminution du RCT des macrophages vers les fèces sous régime normolipidique. Un régime riche en cholestérol (1,25% cholestérol) accentue ce phénotype. À l'inverse, l'activation pharmacologique de P2Y<sub>13</sub> augmente le turn-over de HDL plasmatique et leur captation hépatique, ce qui résulte en une augmentation de l'élimination de cholestérol *via* les sécrétions biliaires. La voie SR-BI, quant à elle, est responsable de la captation sélective du cholestérol estérifié par le foie. Les souris invalidées pour SR-BI spécifiquement au niveau du foie (SR-BI-KO<sup>foie</sup>) présentent une hypercholestérolémie principalement attribuée à une augmentation du HDL-Cholestérol (HDL-C) et de LDL-Cholestérol (LDL-C) et développent des plaques d'athérosclérose sous régime hypercholestérolémique. Dans une étude récente, nous avons montré que l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> dans le modèle murin pro-athérogène apoE-KO induit une augmentation du développement d'athérosclérose associée à une diminution des sécrétions de lipides biliaires et du RCT des macrophages vers les fèces. De plus, dans ces souris, l'expression hépatique transcriptionnelle et protéique de SR-BI était fortement augmentée par rapport aux souris apoE-KO, suggérant qu'un mécanisme de compensation pourrait exister entre les récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI. Ainsi, au cours de mon doctorat, je me suis intéressée à la contribution respective des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI dans le

métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose, les voies ecto/F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> et SR-BI pouvant constituer une potentielle nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose. Nous avons croisé des souris P2Y<sub>13</sub>-KO avec des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> pour d'obtenir des souris doublement invalidées (P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO). Nous avons ensuite caractérisé le phénotype métabolique de ces souris en condition de normolipémie et d'hypercholestérolémie ainsi que le développement de l'athérosclérose en condition d'hypercholestérolémie. Ces travaux nous ont permis de montrer que l'invalidation hépatique de SR-BI contribue essentiellement aux concentrations plasmatiques de HDL-C alors que l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> contribue essentiellement aux sécrétions hépato-biliaires de cholestérol et agit de façon importante sur le développement de la plaque d'athérosclérose chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique.

Afin de mieux aborder l'ensemble de ces résultats, ce mémoire est composé d'une introduction bibliographique, avec un premier chapitre décrivant dans un premier temps les HDL et leurs propriétés pléïotropes athéroprotectrices et dans un deuxième temps les différentes étapes du RCT et l'impact de certains acteurs clés du RCT dans le métabolisme des HDL et le développement de l'athérosclérose. Le second chapitre décrira les voies de captation hépatique des HDL, ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> et SR-BI, en détaillant l'apport des études menées chez des modèles animaux ainsi que les études menées chez l'homme impliquant ces voies. Le troisième chapitre discutera d'une nouvelle façon d'appréhender le paradigme des HDL dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose. Et enfin, le quatrième chapitre sera consacré aux différents résultats expérimentaux obtenus au cours de ce doctorat et aux perspectives ouvertes par ces travaux.

**Bonne lecture.**

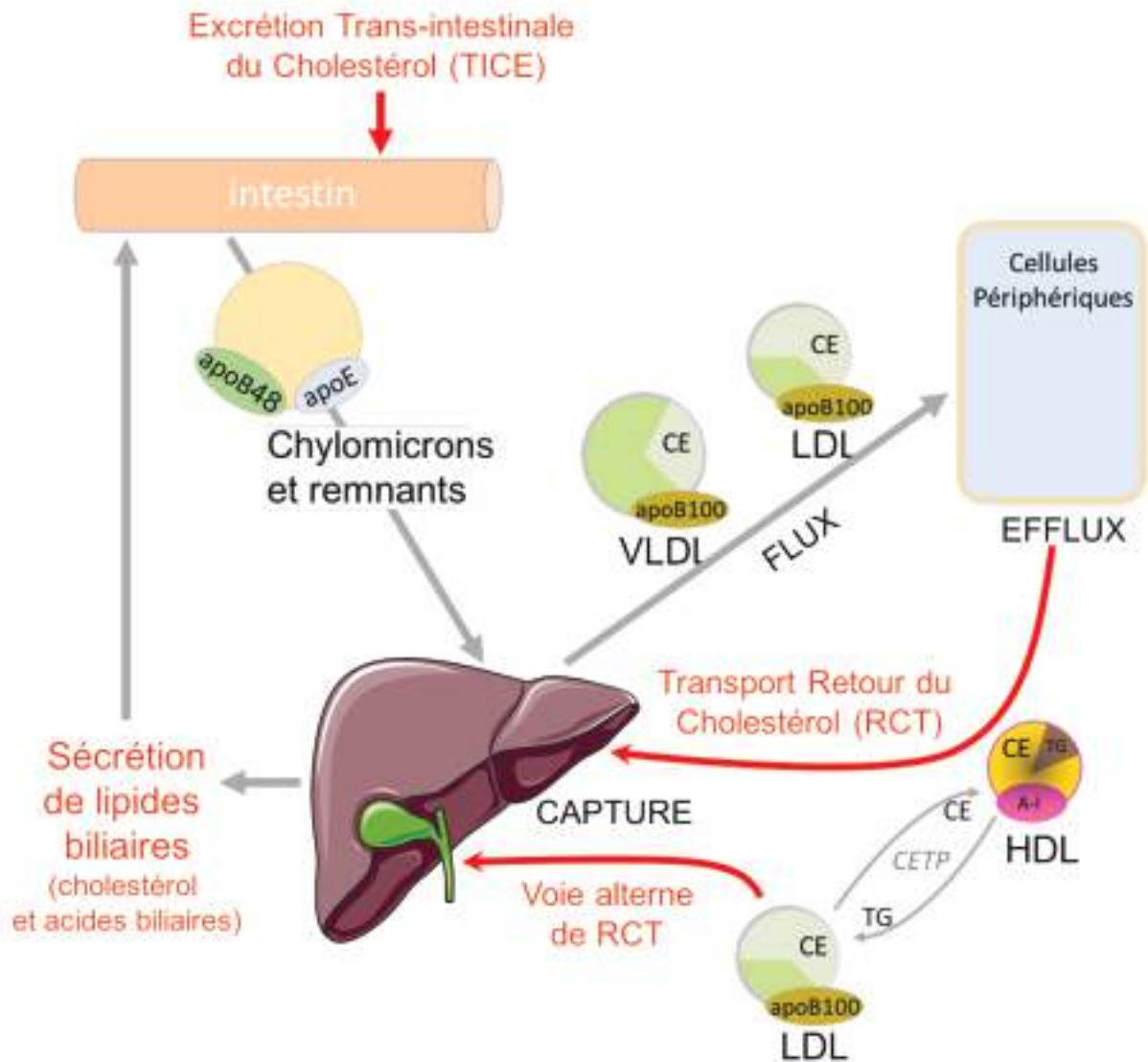
## **CHAPITRE I :**

# **LES LIPOPROTÉINES DE HAUTE DENSITÉ**



Il existe deux voies d'apport du cholestérol aux cellules de l'organisme : l'apport alimentaire dit "exogène" et l'apport "endogène" correspondant au cholestérol synthétisé par l'organisme, majoritairement par le foie. Chez l'homme, le pourcentage de contribution de chacune de ces voies est de 30% et 70% respectivement : l'alimentation fournit environ 400 mg de cholestérol par jour et le foie synthétise environ 1g de cholestérol par jour (Grundy, 1983). Le cholestérol étant un composé très hydrophobe, il est insoluble dans les liquides biologiques (sang, lymphe, ..). Afin d'être véhiculé aux cellules de l'organisme, le cholestérol ainsi que d'autres lipides (triglycérides ou phospholipides essentiellement) sont transportés dans la circulation lymphatique et plasmatique par des particules spécialisées, les lipoprotéines (**Figure 1**). Les lipoprotéines sont des assemblages macromoléculaires formés d'un cœur hydrophobe composé de triglycérides (TG) et de cholestérol estérifié (CE), et d'une couche périphérique amphipathique contenant des phospholipides (PL), du cholestérol libre (CL) et des apolipoprotéines.

On distingue principalement 4 classes de lipoprotéines qui assurent chacune des fonctions particulières et qui sont classiquement séparées suivant leur densité : les chylomicrons ( $d < 1,006$ ), les lipoprotéines de très basse densité ou VLDL (Very Low Density Lipoprotein,  $1,006 < d < 1,019$ ), les lipoprotéines de basse densité ou LDL (Low Density Lipoprotein,  $1,019 < d < 1,063$ ) et les lipoprotéines de haute densité ou HDL (High Density Lipoprotein,  $1,063 < d < 1,21$ ). Les chylomicrons et les VLDL, respectivement d'origine intestinale et hépatique, ont pour rôle principal le transport des triglycérides alors que les LDL, issues de la lipolyse des VLDL, assurent l'approvisionnement des cellules en cholestérol. Une des fonctions principales des HDL d'origine hépatique et intestinale, est le transport du cholestérol "excédentaire" des cellules périphériques vers le foie où il sera éliminé *via* les voies biliaires, processus appelé Transport Retour du Cholestérol (*Reverse Cholesterol Transport*, RCT). Cette voie, qui sera détaillée ultérieurement dans ce chapitre, assure l'élimination du cholestérol de l'organisme et contribue ainsi aux effets protecteurs des HDL vis à vis de l'athérosclérose. Chez l'homme, la Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) qui transfère le CE des HDL vers les LDL et VLDL en échange de leurs TG, offre une voie alterne de Transport Retour du Cholestérol par l'intermédiaire du récepteur aux LDL (LDLR). La CETP est absente chez la souris. Par ailleurs, il a récemment été mis en évidence une voie alternative d'élimination du cholestérol de l'organisme, appelée TICE (Trans-Intestinal Cholesterol Excretion), par laquelle le cholestérol circulant est directement absorbé au niveau du pôle basolatéral des entérocytes puis sécrété dans la lumière intestinale (Temel & Brown, 2015).



**Figure 1 : le cycle du cholestérol**

Le foie joue un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol. Il stocke le cholestérol d'origine alimentaire et assure la majorité de la synthèse endogène. Il participe aussi à la distribution de cholestérol à l'organisme en sécrétant dans la circulation sanguine, des VLDL qui seront rapidement transformées en LDL sous l'action des lipases. L'équilibre en cholestérol des cellules périphériques est maintenu en grande partie grâce au Transport Retour du Cholestérol (RCT) assuré par les HDL d'origine hépatique et intestinale, qui transportent le cholestérol des cellules périphériques, et notamment des macrophages, vers le foie. Il sera alors sécrété dans la bile sous forme de cholestérol libre ou après transformation en acides biliaires, et finalement déversé dans l'intestin. La majorité du cholestérol et des acides biliaires sera réabsorbée (>50% et 90-95% respectivement), et le reste éliminé dans les fèces. La Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), protéine présente chez l'homme et absente chez la souris, transfère le CE des HDL vers les LDL, et offre ainsi une voie alterne de Transport Retour du Cholestérol. Une autre voie d'élimination du cholestérol a été mise en évidence ; elle est nommée TICE (Excrétion Trans-intestinale du cholestérol), et permet l'absorption du cholestérol circulant par les entérocytes et sa sécrétion dans la lumière intestinale.

## 1. Classification et structure.

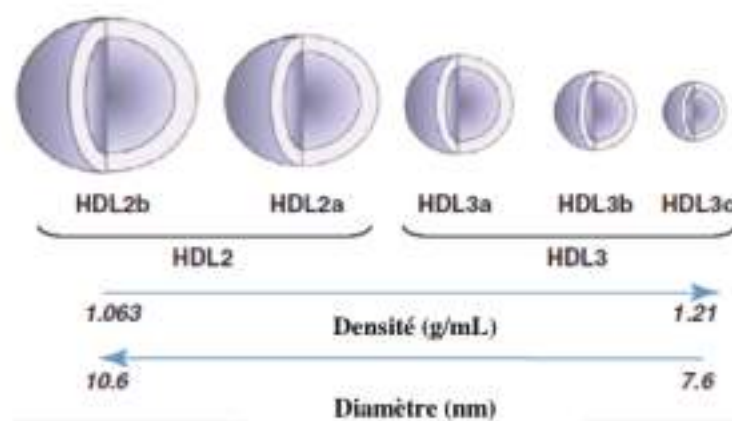
### 1.1. Classification.

Les Lipoprotéines de Haute Densité (HDL) correspondent à une famille de lipoprotéines d'une grande hétérogénéité. Les membres de cette famille diffèrent par leur densité, leur taille, leur charge, leur forme et leur composition. D'une densité comprise entre 1,063 et 1,21 g/mL et une taille qui varie entre 7 et 12 nm, la diversité de ces particules est le reflet d'un remodelage plasmatique permanent. Sous forme **naissante**, elles sont **discoïdales**, de petite taille ( $\leq 8$  nm) et sont composées d'une bicouche lipidique de phospholipides, d'apolipoprotéine A-I (apoA-I), de cholestérol libre et d'un peu de triglycérides. Au fur et à mesure de leur maturation, les HDL s'enrichissent en lipides et cholestérol, et le cholestérol libre est estérifié sous l'action de la Lecithine Cholesterol Acyl Transferase (LCAT), et les esters de cholestérol non polaires entrent dans l'intérieur hydrophobe de la bicouche, favorisant la formation de HDL **sphériques** composées :

- d'une surface constituée de lipides polaires hydrophiles (phospholipides, cholestérol libre) et d'apolipoprotéines (notamment ApoA-I et apoA-II).
- d'un noyau constitué de lipides apolaires hydrophobes (triglycérides, cholestérol estérifié).

Il existe différentes techniques pour séparer les HDL que ce soit en fonction de leurs propriétés physico-chimiques ou de leur composition. La plus ancienne technique, qui permet une séparation des lipoprotéines selon leur densité, est l'**ultracentrifugation séquentielle de flottaison** : elle permet d'isoler 2 sous-fractions majeures de HDL sphériques : les **HDL<sub>3</sub>** (densité : 1,125-1,21g/mL) petites, denses et riches en protéines et les **HDL<sub>2</sub>** (densité : 1,063-1,125g/mL) larges, légères et riches en lipides. Ces deux classes peuvent ensuite être sous-fractionnées par d'autres techniques telles que l'électrophorèse sur gel non dénaturant de polyacrylamide ou l'**ultracentrifugation isopycnique** (séparation par gradient de densité), en cinq sous-populations de

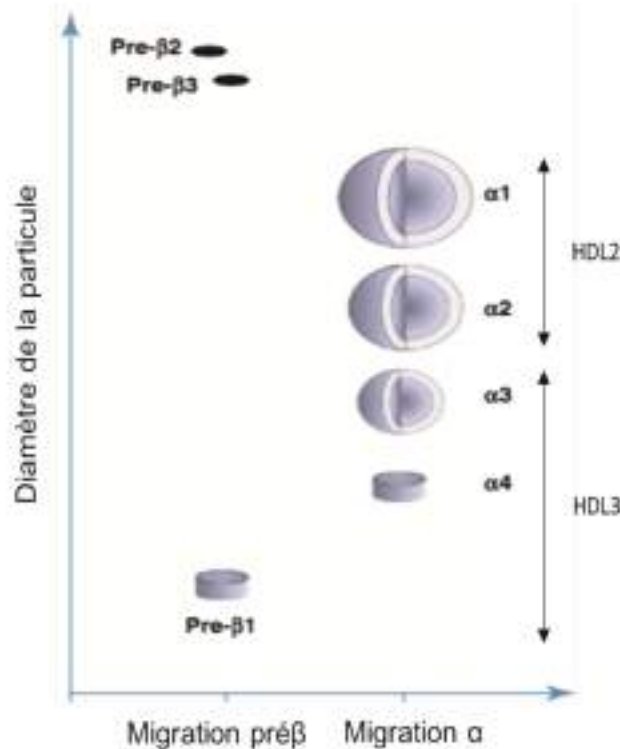
taille décroissante : HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> et HDL<sub>3c</sub> (Figure 2).



**Figure 2 :** Hétérogénéité des particules HDL chez l'homme, classification des sous-populations de HDL en fonction de leur densité et de leur taille. D'après (Camont et al., 2011a).



Une autre approche permettant de séparer les sous-fractions de HDL est l'**électrophorèse bidimensionnelle** qui permet une séparation selon la taille et la charge. Les sous-fractions identifiées par cette technique peuvent être classées en 2 populations : les **HDL pré $\beta$**  et **HDL  $\alpha$** .



Cette technique permet de séparer les HDL en 5 populations principales, représentées de façon schématique en Figure 3 (Rosenson et al., 2011):

- Les HDL discoïdales, HDL pré $\beta$ 1 (diamètre : 5,6 nm) de mobilité pré $\beta$  et HDL  $\alpha$ 4 (diamètre : 7,4 nm) de mobilité  $\alpha$ .
- Les HDL sphériques de mobilité  $\alpha$ , HDL  $\alpha$ 3 (diamètre : 8 nm), HDL  $\alpha$ 2 (diamètre : 9,2nm) et HDL  $\alpha$ 1.

**Figure 3** : Diversité des différentes sous-fractions de HDL en électrophorèse deux dimensions. D'après (Camont et al., 2011).

Leur composition en apolipoprotéines permet de les classer en particules contenant de l'apoA-I avec ou sans apoA-II : **Lp-AI:A-II** et **LpA-I**, respectivement (technique d'électro-immunodiffusion sur gel d'agarose). Les Lp-AI:A-II sont principalement retrouvées dans la gamme des HDL<sub>3</sub>, tandis que les LpAI sont retrouvées parmi les HDL<sub>2</sub> et les HDL<sub>3</sub>.

Parmi les techniques les plus récentes d'analyse des HDL se dégage la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Cette technique permet d'avoir accès au **nombre de particules (HDL-P)** de chacune des différentes sous-classes de HDL séparées selon leur taille, ainsi qu'à la **distribution de la taille des particules (HDL-S)**. Chaque sous-type de HDL émet des signaux RMN différents, avec une amplitude individuelle qui peut être mesurée ; ces amplitudes sont directement proportionnelles au nombre de particules de chaque sous-type de HDL émettant le signal, indépendamment de la composition lipidique de chaque lipoprotéine (Jeyarajah et al., 2006). Ainsi les particules de HDL quantifiées par RMN peuvent être classées en 3 tailles : HDL de grande taille (9,4 – 14 nm), de taille intermédiaire (8,2 – 9,4 nm) et de petite taille (7,3 – 8,2 nm)(Hafiane & Genest, 2015). L'analyse par RMN est de plus en plus utilisée dans des études épidémiologiques et cliniques.

Le Tableau 1 présente de façon simplifiée les classifications des HDL issues des différentes techniques de séparation.

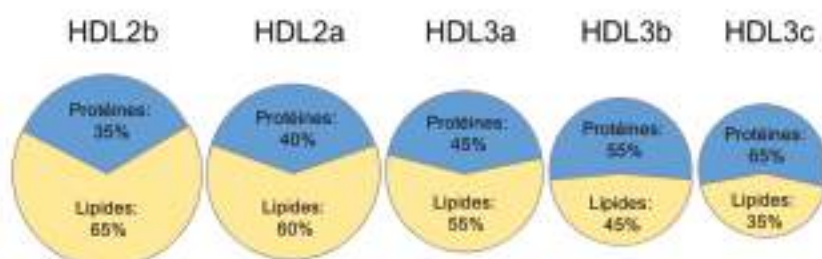
	HDL très larges	HDL larges	HDL moyennes	HDL petites	HDL très petites
Densité (g/mL)	1,063-1,087	1,088-1,110	1,110-1,129	1,129-1,154	1,154-1,21
Taille (nm)	12,9-9,7	9,7-8,8	8,8-8,2	8,2-7,8	7,8-7,2
Ultracentrifugation (gradient de densité)	HDL <sub>2b</sub>	HDL <sub>2a</sub>	HDL <sub>3a</sub>	HDL <sub>3b</sub>	HDL <sub>3c</sub>
Migration électrophorétique (gel 2D)	$\alpha$ -1	$\alpha$ -2	$\alpha$ -3	$\alpha$ -4	pré $\beta$

**Tableau 1 :** Classification des sous-fractions de HDL en fonction de leurs propriétés physiques. D'après (Rosenson *et al*, 2011).

Chez la souris, les techniques utilisées pour séparer les HDL sont l'ultracentrifugation séquentielle et l'électrophorèse en deux dimensions. Cependant l'ultracentrifugation séquentielle permet uniquement une séparation en HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> chez cette espèce.

## 1.2. Composition.

Chacune de ces sous-fractions est caractérisée par un contenu différent en protéines et en lipides (Tableau 2). Les protéines principales des HDL sont les apolipoprotéines. Comme nous le verrons par la suite, ces protéines jouent un rôle majeur dans les fonctions des HDL et leurs effets bénéfiques.



	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
Masse moléculaire moyenne (kDa)	410	400	360	200	160
	mol/mol HDL				
<b>Apolipoprotéines</b>					
apoA-I	4-5	4	3-4	3	2-3
autres	≤2	≤2	≤2	1	≤1
<b>Lipides de surface</b>					
Phospholipides	130	140	120	45	25
Cholestérol libre	70	40	25	15	10
<b>Cœur lipidique</b>					
Esters de cholestérol	180	160	140	70	40
Triglycérides	30	20	15	10	5

Tableau 2 : propriétés physico-chimiques des différentes sous-fractions de HDL chez des sujets normolipémiques sains. D'après (Kontush & Chapman, 2006).

### 1.2.1. Protéome.

Les HDL sont les lipoprotéines qui transportent le plus grand nombre de protéines (plus de 30% du poids total). Les protéines représentent le composant structural et fonctionnel majeur des HDL. L'apoA-I est la protéine majoritaire des HDL (70% de leur contenu protéique) et est présente sur l'ensemble des sous-fractions de HDL. La deuxième apoprotéine majeure des HDL est l'apoA-II qui représente entre 15 et 20% du contenu protéique et est présente dans environ la moitié des lipoprotéines. Moins de 10% de leur contenu protéique est composé d'autres apolipoprotéines (apoE, apoA-IV, apoA-V, apoJ, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoF, apoH, apoL, ApoM et apoSAA,...) ayant des fonctions bien spécifiques (Kontush & Chapman, 2011) (J.F. Toussaint et al., 2003) (Kunnen & Van Eck, 2012) (Gangani D. Silva et al., 2008).

Les HDL transportent également des enzymes telles que la LCAT, la paraoxonase (PON1), la Platelet-Activating Factor Acétylhydrolase (PAF-AH) et la glutathion peroxydase (GSPx). D'autres protéines transportées par les HDL sont des protéines impliquées dans le métabolisme des

lipoprotéines: la Phospholipid Transfer Protein (**PLTP**) et la Cholesteryl Ester Transfer Protein (**CETP**) (Kontush & Chapman, 2006).

Les avancées de la spectrométrie de masse de ces dernières années ont permis d'isoler un grand nombre de protéines du protéome des HDL (Vickers & Remaley, 2014). Actuellement, 95 protéines ont été identifiées dans 3 études séparées, de 3 laboratoires indépendants (HDL Proteome Watch). Celles-ci sont impliquées dans une grande variété d'activités telles que le transport et la liaison de lipides, l'hémostase, la liaison aux métaux, les activités antioxydantes ou encore la réponse immunitaire.

### 1.2.2. Lipidome.

Le lipidome des HDL se réfère à la totalité des lipides qui constituent les HDL ; on parle aussi de profil lipidique des HDL. A ce jour, le lipidome des HDL est composé de plus de 200 lipides. La teneur des HDL en composants lipidiques majeurs a été analysée dans plusieurs études et varie selon la sous-population de HDL, témoignant du remodelage dynamique permanent des HDL dans le plasma (Kontush, Lhomme, & Chapman, 2013).

La composition lipidique des HDL contribue aux propriétés athéroprotectrices des HDL (Kontush et al., 2013). Par exemple, la quantité et la qualité des phospholipides contribuent à l'efflux de cholestérol des cellules périphériques vers les HDL (les phospholipides insaturés à l'état liquide sont des meilleurs accepteurs de cholestérol que leurs analogues saturés en état gel) (Jian et al., 1998) (Yancey et al., 2000). Les HDL transportent également des lipides bioactifs tels que la sphingosine-1-phosphate (S1P) qui joue un rôle important dans la protection endothéliale grâce à ses propriétés vasodilatatrices et antiapoptotiques qui passent par l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) (Mineo et al., 2006) (J. R. Nofer et al., 2004) (Igarashi & Michel, 2008) (Matsuo et al., 2007).

### 1.2.3. Métabolome.

En plus des lipides et des protéines, les HDL transportent aussi tout un répertoire de petites molécules regroupées sous le nom de métabolome des HDL (Vickers & Remaley, 2014). Dans ce répertoire nous retrouvons des **vitamines liposolubles** comme la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la vitamine D, la vitamine A (rétinol) ou ses précurseurs, les caroténoïdes. Nous retrouvons également des **hormones** et **stéroïdes** telles que la tétraiodotyronine (thyroxine) ou l'œstradiol, la pregnénolone et la déhydroépiandrostérone. Ces hormones pourraient agir comme régulateurs transcriptionnels ou pourraient servir de précurseurs pour la synthèse cellulaire des stéroïdes (Vickers & Remaley, 2014). Parmi les multiples molécules véhiculées par les HDL on retrouve des

acides biliaires. Dans la circulation la majorité des acides biliaires sont sous forme libre ou liée à l'albumine et se retrouvent dans la circulation portale hépatique et en moindre proportion dans la circulation systémique (reflet de la circulation entéro-hépatique).

#### 1.2.4. Transcriptome.

Vickers *et al.* ont démontré que les HDL circulantes transportent diverses espèces d'ARN (acides ribonucléiques ou RiboNucleic Acid) non codants, telles que des fragments de Ribonucléase P (ribonucléase qui clive l'ARN), des fragments dérivés de tRNA (tRFs) (fragments des ARN de transfert dont la fonction n'est pas totalement élucidée), et enfin des microRNA (miRNA). Les miRNA sont des petits ARN non codants (environ 22 nt) qui contrôlent l'expression des ARNm (ARN messagers) avec des séquences complémentaires. Plus de 90% des miRNA extracellulaires sont empaquetés avec des protéines telles que les HDL ou Ago2 alors que les 10% restants sont contenus dans des LDL ou des particules telles que des exosomes, des microvésicules ou des corps apoptotiques (Zhu & Fan, 2011) (Vickers *et al.*, 2011) (Chen *et al.*, 2012) (Arroyo *et al.*, 2011). Les travaux de Vickers *et al.* suggèrent que les miRNA transportés par les HDL peuvent être délivrés aux cellules et altérer l'expression de leurs gènes cibles au sein de la cellule (Vickers *et al.*, 2011). Parmi les miRNA retrouvés à plus haute concentration dans les HDL, se trouvent le miR-223, le miR-126 et le miR-92a (Wagner *et al.*, 2013). Le miR-223, qui compte pour 8% de l'ensemble des miRNA circulants a été très étudié et serait impliqué dans le métabolisme glucidique des cardiomyocytes, la granulopoïèse ou la différenciation ostéoclastique (Wagner *et al.*, 2013) (Vickers *et al.*, 2011).

## 2. Les HDL et leurs fonctions.

Les HDL possèdent plusieurs propriétés protectrices vis à vis de l'athérosclérose. Cet effet protecteur des HDL est attribué en grande partie à leur rôle primordial dans le Transport Retour du Cholestérol, mais est également associé aux effets pléiotropes de ces lipoprotéines sur la paroi vasculaire (anti-inflammatoires, antioxydantes, antithrombotiques...). Les différentes sous-populations de HDL de par leur taille et leur composition auront des fonctionnalités différentes.

### 2.1. Propriétés pléiotropes des HDL.

Un évènement majeur impliqué dans l'initiation de la formation de la plaque d'athérome est la dysfonction endothéliale (modification du profil de l'endothélium vers un profil vasoconstricteur, inflammatoire et thrombotique), qui induit une infiltration des LDL dans l'espace sous-endothélial où elles seront oxydées. Les LDL oxydées (LDLox) sont extrêmement pro-athérogènes et inflammatoires.



En effet, les LDLox ainsi que différentes cytokines inflammatoires (Facteur de nécrose tissulaire :  $TNF\alpha$  et Interleukine-1 : IL-1) vont induire l'activation de l'endothélium qui va exprimer de nombreuses molécules d'adhérence des leucocytes telles que la molécule d'adhérence aux cellules vasculaires-1 (VCAM-1), la molécule intercellulaire d'adhérence-1 (ICAM-1) et les E et P-sélectines (O'Connell & Genest, 2001). Les LDLox vont également participer à la sécrétion par les cellules endothéliales de molécules chimio-attractantes comme MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et de facteurs de croissance comme le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), qui vont respectivement induire la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial, et la différenciation des monocytes en macrophages (Young & McEneaney, 2001). Ainsi, les monocytes circulants vont se lier aux molécules d'adhérence à la surface de l'endothélium, pénétrer dans l'espace sous-endothélial, guidés par les cytokines chimio-attractantes (telles que MCP-1), et se différencier en macrophages sous l'effet de facteurs de croissance (tels que M-CSF). Les macrophages phagocytent les LDLox *via* des récepteurs scavengers tels que les Scavenger Receptors class A types I et II (SR-AI et SR-AII), CD36, CD68 et les Scavenger Receptors class B types I et II (SR-BI et SR-BII) (Mendoza et al., 2013) (Levitan et al., 2010). Les LDLox s'accumulent au sein des macrophages qui se transforment en macrophages spumeux. Des macrophages spumeux, et en moindre mesure, des lymphocytes s'accumulent dans la paroi artérielle. Les LDLox intravasculaires vont activer les macrophages *via* les récepteurs CD36 et TLR (Toll-Like receptors, TLR4 et TLR6) exprimés à leur surface et initier une cascade d'inflammation (production de cytokines pro-inflammatoires, de MMPs (Matrix Metalloproteases), et de facteurs procoagulants) (Hansson et al., 2006) (Stewart et al., 2010). En parallèle les cellules musculaires lisses, constituants majoritaires de la média, tunique moyenne des artères, vont proliférer sous l'action des MMPs (exprimées par les macrophages et les cellules endothéliales) et former la chape cellulaire et fibreuse. L'infiltration des cellules immunitaires, l'apoptose des cellules et la dégradation de la matrice extracellulaire peuvent générer une chape fibreuse mince et instable formée d'un noyau nécrotique riche en lipides. L'instabilité de la plaque peut induire la formation d'un thrombus.

Ainsi, l'athérosclérose est une pathologie qui fait intervenir de façon importante des processus d'oxydation, d'inflammation, d'apoptose des cellules, de vasoconstriction artérielle locale et dans le cas de plaque d'athérome instable, des processus thrombotiques. L'effet athéroprotecteur des HDL, bien qu'il soit en grande partie attribué au rôle des HDL dans le mécanisme du Transport Retour du Cholestérol (RCT), est également attribué aux propriétés pléiotropes des HDL qui incluent leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, protectrices de l'endothélium vasculaire et antithrombotiques.

### 2.1.1. Activité antioxydante.

L'oxydation des LDL dans l'espace sous-endothélial est considérée comme un phénomène majeur dans l'initiation et le développement de la plaque d'athérome. Les LDL oxydées contiennent de nombreux lipides oxydés toxiques tels que des peroxydes lipidiques, des aldéhydes et des oxystérols.

L'oxydation de ces derniers a lieu dans le milieu intravasculaire lorsqu'il y a un déséquilibre entre facteurs pro-oxydants tels que les radicaux libres et les facteurs antioxydants (stress oxydant). Les lipides polyinsaturés subissent dans un premier temps l'action de radicaux libres oxygénés, et notamment du radical OH<sup>•</sup>, lui-même formé secondairement à la production d'anions superoxydes. Plusieurs enzymes sont impliquées dans la génération de radicaux libres oxygénés et dans la peroxydation lipidique (myeloperoxydase, NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase, lipoxygénase) (Yoshida & Kisugi, 2010)(Yoshida & Kisugi, 2010). La peroxydation des acides gras polyinsaturés conduit à la génération en chaîne des radicaux peroxy et de peroxydes lipidiques et finalement, à la fragmentation des chaînes d'acides gras et à la libération d'aldéhydes qui vont interagir avec les fonctions amines des protéines. Cette forme pro-athérogène des LDL est captée par les récepteurs scavengers des macrophages, s'accumulera au sein des macrophages spumeux et aura des effets inflammatoires multiples (induction de l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et activation TLR-dépendante des macrophages). Les LDLox sont aussi responsables d'effets délétères tels que l'apoptose des cellules endothéliales et la rupture de la chape fibreuse *via* la sécrétion de métalloprotéases (Hansson et al., 2006) (Libby, 2008). Chez l'humain, il a été démontré que les LDLox peuvent également se retrouver dans la circulation sanguine où leurs taux élevés sont considérés comme un marqueur de risque des maladies cardiovasculaires (Holvoet et al., 2001) (Schwedhelm et al., 2004) (Meisinger et al., 2005). Un des effets athéroprotecteurs des HDL consiste en la prévention ou la diminution de l'oxydation des LDL.

Un des mécanismes majoritaires par lequel les HDL réduisent l'oxydation des LDL est le transfert des lipides oxydés délétères des LDL vers les HDL. Ces lipides concernent notamment les lipides hydroperoxydes (**LOOH**) mais aussi des phospholipides oxydés à courte chaîne (oxPL). Leur transfert se fait directement entre les monocouches de phospholipides à la surface des lipoprotéines, soit de façon spontanée soit par l'intermédiaire de protéines de transfert des lipides telles que la CETP (Vila, Korytowski, & Girotti, 2002) (Girotti, 2009) (Christison, Rye, & Stocker, 1995). Les lipides oxydés transférés aux HDL sont ensuite éliminés de la circulation *via* le foie, soit sous sa forme de lipide oxydé, soit sous forme de produit inactif après inactivation par les HDL (Bowry, Stanley, & Stocker, 1992). L'**apoA-I** est notamment capable de lier et inactiver les LOOH *in vitro* ainsi que *in vivo*

après injection chez la souris ou perfusion chez l'homme (Navab et al., 2000b) (Kotosai et al., 2013). L'hydrolyse des LOOH par l'apoA-I fait appel à un processus qui implique l'oxydation de résidus méthionine de l'apoA-I et leur hydrolyse successive par des méthionine sulfoxyde réductases (Garner et al., 1998) (Panzenböck & Stocker, 2005) (Zerrad-Saadi et al., 2009). De plus les HDL transportent plusieurs enzymes anti-oxydantes telles que la **PON1**, **PAF-AH** et **LCAT** et la GSPx, capables d'hydrolyser les lipides oxydés (Navab et al., 2000a) (Mackness, Arrol, & Durrington, 1991) (Watson et al., 1995a) (A. D. Watson et al., 1995b) (Arthur, 2000) (Goyal et al., 1997). PON1 joue un rôle antioxydant important (Duell & Malinow, 1997) (Evans et al., 1997). Chez les souris invalidées pour PON1, comparées aux souris sauvages, on observe une susceptibilité accrue à l'oxydation des HDL ainsi qu'au développement de l'athérosclérose sous régime enrichi en graisses et cholestérol (Shih et al., 1998).

Les HDL petites et denses caractérisées par une concentration importante en apoA-I, une activité des enzymes PON1, LCAT et PAF-AH élevée et un ratio sphingomyéline/phosphatidylcholine faible, exercent une puissante activité antioxydante par rapport aux HDL larges et légères (telles que les HDL<sub>2</sub>) (Zerrad-Saadi et al., 2009).

### 2.1.2. Activité anti-inflammatoire.

Les **HDL** jouent un rôle anti-inflammatoire important illustré par leurs **actions multiples** dont, **la diminution de l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales, l'inhibition de l'adhérence des leucocytes à l'endothélium, et l'inhibition de l'activation des leucocytes et leur infiltration dans l'espace sous-endothélial.**

*In vitro*, dans des **cellules endothéliales** (HUVEC), les HDL peuvent inhiber, à des doses physiologiques, l'induction de l'expression des **molécules d'adhérence** VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 (Cockerill et al., 1995). Cette capacité inhibitrice des HDL pourrait être associée à l'apoA-I lipidée et à certaines espèces de phosphatidylcholines constituant les HDL et fait appel à une activation du récepteur SR-BI et de sa protéine adaptatrice PDZK1 (PDZ-containing kidney protein 1) qui déclenche une voie de signalisation intracellulaire faisant intervenir la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et eNOS (Figure 4) (Baker et al., 1999) (Baker et al., 2000) (Kimura et al., 2006). Les HDL ont également la capacité d'inhiber directement l'**adhérence** des **monocytes** et des **polynucléaires** neutrophiles à l'endothélium. Murphy *et al.* ont montré aussi bien sur des monocytes que sur des polynucléaires neutrophiles isolés de sang total humain, que les HDL essentiellement *via* l'apoA-I, diminuent l'expression de CD11b, molécule d'adhérence à la surface des monocytes et neutrophiles activés interagissant avec VCAM-1 et ICAM-1 présents à la surface de

l'endothélium. Ceci a été confirmé chez l'homme où une perfusion de HDL reconstituées chez des patients atteints de maladies vasculaires périphériques induit une diminution significative de l'expression de CD11b par les leucocytes et donc une inhibition de leur activation. L'inhibition de l'expression de CD11b par les HDL et l'apoA-I fait intervenir respectivement SR-BI et l'ATP Binding Cassette A1 (ABCA1) (Murphy et al., 2008) (Murphy et al., 2011). En effet, cette étude met en relief ce que d'autres études avaient également suggéré, l'existence d'un lien mécanistique entre efflux de cholestérol des cellules vers les HDL, régulé par ABCA1, l'ATP Binding Cassette G1 (ABCG1) et SR-BI, et les propriétés anti-inflammatoires des HDL (Yvan-Charvet et al., 2010a). Par ailleurs, des études *in vitro* montrent que la production endothéliale de **chimiokines** pro-inflammatoires telles que MCP-1, et de **cytokines** anti-inflammatoires telles que le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), peut être modulée par les HDL. Finalement, il est important de souligner que l'hydrolyse des lipides oxydés par l'apoA-I et les enzymes associées aux HDL (PON1, PAF-AH et LCAT), contribuent aux propriétés anti-inflammatoires des HDL, puisque les lipides oxydés jouent un rôle important dans l'inflammation liée à l'athérosclérose (Navab et al., 2004a).

Les HDL<sub>3</sub>, petites et denses ont une capacité supérieure aux HDL<sub>2</sub> à inhiber l'expression de la molécule d'adhérence VCAM-1 par les cellules endothéliales (Ashby et al., 1998).

### 2.1.3. Activités protectrices des HDL sur l'endothélium.

L'athérosclérose est caractérisée par une perte de fonction des cellules endothéliales. Les HDL contribuent au maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité endothéliale notamment *via* leur **activité vasodilatatrice** associée en grande partie à la stimulation de la production d'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales. Sur les cellules endothéliales, le NO participe à l'intégrité de l'endothélium en inhibant l'apoptose et stimulant la prolifération et la migration cellulaire (Cooke, 2003). Chez l'homme la perfusion intraveineuse de HDL reconstituées induit une augmentation de la vasodilatation médiée par la production endothéliale de NO et déterminée *via* l'augmentation du volume sanguin dans l'avant-bras en réponse à une infusion d'Acétylcholine (Ach) (Spieker et al., 2002). Les HDL stimulent la production de NO en contribuant à l'activité de l'eNOS par différents mécanismes :

- Les HDL interagissent avec SR-BI *via* l'apoA-I ainsi qu'avec les récepteurs S1PR<sub>1</sub> et S1PR<sub>3</sub> *via* la S1P contenue dans les HDL et induisent l'activation de la eNOS (Kimura et al., 2010) (Mineo et al., 2003) (Yuhanna et al., 2001) (Assanasen et al., 2005). L'activation de SR-BI ainsi que celle des récepteurs S1PR<sub>1</sub>/S1PR<sub>3</sub> activent l'AMPK (AMP-activated protein kinase) qui va stimuler les acteurs phosphoinositide 3-Kinase (PI3-kinase)/Akt qui à leur tour activent la

eNOS (phosphorylation de eNOS sur la sérine 1177 par Akt) (Figure 4). La liaison des HDL sur SR-BI est également capable d'induire l'activation de la eNOS par la voie de signalisation MAPK (PI3-kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase), mais le mécanisme lié à cette voie est moins clair (Mineo et al., 2003). L'activation de la eNOS est corrélée avec l'efflux de cholestérol. L'hypothèse proposée à ce jour établit que les domaines transmembranaires C-terminaux de SR-BI joueraient un rôle comme senseurs de lipides. Les modifications de la composition lipidique membranaire induiraient un changement conformationnel des domaines C-terminaux transmembranaires de SR-BI qui se propagerait vers ses motifs d'interaction aux domaines PDZ localisés à son extrémité C-terminal cytoplasmique, lequel, par des interactions avec les domaines PDZ N-terminaux de PDZK1, déclencherait la signalisation intracellulaire (Assanasen et al., 2005).

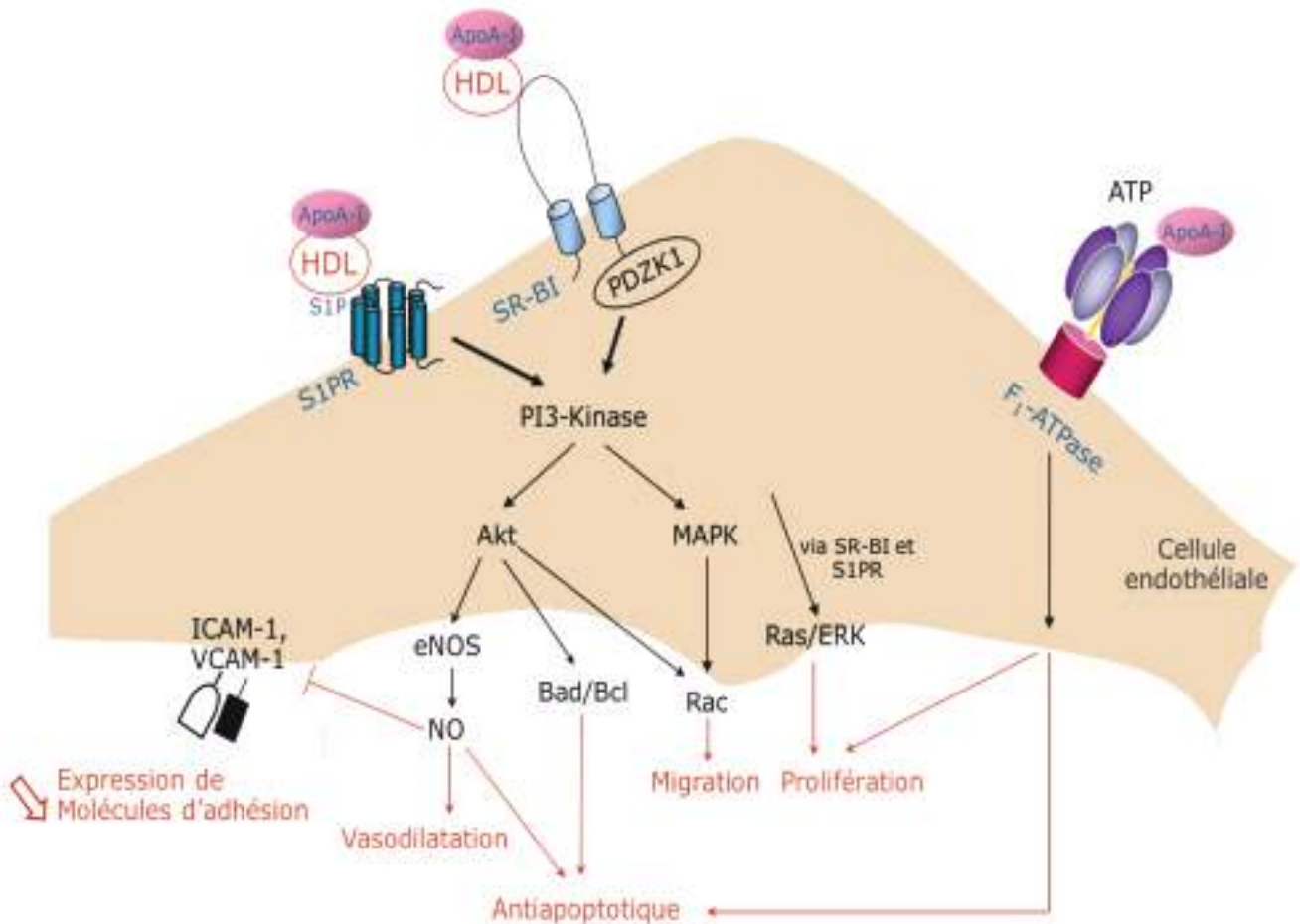
- L'apport de cholestérol par les HDL *via* SR-BI empêche l'appauvrissement en cholestérol des cavéoles par les LDLox et empêche ainsi la délocalisation et l'inactivation de la eNOS cavéolaire par les LDLox (de la Llera-Moya et al., 1999).
- Les HDL ou l'apoA-I seule, augmentent le temps de demi-vie de la eNOS *via* un mécanisme faisant intervenir ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) et Akt (Rämet et al., 2003).

En outre les HDL participent également à la **régulation de l'apoptose** des cellules endothéliales. L'équipe de A. Nègre-Salvayre, a mis en évidence, que les HDL principalement *via* l'apoA-I augmentent la résistance des cellules endothéliales aux effets cytotoxiques des LDLox (Suc et al., 1997). Cet effet antiapoptotique est associé à une interaction directe entre l'apoA-I et les cellules endothéliales qui permet d'inhiber l'augmentation de calcium intracellulaire associée à la cytotoxicité des LDLox. En effet, une grande partie de l'effet antiapoptotique des HDL (70%) serait attribuée à l'apoA-I (de Souza et al., 2010). Des travaux de notre équipe ont mis en évidence que l'apoA-I interagit avec l'ecto-F1-ATPase exprimée à la surface des cellules endothéliales (HUVEC) et induit une inhibition de l'apoptose induite par une privation en sérum et facteurs de croissance (Figure 4) (Radojkovic et al., 2009). La S1P transportée par les HDL en se liant sur son récepteur S1PR1, contribue également à l'effet antiapoptotique des HDL (Figure 4) (Kimura et al., 2003) (Okajima, Sato, & Kimura, 2009) (Mineo & Shaul, 2012). En outre le lysosphingolipide sphingosylphosphorylcholine (SPC) et le lysosulfatide (LSF) véhiculés par les HDL inhibent la voie mitochondriale caspase-dépendante déclenchant l'apoptose. La voie de signalisation passe par l'activation de Akt qui phosphoryle BAD (Bcl-2-associated death promoter), protéine pro-apoptotique qui se dissocie alors de BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large), et devient alors disponible pour inhiber

les voies mitochondriales pro-apoptotiques (J. R. Nofer et al., 2001). Les particules HDL<sub>3</sub>, petites, denses et riches en apoA-I et S1P ont une capacité supérieure à protéger les cellules endothéliales de l'apoptose par rapport aux particules HDL<sub>2</sub> (de Souza et al., 2010).

Par ailleurs les HDL ont la capacité d'induire la survie et la **migration** des cellules endothéliales. Ces effets passent par l'action de la S1P transportée par les HDL sur les récepteurs S1PR1 et S1PR3 (Kimura et al., 2003). L'induction de la migration des cellules endothéliales par les HDL implique aussi le récepteur SR-BI. Lorsque le HDL se lie à SR-BI, cela induit une activation de kinases de la famille Src, qui déclenche les voies PI3K/MAPK et la voie PI3K/AKT. Ces événements conduisent à une augmentation de l'activité de la protéine RAC qui contrôle la formation de lamellipodes qui permettront la migration endothéliale (Figure 4) (Seetharam et al., 2006). *In vivo*, la réendothélialisation de l'artère carotidienne suite à une agression électrique, processus impliquant la migration des cellules endothéliales, est diminuée chez les souris invalidées pour SR-BI ainsi que chez les souris invalidées pour l'apoA-I, qui possèdent des taux plasmatiques de HDL très faibles (Seetharam et al., 2006). Notre équipe a montré que l'apoA-I, *via* son interaction avec l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase exprimée à la surface des cellules endothéliales (HUVEC), protège contre l'apoptose et induit la **prolifération** des cellules. L'inhibiteur de l'activité ATP hydrolase de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, l'IF1 (Inhibitory Factor 1) et des anticorps spécifiques de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, inhibent ces effets de l'apoA-I. Les anticorps dirigés contre SR-BI, inhibent quant à eux, non pas l'effet antiapoptotique et mitogène de l'apoA-I libre, mais des HDL (Radojkovic et al., 2009). En parallèle l'équipe de von Eckardstein et Rohrer a récemment montré que l'activation de l'ectoF<sub>1</sub>-ATPase par la liaison de l'apoA-I, entraîne le transport transendothélial à la fois de l'apoA-I libre et de la particule HDL, permettant aux HDL d'accéder aux macrophages spumeux de l'espace sous-endothélial (Cavelier et al., 2012) (Rohrer et al., 2006). Ce processus est dépendant de la production extracellulaire d'ADP par l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase et de l'activation du récepteur purinergique P2Y<sub>12</sub>, présent à la membrane endothéliale, par cet ADP. La voie de signalisation en aval de P2Y<sub>12</sub> impliquée dans ce mécanisme n'est pas encore élucidée. De façon complémentaire, des études *in vitro*, suggèrent que les HDL agissent sur la différenciation et la fonctionnalité des précurseurs de cellules endothéliales EPC *via* l'activation de SR-BI, PI3K/akt, MAPK et eNOS (Feng et al., 2009) (Q. Zhang et al., 2010) (Sumi et al., 2007).

En conclusion, l'ensemble de ces études suggère que les HDL induisent la vasodilatation, ainsi que la survie et la migration des cellules endothéliales *via* des mécanismes qui impliquent notamment l'interaction des HDL avec SR-BI, l'interaction de l'apoA-I avec l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase et l'interaction de S1P avec les récepteurs S1PR1 et S1PR3 (Figure 4).



**Figure 4 :** Effets protecteurs et antiathérogènes des HDL au niveau de la cellule endothéliale. Les HDL se lient à SR-BI ou au récepteur S1PR via la S1P qu'elles transportent et déclenchent des voies de signalisation conduisant à la survie, la migration, la prolifération ainsi qu'à des effets vasculo-protecteurs dépendants de la production de NO tels que la diminution des molécules d'adhésion des leucocytes telles que ICAM-1 et VCAM-1. Ces effets vasculo-protecteurs induits par les HDL sont généralement sous la dépendance de signalisations intracellulaires dépendantes de la voie de signalisation de survie PI3K/Akt. La signalisation intracellulaire en aval de SR-BI se fait à travers sa protéine adaptatrice PDZK1 qui se lie au domaine C-terminal de SR-BI. L'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase est présente à la surface des cellules endothéliales. La fixation de l'apoA-I sur l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase induit la survie et la prolifération de ces cellules par une voie de signalisation qui n'est pas encore élucidée.

#### 2.1.4. Propriétés antithrombotiques.

Des données cliniques récentes ont permis d'associer taux élevés de HDL-Cholestérol (HDL-C) et risque faible de thrombose veineuse (femmes ménopausées) (Doggen et al., 2004) et inversement, taux bas de HDL-C et risque accru de thrombose veineuse (hommes < 55 ans) (Deguchi et al., 2005). L'effet antithrombotique des HDL a été démontré dans un modèle de thrombose artérielle chez le rat. Les HDL agiraient sur les 3 étapes de l'hémostase (l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse), en régulant différents acteurs dont, l'endothélium, les protéines anticoagulantes

circulantes (protéine C, protéine S, thrombomoduline) et les plaquettes (Zannis et al., 2012). Les premières études ont montré que les HDL stimulent la synthèse de prostacycline par des cellules endothéliales de porc ou humaines en culture (Fleisher et al., 1982) (Tamagaki et al., 1996). La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) en combinaison avec le NO, stimule la vasodilatation (relaxation des cellules musculaires lisses) et inhibe l'activation plaquettaire (Vane & Botting, 1995). L'endothélium dysfonctionnel possède des propriétés thrombogènes en exprimant des facteurs pro-coagulants tels que le facteur de von Willebrand (vWF) et le facteur tissulaire (FT). Une étude prospective de 4 000 individus montre que les taux de vWF circulants sont inversement corrélés avec la concentration plasmatique en HDL-C, ce qui suggère que les HDL pourraient inhiber l'expression de vWF (Conlan et al., 1993). En accord avec ceci, chez la souris, l'augmentation du NO biodisponible inhibe le relargage des corps de Weibel-Palade (granules sécrétoires de la cellule endothéliale contenant le facteur de vWF) interférant ainsi avec les étapes de l'hémostase (Qian et al., 2001). *In vitro*, les HDL reconstituées (avec de l'apoA-I et des molécules de phosphatidylcholines) diminuent l'expression endothéliale du FT induite par la thrombine (Viswambharan et al., 2004). De plus, les HDL inhibent la production par des cellules endothéliales (HUVEC), du facteur d'activation plaquettaire ou PAF (pour Platelet-Activating-Factor) qui est un phospholipide qui stimule l'adhérence et l'agrégation plaquettaire (Sugatani et al., 1996).

L'action antithrombotique des HDL est également associée à la modulation des protéines anticoagulantes circulantes, la protéine C activée (APC) et la protéine S. Ces deux protéines inactivent les facteurs Va et VIIIa impliqués dans la formation de la thrombine (molécule qui en se fixant sur les plaquettes exerce un rôle pro-coagulant). *In vitro*, les HDL peuvent augmenter l'inactivation de la protéine Va par la protéine C activée et la protéine S et inhiber ainsi la génération de thrombine (Griffin et al., 1999). En parallèle, une autre étude a montré que certains glycosphingolipides et glucosylcéramides présents dans les HDL sont des cofacteurs lipidiques de la protéine C activée et de la protéine S, et dans un nombre significatif de patients souffrant de thrombose veineuse, les taux de glucosylcéramides sont bas (Deguchi, Fernández, & Griffin, 2002) (Deguchi et al., 2001). Cette même équipe a également montré *in vitro* que la sphingosine peut diminuer la production de thrombine à la surface plaquettaire en perturbant les interactions procoagulantes entre les facteurs Va et Xa (Deguchi, Yegneswaran, & Griffin, 2004).

Une partie de l'effet antithrombotique des HDL est attribuée à l'effet des HDL directement sur les plaquettes. Lorsque des plaquettes isolées humaines sont incubées avec des HDL reconstituées ou des HDL natives, on observe une diminution de l'agrégation plaquettaire de l'ordre de 40% (A. C. Calkin et al., 2009) (J. Nofer et al., 1998) (Badrnya, Assinger et al., 2013). Finalement, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les HDL reconstituées peuvent exercer un rôle antithrombotique en agissant sur la production des plaquettes à partir des cellules progénitrices, les



mégacaryocytes et ce, de façon ABCG4 dépendante (membre de la famille des transporteurs ABC pour ATP binding cassette transporters, suspecté d'être impliqué dans le transport de cholestérol). En accord avec ces études, un essai clinique contrôlé contre placebo effectué sur un petit nombre de patients atteints d'une maladie vasculaire périphérique (20 hommes, d'une moyenne d'âge de 68+/-10 ans) a montré qu'une injection unique de HDL reconstituées diminue significativement le nombre de plaquettes (Murphy et al., 2013). L'ensemble des activités antithrombotiques des HDL est représenté Figure 5.

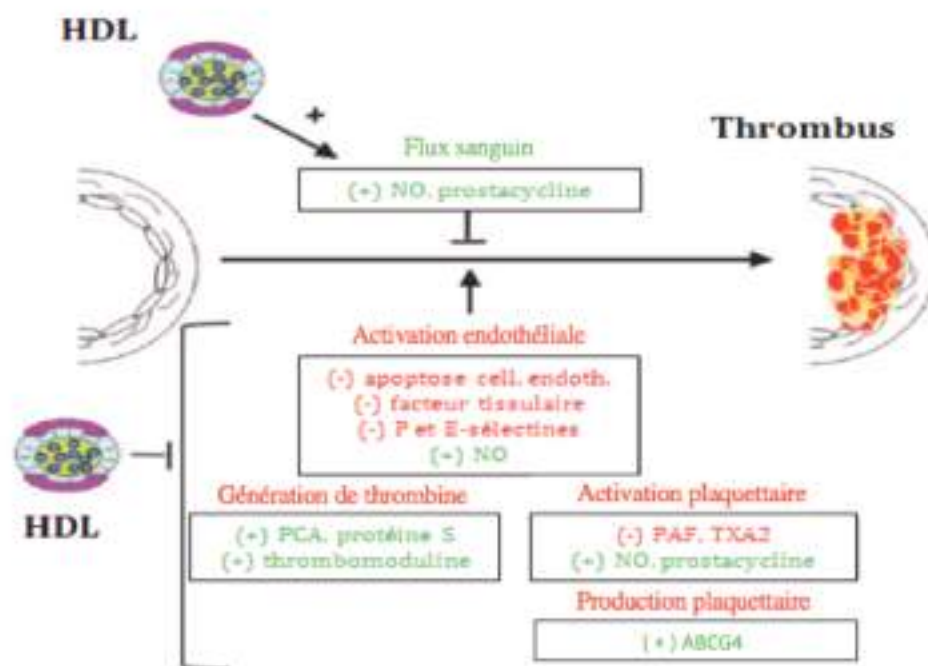


Figure 5 : Effets antithrombotiques des HDL. Les HDL augmentent le flux sanguin *via* la production de NO et de prostacycline. Les cellules endothéliales (cell. endoth.) sont également moins activées avec une diminution de l'apoptose, l'inhibition du facteur tissulaire, une baisse de l'expression des molécules d'adhérence telles que la P et E-sélectines ainsi que la génération de NO. Les HDL permettent aussi de diminuer la génération de thrombine en augmentant les activités de la protéine C activée (APC) et de la protéine S et en augmentant la production de thrombomoduline endothéliale. L'antagonisme des HDL sur les plaquettes entraîne une diminution de la synthèse du Platelet-Activating Factor (PAF) et du thromboxane A2 (TXA2) ainsi qu'une augmentation de synthèse du NO et de la prostacycline. D'après (Mineo et al, 2006).

## 2.2. Le Transport Retour du Cholestérol (RCT).

Le Transport Retour de Cholestérol, est un processus au cours duquel le cholestérol excédentaire des cellules périphériques, et notamment des macrophages de l'espace sous-endothélial, est capté et estérifié au sein des HDL puis ramené au foie où il sera ensuite sécrété dans la bile sous forme de cholestérol libre ou après transformation en acides biliaires, réduisant de ce fait l'importance des lésions athéromateuses.

Ce processus de RCT joue donc un rôle majeur dans la protection vis à vis de l'athérosclérose (Rosenson et al., 2012). Dans ce contexte, il apparaît essentiel d'étudier le mécanisme du RCT allant de l'efflux de cholestérol des macrophages vers les HDL jusqu'à la captation hépatique des HDL et l'excrétion biliaire en cholestérol et acides biliaires.

### 2.2.1. La biogénèse des HDL : efflux cellulaire du cholestérol et remodelage plasmatique.

#### 2.2.1.1. Lipidation de l'apoA-I et formation des particules HDL $\alpha$ : rôle de ABCA1.

La biosynthèse et le remodelage plasmatique des HDL sont des processus complexes qui se font en plusieurs étapes successives et font intervenir différents partenaires protéiques. La biogénèse des HDL débute par la production et la sécrétion d'apoA-I (70% par le foie et 30% par l'intestin) et dans une moindre proportion de apoA-II (par le foie). Ces apolipoprotéines acquièrent rapidement des phospholipides et du cholestérol libre des mêmes tissus qui ont permis leur synthèse *via* le transporteur ABCA1 retrouvé à la membrane plasmique par un mécanisme d'efflux actif (après hydrolyse d'ATP) (Cavelier et al., 2006a). ABCA1 est une glycoprotéine composée de 2 261 acides aminés, qui comporte 12 domaines transmembranaires et deux sites intracellulaires de liaison à l'ATP nécessaires à son activité. La lipidation par ABCA1 de l'apoA-I libre constitue l'étape limitante dans le maintien des concentrations plasmatiques d'HDL et cette première étape du transport retour du cholestérol est essentielle (Lee & Parks, 2005). La lipidation de l'apoA-I permet la formation des précurseurs discoïdaux HDL pré $\beta$ . Ces particules pré $\beta$  acquièrent du cholestérol libre et des phospholipides *via* l'ABCA1 présent à la surface des cellules périphériques et notamment des macrophages de l'espace sous-endothélial, contribuant ainsi à leur maturation en particules HDL  $\alpha$ .

Le rôle du transporteur ABCA1 dans l'efflux de cholestérol cellulaire et la biogénèse des HDL a été mis en évidence en 1999, quand il a été identifié comme étant le gène muté responsable de la

maladie de Tangier. A ce jour, plus de 70 mutations, affectant l'efflux de cholestérol, ont été identifiées chez l'homme (Singaraja et al., 2003). Ainsi, on retrouve des mutations affectant la maturation d'ABCA1 ou la fixation de l'apoA-I à ABCA1. Il existe 2 syndromes associés aux mutations de ABCA1 : l'**hypoalphalipoprotéinémie familiale** et la **maladie de Tangier**. Une des formes de l'hypoalphalipoprotéinémie familiale est causée par des mutations hétérozygotes de ABCA1 (forme autosomique dominante). Les patients atteints de ce syndrome ne présentent pas de symptôme clinique particulier mais peuvent présenter des taux de HDL-C et d'apoA-I diminués par rapport aux patients contrôles (Kral & Becker, 2007) (Brooks-Wilson et al., 1999) (Schaefer et al., 1980) (Couvert & Carrié, 2011). La **maladie de Tangier** est quant à elle causée par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites de ABCA1 (Mott et al., 2000) (Brunham et al., 2015). Les individus atteints de cette maladie sont notamment caractérisés par : un dépôt anormal de lipides dans plusieurs tissus ; des taux extrêmement bas de HDL-C variant entre 1% et 10% par rapport à des individus du même âge et sexe, et des faibles taux d'apoA-I (0.040 g/L) résultant d'un catabolisme accéléré de l'apoA-I libre par le rein. De plus cette maladie est caractérisée par une élévation des taux de triglycérides (>2 g/L) et une diminution des taux de LDL-Cholestérol (LDL-C) chez certains patients (Daniil et al., 2011) (Brunham et al., 2006a) (Orso et al., 2000) (Timmins et al., 2005) (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010) (Singaraja et al., 2003) (Schaefer et al., 1980) (von Eckardstein, 2006). Les faibles taux de LDL-C pourraient s'expliquer par un RCT diminué pouvant modifier le métabolisme hépatique. Il est également possible que puisque les taux de HDL-C sont très bas, le transfert de cholestérol entre les HDL et les LDL/VLDL *via* la CETP soit diminué (Hobbs & Rader, 1999). Les symptômes de la maladie de Tangier sont divers et sont différents selon l'âge (splénomégalie, neuropathies,...) (Couvert & Carrié, 2011)(Hobbs & Rader, 1999). Le risque de développer une pathologie cardiovasculaire de façon précoce chez les patients souffrant de la maladie de Tangier existe, mais il n'est pas proportionnel à la baisse du HDL-C (Frikke-Schmidt, 2010). Les homozygotes (souffrant de la maladie de Tangier) auraient un risque augmenté d'un facteur 3 à 6 et les hétérozygotes (patients atteints d'hypoalphalipoprotéinémie familiale) un risque accru d'environ 1,5 fois (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010) (Oram & Vaughan, 2006) (Serfaty-Lacrosniere et al., 1994). Toutefois, dans certaines familles porteuses on n'observe pas cette augmentation du risque (Frikke-Schmidt, 2010), ce qui pourrait s'expliquer par les faibles taux de LDL-C retrouvés chez ces patients (Schaefer et al., 1980).

Une méta-analyse de 11 études cas-témoins indépendantes, avec un total de 5 416 patients coronariens et 20 897 sujets sains, a été réalisée afin d'évaluer l'association du polymorphisme d'un seul nucléotide ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) rs4149313 dans le locus de ABCA1 avec le risque de maladie coronarienne (les infarctus du myocarde, les angines de poitrine instables, les revascularisations coronaires ou les décès associés à une maladie coronarienne). Le SNP rs4149313 a

été associé à un risque augmenté de maladie coronarienne dans la population asiatique, mais cette association n'a pas été retrouvée dans la population caucasienne (Fan et al., 2014). Bien que les différences des relations entre génotype et phénotype entre les ethnies soient mal comprises, une explication possible de ce résultat serait que l'ethnicité constitue une variable démographique importante contribuant au développement et à la progression des maladies coronariennes.

Les études épidémiologiques mais également de nombreuses études réalisées chez des modèles animaux montrent que ABCA1 est une protéine clé dans l'efflux du cholestérol des macrophages, le RCT et la protection contre l'athérosclérose (McNeish et al., 2000) (M. D. Wang et al., 2007) (Aiello et al., 2002) (van Eck et al., 2002) (Van Eck et al., 2006) (Yvan-Charvet et al., 2010b) (Zhao et al., 2010). L'expression d'ABCA1 est régulée à plusieurs niveaux par de nombreux acteurs comme les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferator-Activating Receptor) et LXR (Liver X Receptor), ainsi que plusieurs miRNA, dont la famille des miR33 qui exercent respectivement un contrôle positif et négatif sur l'expression d'ABCA1. Des agonistes PPAR, des agonistes LXR ou des inhibiteurs de ces miRNA sont par conséquent quelques exemples des molécules pharmacologiques qui peuvent s'avérer intéressantes dans la prévention et/ou le traitement de l'athérosclérose. Les PPARs représentent un sous-groupe de la famille des récepteurs nucléaires incluant le PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  et PPAR $\delta$ . Ils régulent l'expression des gènes qui contrôlent le métabolisme lipidique en s'hétérodimérisant avec d'autres récepteurs nucléaires, les Retinoid X Receptors (RXR). Le PPAR $\gamma$  est fortement exprimé dans le tissu adipeux où il joue un rôle dans la différenciation adipocytaire, et est également exprimé dans les macrophages, dans lesquels il serait impliqué dans l'absorption des lipides et la formation des cellules spumeuses. Le PPAR $\delta$  est fortement exprimé dans le cerveau, le tissu adipeux et le foie et joue un rôle important dans le métabolisme des acides gras. PPAR $\alpha$  est exprimé dans le foie, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses et régule l'expression des gènes liés au métabolisme des acides gras ainsi que l'expression de nombreux gènes clés dans le métabolisme des HDL (ABCA1, Lipoprotéine Lipase ou LPL, l'apoC-III, la PLTP, l'apoA-I, l'apoA-II,...). Parmi les ligands de PPAR $\alpha$  couramment utilisés en clinique se trouvent les fibrates (Fénofibrate, Bézafibrate, Ciprofibrate, Gemfibrosil) utilisés comme médicaments hypolipémiants (Farnier, Bonnet, Bruckert, Ferrières, & Paillard, 2006). En accord avec leur capacité d'augmenter les concentrations de HDL-C et diminuer celles de triglycérides et LDL-C (Jun et al., 2010), leurs effets sur l'incidence des maladies coronariennes semblent être plus prononcés chez des patients avec des taux de triglycérides élevés (200 mg/dL) et/ou HDL-C faibles (40 mg/dL). La thérapie à base de fibrates présente certaines limitations, telles que son efficacité qui dépend de la population ciblée (Staels, 2010). Face à cette problématique, des nombreux agonistes PPAR très sélectifs et puissants ont été développés et sont actuellement testés dans différentes phases des essais cliniques : K-877 (agoniste de PPAR $\alpha$ , phase III), GFT505 (agoniste PPAR dual  $\alpha/\delta$ , phase IIb),

INT-131 (agoniste de PPAR $\gamma$ , phase II) et DSP-8658 (modulateur de PPAR $\alpha/\gamma$ , phase I) (Fruchart, 2013). Les agonistes LXR modulent également l'expression de ABCA1 (Larrede et al., 2009). Il existe deux isoformes du récepteur nucléaire LXR : les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ . Parmi les gènes dont l'expression est régulée par les LXR, on retrouve des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (CETP) et le RCT (ABCA1, ABCG1, ABCG5/8 hépatique, CYP7A1) (Naik et al., 2006). Cependant les agonistes LXR sont également impliqués dans la modulation de l'expression de deux gènes clés dans la biosynthèse des acides gras, FAS (Fatty Acid Synthase) et SREBP-1c (Sterol-Regulatory Binding Protein 1c), et induisent, de ce fait, des effets secondaires dont la stéatose hépatique et l'hypertriglycéridémie (Calkin & Tontonoz, 2012). Ces effets ont notamment été attribués aux LXR $\alpha$ , qui sont fortement exprimés dans le foie. Afin de minimiser ces effets secondaires, les stratégies thérapeutiques actuelles se focalisent sur le développement d'agonistes sélectifs LXR $\beta$  et/ou de ligands qui agissent de façon sélective dans des tissus spécifiques (Lehrke et al., 2005). BMS-852927 est un nouveau agoniste sélectif LXR $\beta$ , dont l'effet chez l'homme a récemment été étudié. Chez les individus sains ou hypercholestérolémiques, le BMS-852927 induit les voies du RCT (induction des ARNm ABCA1 et ABCG1 dans le sang après un traitement de 4h) de façon similaire à celle observée chez la souris et le singe cynomolgus. Cependant, le traitement a également induit des effets secondaires indésirables dont une augmentation des triglycérides plasmatiques et hépatiques et du LDL-C et une diminution des neutrophiles circulants qui n'avaient pas été observés chez les modèles pré-cliniques (Kirchgessner et al., 2016). Finalement les inhibiteurs de la famille de miR33 sont également capables de moduler ABCA1 et ont fait l'objet de nombreuses études (Marquart et al., 2013) (Rottiers et al., 2013). Rayner et al. ont montré l'efficacité et la tolérance d'un anti-miR33, l'oligonucléotide anti-sens modifié 2F'/MOE anti-miR33, qui chez la souris conduit à une régression de l'athérosclérose et induit l'efflux du cholestérol des macrophages au sein de la plaque, et chez des primates, des singes verts africains augmente la capacité d'efflux de cholestérol des macrophages et les taux de HDL-C (Rayner et al., 2011a) (Rayner et al., 2010) (Rayner et al., 2011b).

#### 2.2.1.2. Maturation et remodelage des HDL.

L'efflux du cholestérol excédentaire des cellules périphériques et notamment des macrophages vers les HDL  $\alpha$  matures nouvellement formées met en jeu deux transporteurs présents à la membrane plasmique des macrophages, ABCG1 *via* un efflux actif ATP dépendant, et dans une moindre mesure le récepteur CLA-1 ou son homologue murin SR-BI *via* un efflux passif (ne nécessitant pas d'ATP) qui pourrait impliquer le remodelage des domaines de cholestérol de la membrane cellulaire (Cavelier et al., 2006a) (de la Llera-Moya et al., 1999)(Ji et al., 1997). L'équipe du Professeur Von Eckardstein, a montré que l'efflux de cholestérol des cellules endothéliales

vasculaires vers les HDL matures *via* ABCG1 et SR-BI, fait intervenir un processus de transcytose (transport vésiculaire d'un côté à l'autre d'une cellule) des HDL à travers les cellules endothéliales, suivi d'un processus de resécretion (Rohrer et al., 2009) (Cavelier et al., 2006b) (Rohrer et al., 2006). Les auteurs ont montré, sur des cellules endothéliales isolées d'aorte bovine, que l'invalidation de ABCG1 et dans une moindre mesure celle de SR-BI, entraînent une diminution de la transcytose des HDL, sans modification du transport paracellulaire (perméabilité de l'inuline non altérée).

La capacité d'efflux de cholestérol (**CEC**) des HDL à partir des macrophages mais également les activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires des HDL sont compromises par des conditions d'inflammation aiguë ou chronique ainsi que par des conditions de décompensation métabolique. Durant l'inflammation, la synthèse des protéines inflammatoires produites par le foie augmente très rapidement, en particulier celle de la Sérum Amyloïde A (**SAA**), protéine véhiculée par les HDL (Malle et al., 1993). La SAA peut alors déplacer l'apoA-I de sa liaison aux HDL, altérant ainsi la CEC des HDL qui est majoritairement régulée par l'apoA-I. La SAA peut également déplacer les enzymes antioxydantes et anti-inflammatoires transportées par les HDL telles que PON1, PAF-AH et LCAT, affectant ainsi les propriétés des HDL associées à ces enzymes (Banka et al., 1995).

Les HDL nouvellement générées se retrouvent alors dans la circulation où un processus de maturation et de remodelage prend place.

Dans un premier temps, les HDL discoïdaux sont remodelées par la Lecithin Cholesterol Acyl Transferase (**LCAT**) qui, stimulée par son cofacteur naturel, l'apoA-I estérifie le cholestérol libre cellulaire capté par les HDL (Fielding et al., 1972). Ce dernier devient hydrophobe et va alors s'accumuler au cœur des particules HDL et augmenter leur taille, permettant la conversion des HDL discoïdaux en HDL matures sphériques, et ensuite des HDL<sub>3</sub>, particules petites et denses, en HDL<sub>2</sub>, particules larges et moins denses (Rajaram OV, 1986).

Les **HDL<sub>2</sub>** vont ensuite subir l'action des diverses protéines :

- La Phospholipid Transfer Protein (**PLTP**) qui permet le transfert des phospholipides des VLDL et LDL vers les HDL (Tall et al., 1983) (Huuskonen et al., 2001).

- La Cholesteryl Ester Transfer Protein (**CETP**) qui transfère le CE, produit dans les HDL sous l'action de la LCAT, vers les LDL et VLDL en échange de leurs TG (Hopkins & Barter, 1980) (Barter et al., 2003). Son effet aboutit à la déplétion des HDL en esters de cholestérol avec un enrichissement en triglycérides conduisant à une réduction de leur taille (Lewis & Rader, 2005). Cette protéine est

absente chez la souris. La CETP en transférant le cholestérol estérifié des HDL vers les LDL offre une voie alternative de retour du cholestérol au foie *via* le LDLR.

- La Lipase Hépatique (**LH**) et la Lipase Endothéliale (**LE**) qui hydrolysent les phospholipides et les triglycérides des HDL matures (HDL<sub>2</sub>) permettant d'obtenir : des particules HDL plus petites et plus denses appelées **remnants de HDL<sub>2</sub>** (par rapport aux HDL<sub>2</sub>, perte de 60% de triglycérides et 15% de phospholipides) qui seront captées par le foie (Maugeais et al., 2003) (S. Santamarina-Fojo et al., 2004) (Annema & Tietge, 2011). La PLTP permet également la fusion de deux molécules d'HDL<sub>3</sub> conduisant à la formation d'une particule HDL<sub>2</sub> plus large (avec perte d'une apoA-I faiblement lipidée) (von Eckardstein et al., 1996).

La maturation des HDL est elle-même source de précurseurs de HDL : l'apoA-I libre et les pré-β HDL peuvent être générés lors de la conversion de HDL<sub>3</sub> en HDL<sub>2</sub> par la LH (Barrans et al., 1994), la PLTP (von Eckardstein et al., 1996) et la CETP (Liang, Rye, & Barter, 1994). Le métabolisme des chylomicrons et des VLDL permet également de générer des précurseurs d'HDL (mécanisme impliquant notamment l'hydrolyse de triglycérides).

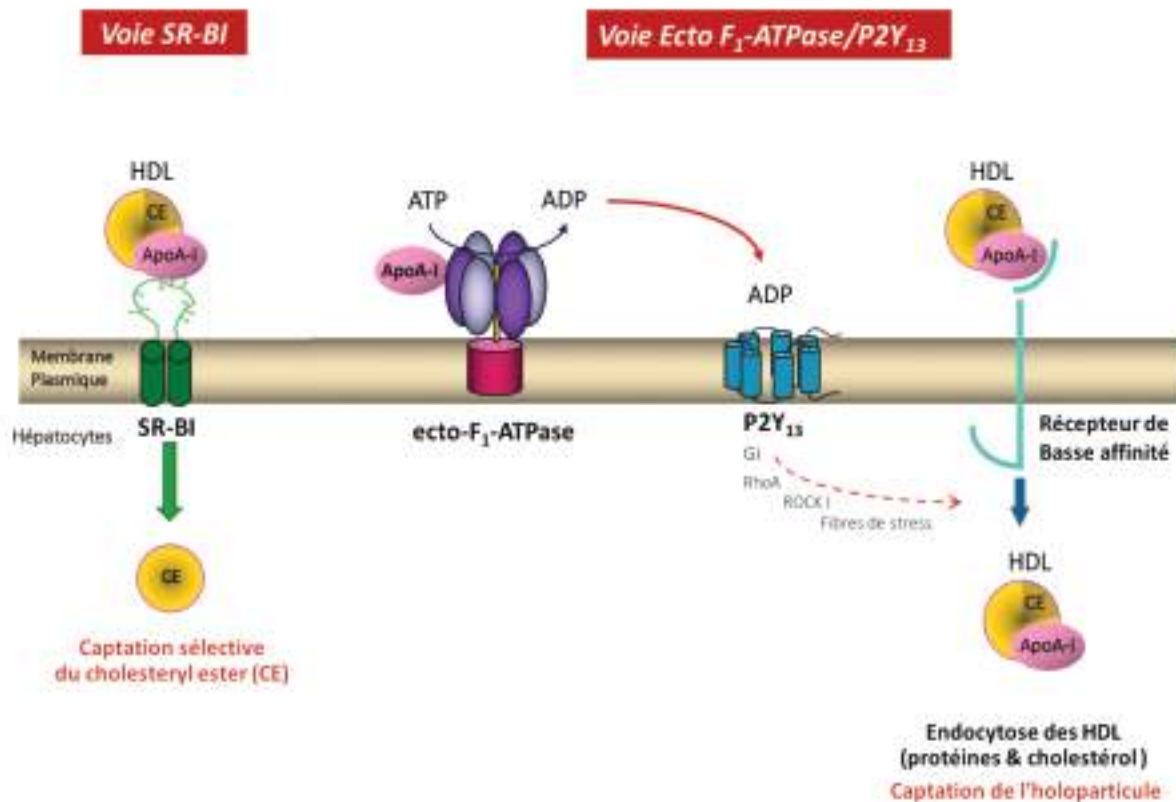
Les remodelages plasmatiques subis par les différentes classes de HDL sont représentés dans la Figure 6.

La CETP est une protéine de 476 acides aminés qui est essentiellement retrouvée associée aux HDL. Les variations génétiques dans le locus du gène de la CETP peuvent être responsables d'une perte de son activité qui va avoir pour conséquence une altération du profil lipoprotéique. Lors de la perte complète de l'activité de la CETP, une hypercholestérolémie modérée associée à une forte augmentation des taux de HDL-C (>3 mmol/L soit 120 mg/dL) est observée ainsi qu'une réduction du catabolisme des apoA-I et apoA-II (Kral & Becker, 2007). A l'inverse, les taux de LDL-C vont avoir tendance à diminuer. Au Japon, la déficience en CETP semble être une cause fréquente d'hyperalphalipoprotéïnémie (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). Une étude réalisée sur une population japonaise incluant 19 044 hommes et 29 487 femmes, a montré que les sujets présentant des taux très élevés ou modérés de HDL-C (≥ 80 mg/dL et 60-79 mg/dL respectivement), les porteurs de mutations de la CETP inclus, sont protégés contre les maladies coronariennes (les infarctus du myocarde et les angines de poitrine) (Moriyama et al., 1998). En plus des mutations perte de fonction, plusieurs polymorphismes ont été détectés dans le locus de la CETP. L'association entre ces polymorphismes et les lipides plasmatiques ainsi que le risque coronarien est controversée. Dans le cadre du Copenhagen City Heart Study, une étude prospective sur 34 ans incluant 10 261 individus, a combiné l'analyse des deux polymorphismes en déséquilibre de liaison associés à une augmentation du HDL-C, TaqIb (rs708272), SNP dans le gène CETP le plus investigué et rs1800775, SNP situé dans le

promoteur du gène CETP. Il a été montré une réduction de 24% des événements ischémiques et une diminution de 12% de la mortalité toute cause confondue, chez les sujets homozygotes pour ces 2 polymorphismes par rapport aux individus non porteurs de ces allèles (Johannsen et al., 2012). Les **études d'association pangénomique** ou **GWAS** (Genome-Wide Association Studies) consistent à entièrement génotyper un grand nombre de patients atteints d'une pathologie donnée et leurs contrôles, afin de chercher des SNPs potentiellement informatifs par rapport à cette pathologie recueillis grâce au projet HapMap (Pearson & Manolio, 2008). Un GWAS ayant étudié l'association de variants génétiques avec les lipides plasmatiques chez plus de 100 000 individus d'ascendance européenne, a montré que parmi les 95 loci identifiés dans cette étude, le locus de la CETP était le plus fortement associé au taux de HDL-C dans le génome entier ( $p=7 \times 10^{-380}$ , pour le SNP dans le gène CETP rs3764261). Cependant, cette étude n'a trouvé aucune association entre les SNPs dans les locus du gène CETP et le risque coronarien dans une population de 24 607 individus coronariens et 66 197 contrôles (Teslovich et al., 2010). Ainsi, les études épidémiologiques ayant évalué l'association entre les mutations et polymorphismes dans le gène CETP et le risque cardiovasculaire offrent une réponse ambiguë. Les études ayant montré un risque cardiovasculaire diminué chez les individus présentant une absence ou diminution de la CETP (Inazu et al., 1990), ont soutenu l'hypothèse selon laquelle, l'inhibition de la CETP pourrait être athéroprotectrice. Cette hypothèse a conduit au développement d'inhibiteurs pharmacologiques de la CETP développés pour restorer un profil lipoprotéique favorable en augmentant les taux de HDL-C et en diminuant les taux de LDL-C (Rader, 2016) (Rader & DeGoma, 2014). Le premier inhibiteur de la CETP développé fut le Torcetrapib (Pfizer), mais l'essai clinique visant à tester son efficacité a été arrêté à cause d'une augmentation de la mortalité chez les patients traités, qui fut ultérieurement attribuée à une augmentation de la pression artérielle. Après cet échec, des nouvelles molécules ont été développées : le Dalcetrapib (Roche) et l'Evacetrapib (Eli Lilly & compagny) ; cependant, les essais cliniques associés à leur évaluation ont été arrêtés à cause d'un manque d'efficacité du traitement sur le risque d'événements cardiovasculaires, malgré une augmentation du HDL-C. A ce jour l'Anacetrapib (Merck) est le seul inhibiteur de la CETP en cours d'évaluation ; la fin des essais cliniques de phase III, REVEAL (Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification), prévue pour janvier 2017, déterminera si l'anacetrapib réduit le risque d'événements coronariens majeurs chez des patients à risque cardiovasculaire élevé présentant des taux de LDL-C bas, et traités avec des statines (ClinicalTrials.gov identifier : NCT01252953). L'effet athérogène de la CETP pouvant être déterminé par le contexte métabolique, il est important de souligner la nécessité d'une stratification des patients à traiter avec des inhibiteurs de la CETP. En effet les individus présentant à la fois une forte activité de la CETP, et de faibles taux de HDL-C, pourraient être les plus aptes à répondre aux inhibiteurs de la CETP (T. Gautier et al., 2016).

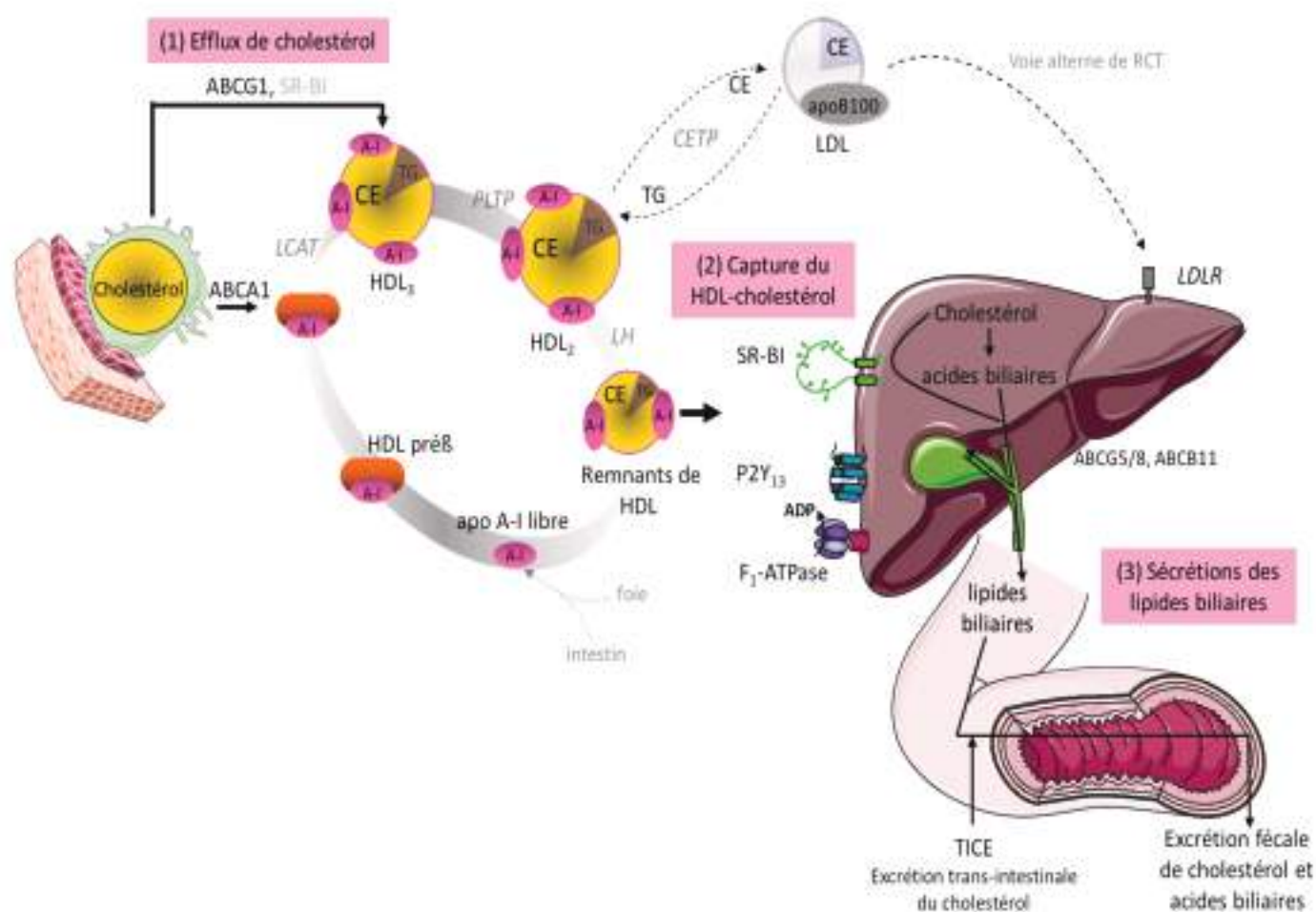






**Figure 7 :** Captation hépatique du HDL-C par la voie SR-BI et la voie ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ . La voie SR-BI est responsable de la captation sélective du cholestérol estérifié contenu dans le cœur des HDL. La voie ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ , est responsable de l'endocytose de l'holoparticule HDL (composante protéique et lipidique). Dans cette voie, l'apoA-I, apolipoprotéine majoritaire des HDL, se lie à l'ecto- $F_1$ -ATPase en surface des hépatocytes, et active son activité ATP hydrolase. L'ADP extracellulaire ainsi généré, va activer spécifiquement le récepteur purinergique  $P2Y_{13}$ , qui à son tour, induit une cascade de signalisation intracellulaire qui permet l'endocytose de la particule HDL par un récepteur de basse affinité.

La Figure 8 récapitule les étapes du RCT qui ont été décrites dans les paragraphes précédents.



**Figure 8 :** Représentation schématique des différentes étapes du transport retour du cholestérol (RCT). Les remnants de HDL sont captés par le foie soit par SR-BI qui capte le cholestérol estérifié contenu dans le cœur des HDL, soit par la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> qui permet l'endocytose de la particule HDL entière (composante protéique et lipidique). Au niveau du foie, le cholestérol contenu dans les HDL sera préférentiellement sécrété dans la bile soit sous forme de cholestérol libre, soit après transformation en acides biliaires, puis ultérieurement excrété dans les fèces. La CETP en transférant le cholestérol estérifié des HDL vers les LDL offre une voie alternative de retour du cholestérol au foie via le LDLR. Finalement, il existe une autre voie qui contribue à l'élimination du cholestérol : la voie trans-intestinale d'excrétion du cholestérol (TICE). MΦ : macrophages, A-I : apoA-I, CE : cholestérol estérifié, FC : cholestérol libre, PL : phospholipides, TG : triglycérides.

### 2.2.3. L'Élimination biliaire du cholestérol.

Au niveau du foie, le cholestérol est pris en charge pour être sécrété dans la bile soit sous forme de cholestérol libre soit sous forme d'acides biliaires après transformation par différents cytochromes. Environ 80 à 95% du cholestérol retrouvé dans la bile sous forme libre ou d'acide biliaire proviennent des lipoprotéines LDL et HDL, le reste est issu de la synthèse de novo par le foie

(Empen et al., 1997). Cependant il est intéressant de noter que selon l'origine du cholestérol (HDL ou LDL), son devenir va être différent. Le cholestérol en provenance des HDL est dirigé vers les canalicules biliaires (voie extralysosomale) pour constituer la principale source de cholestérol biliaire, alors que le cholestérol en provenance des LDL passe par une voie intralysosomale et synthétisera la majeure partie des acides biliaires (le cholestérol en provenance des LDL peut également être stocké dans le foie et être remis en circulation) (Carey, 1997) (C.C. Schwartz et al., 1978a) (C.C. Schwartz et al., 1978b) (S. J. Robins & Fasulo, 1997) (Cohen, 1999). Chez la souris, le HDL-C est préférentiellement utilisé par rapport au LDL-C pour la sécrétion biliaire en cholestérol et acides biliaires (Mardones et al., 2001) (Botham & Bravo, 1995).

### 2.2.3.1. La biosynthèse des acides biliaires.

Les acides biliaires sont des molécules solubles amphipatiques synthétisées dans les hépatocytes périverseux à partir du cholestérol (Twisk *et al.* 1995). Leur propriété amphipatique est due à leur pôle hydrophobe constitué d'un noyau stérol et à leurs groupements hydroxyles fortement hydrophiles. Dans la bile, les acides biliaires sont les molécules majoritaires puisqu'elles représentent environ 85% de la masse sèche, le cholestérol libre ne représentant que 10%. Leur sécrétion intestinale favorise l'absorption des lipides intestinaux. Chez l'homme la biosynthèse des acides biliaires qui a lieu exclusivement au niveau du foie, représente environ 50% de l'élimination du cholestérol dans l'organisme (Alrefai & Gill, 2007). Dans le foie, au moins 17 réactions enzymatiques interviennent dans la modification du noyau de cholestérol (Sundaram et al., 2008) (Lefebvre et al., 2009). La voie neutre est considérée comme la voie principale de biosynthèse d'acides biliaires. Dans cette voie la réaction limitante dans la production des acides biliaires est l'hydroxylation en  $\alpha$  du carbone 7 du cholestérol par l'enzyme réticulaire, la cholestérol-7- $\alpha$ -hydroxylase (Cyp7a1) pour donner le 5-cholestérol-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol (7- $\alpha$ -hydroxycholestérol). Des études ont montré que les souris invalidées pour Cyp7a1 présentaient une production d'acides biliaires réduite de 75% (Schwarz et al., 1998) (Ishibashi et al., 1996). Ces résultats ont permis la mise en évidence de la voie alternative (ou voie acide) de synthèse des acides biliaires. Cette voie est dépendante d'une première hydroxylation du cholestérol en position 25 ou 27, respectivement par l'enzyme réticulaire cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) ou l'enzyme mitochondriale stérol 27-hydroxylase (Cyp27A1). Alors que le 25-hydroxycholestérol n'est que peu utilisé pour la synthèse des acides biliaires, le 27-hydroxycholestérol sera à nouveau hydroxylé en position 7 par la 25-hydroxycholestérol 7- $\alpha$ -hydroxylase (Cyp7B1) pour contribuer majoritairement à la synthèse des acides biliaires. A partir de cette étape la voie neutre et alternative se regroupent. Les intermédiaires 7 $\alpha$ -hydroxy formés par Cyp7a1 et Cyp7b1 vont subir l'action de la 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta$ 5-C27-stéroid oxydo-réductase (HSD3B7). Le

produit de l'activité de HSD3B7 pourra ensuite emprunter 2 voies différentes dans lesquelles interviennent différentes réactions enzymatiques. Dans le cas où il interagit avec la stérol 12- $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1), il formera l'acide cholique (CA). Dans le cas contraire, il formera l'acide chénodésoxycholique (CDCA). Chez l'homme, le CA et le CDCA sont produits dans des proportions similaires. Chez la souris, le CDCA est majoritairement converti en acide muricholique (MCA) et on retrouve un ratio acide cholique/acide  $\beta$ -muricholique de 1.4:1 (Huang et al., 2009) (Brites et al., 1998) (Uchida et al., 1984). Ces acides biliaires formés dans le foie constituent les acides biliaires primaires et sont conjugués à la taurine (conjugaison majoritaire chez la souris) et à la glycine (conjugaison majoritaire chez l'homme) (Sundaram et al., 2008) (Lefebvre et al., 2009). La conjugaison des acides biliaires, augmente leur solubilité et les rend donc imperméables aux membranes cellulaires, favorisant le stockage des acides biliaires dans la vésicule biliaire (Chiang, 2009). Des multiples transporteurs permettent l'export des acides biliaires en dehors du foie ou empêchent leur ré-absorption (Lefebvre et al., 2009). Au niveau de l'iléon mais surtout au niveau du colon, les acides biliaires primaires conjugués sont déconjugués et déshydroxylés (7- $\alpha$  déshydroxylation) par des enzymes du microbiote intestinal en acides biliaires secondaires (lithocholate (LCA) et déoxycholate (DCA)). La 7- $\alpha$  déshydroxylation fait intervenir des enzymes bactériennes, les hydrolases des sels biliaires (BSHs), exprimées par différentes espèces bactériennes appartenant au genre *Clostridium* (Wells et al., 2003) (Kitahara et al., 2001). Cette déshydroxylation facilite la réabsorption des acides biliaires par les cellules épithéliales du colon.

### 2.2.3.2. Transport hépato-biliaire des acides biliaires.

La sécrétion canaliculaire des acides biliaires se fait *via* des transporteurs par un mécanisme actif, dépendant de l'hydrolyse d'ATP. Le principal transporteur des acides biliaires au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes est la **BSEP** (Bile Salt Export Pump), également appelé **ABCB11** (Figure 9) (Dijkers & Tietge, 2010). Les souris transgéniques surexprimant BSEP présentent une augmentation du flux et des sécrétions biliaires en cholestérol, phospholipides et acides biliaires, sans modification de l'expression des transporteurs hépato-biliaires de cholestérol (ABCG5/G8) et phospholipides (ABCB4), suggérant que les sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides sont couplées quantitativement à la sécrétion d'acides biliaires (Henkel et al., 2011). Chez la souris, la protéine **MDR1** (Multidrug Resistant protein) exprimée au niveau canaliculaire des hépatocytes serait également impliquée dans le transport d'acides biliaires dans la bile, mais dans une moindre mesure que BSEP (Lam et al., 2005).

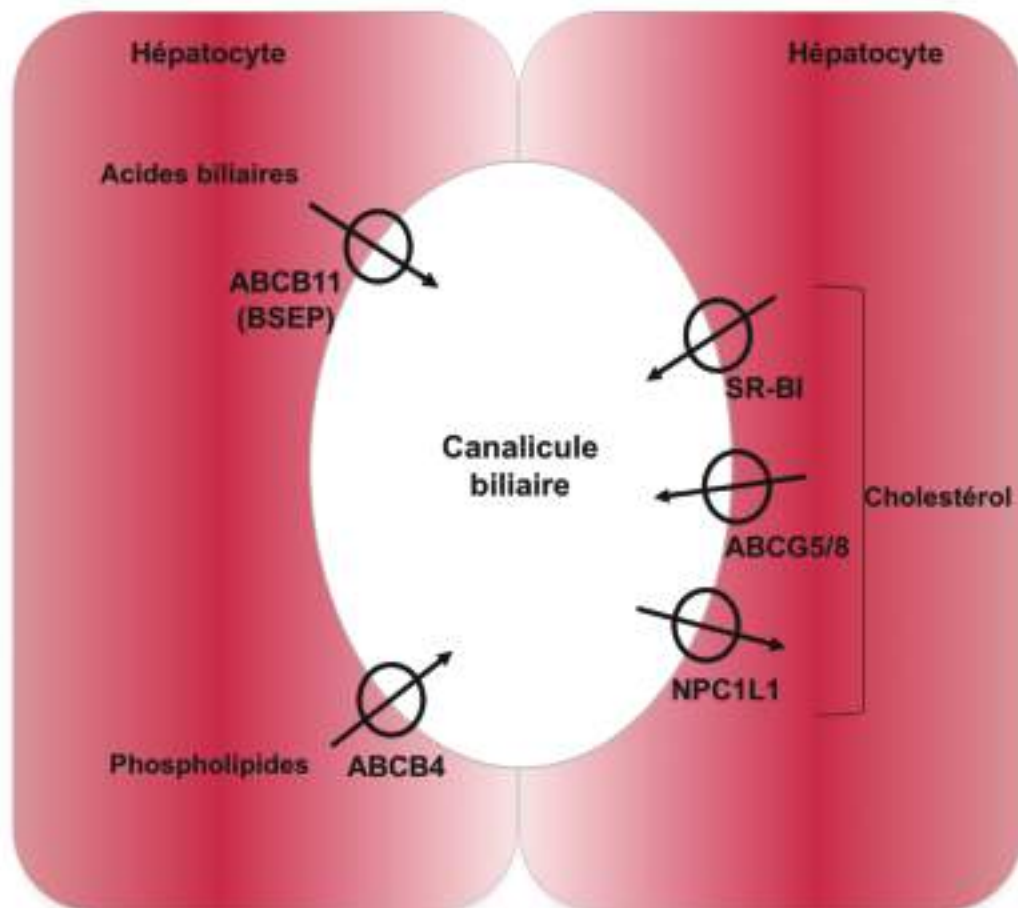
### 2.2.3.3. Transport hépato-biliaire du cholestérol.

**ABCG5** et **ABCG8** sont deux hémi-transporteurs impliqués dans le transport hépato-biliaire du cholestérol. ABCG5 et ABCG8 sont composés de 6 domaines transmembranaires et sont principalement localisés au niveau de la membrane apicale des cellules intestinales et au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Au niveau hépatique et intestinal, l'hétérodimère ABCG5/G8 assure l'excrétion du cholestérol dans la bile et la lumière intestinale, respectivement. Il participe majoritairement à l'excrétion des stérols végétaux (Figure 9) (X. H. Yu et al., 2014). SR-BI exprimé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes serait également impliqué dans le transport du cholestérol dans la bile, mais dans une moindre mesure que ABCG5/8 (Figure 9) (Wiersma et al., 2009) (Dijkers & Tietge, 2010). Des études chez la souris ont mis en évidence que la protéine NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1), exprimée au niveau de la membrane apicale de l'intestin, participe à la réabsorption intestinale du cholestérol, contrebalançant ainsi l'action de ABCG5/G8 (Figure 9). Chez la souris, NPC1L1 est uniquement exprimé au niveau intestinal, contrairement à l'homme où NPC1L1 est exprimé au niveau du foie et de l'intestin. Afin d'étudier la contribution hépatique de NPC1L1 chez l'homme, Temel *et al.* ont généré des souris transgéniques exprimant **NCP1L1** au niveau du foie (**NPC1L1<sup>FoieTg</sup>**). Les souris NPC1L1<sup>FoieTg</sup> montrent une réduction importante des sécrétions biliaires en cholestérol (>90%) sans modification des sécrétions biliaires en acides biliaires et phospholipides. Les auteurs proposent que NCP1L1 pourrait être responsable d'un retro-transport du cholestérol du canalicule biliaire vers les hépatocytes, prévenant ainsi l'excès de perte de cholestérol biliaire (Temel et al., 2007).

### 2.2.3.4. Transport hépato-biliaire des phospholipides.

C'est le transporteur **ABCB4** (MDR2), exprimé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, qui assure la sécrétion de phospholipides, en particulier de phosphatidylcholines, dans la bile (Figure 9). L'inactivation de ABCB4 chez la souris entraîne au niveau biliaire, une diminution des sécrétions en cholestérol et phospholipides (Elferink et al., 1996) (Kruit et al., 2005). Ces résultats sont en accord avec des études précédentes mettant en évidence que les sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides sont quantitativement couplées (Mazer & Martin, 1984) (Robins & Armstrong, 1976).





**Figure 9 :** Transporteurs canaliculaires impliqués dans la sécrétion des lipides biliaires. Au niveau des hépatocytes, la sécrétion du cholestérol dans le canalicule biliaire se fait par l'intermédiaire des transporteurs ABCG5/8 et dans une moindre mesure de SR-BI. Chez l'homme, NPC1L1 permet le transport inverse (absorption) du cholestérol de la bile vers l'hépatocyte. Les sécrétions de cholestérol et de phospholipides sont quantitativement couplées. Les sécrétions d'acides biliaires et de phospholipides dans le canalicule biliaire se font par l'intermédiaire des transporteurs ABCB11 (BSEP) et ABCB4 (MDR2) respectivement.

### 2.2.3.5. Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires.

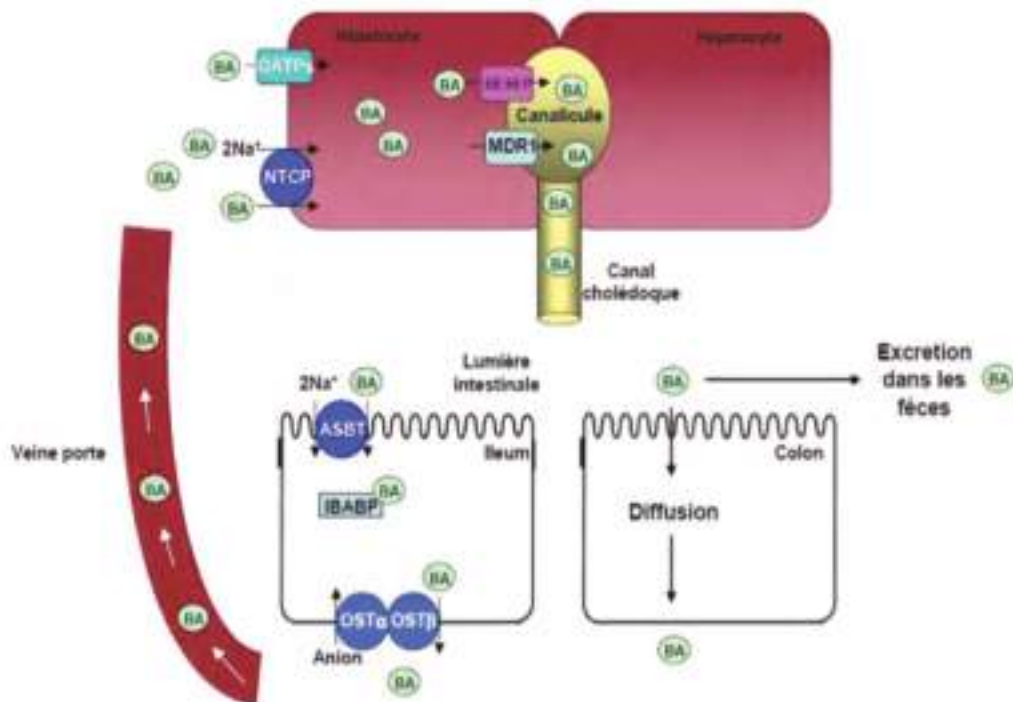
Une fois synthétisés, les acides biliaires sont sécrétés dans les canalicules biliaires hépatiques puis stockés dans la vésicule biliaire. Dans la vésicule biliaire, les acides biliaires, sont mélangés à des ions sodium ou potassium et forment les sels biliaires. Après la prise d'un repas, le chyme arrive dans le duodénum intestinal et entraîne la sécrétion de cholécystokinine (CCK). Cette sécrétion de CCK est d'autant plus importante que le chyme est riche en lipides. Une fois sécrétée, la CCK va se fixer aux récepteurs CCK-1 au niveau de la membrane des cholangiocytes (cellules épithéliales des conduits biliaires) et induit la contraction de la vésicule biliaire. La bile est alors déversée dans le duodénum où les acides biliaires vont exercer leur rôle de détergent des lipides alimentaires, stimulant d'autant

plus la sécrétion de CCK. Les acides biliaires circuleront le long du tractus gastrointestinal et seront réabsorbés au niveau des entérocytes de l'iléon. En fonction de leur polarité, 95% des acides biliaires vont pénétrer dans ces cellules par diffusion ou par l'intermédiaire de **ASBT** (Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter, SLC10A2). Le transport des acides biliaires au travers des entérocytes implique trois protéines (Figure 10) : le transporteur ASBT localisé au niveau de la membrane apicale des entérocytes (transport dépendant du Na<sup>+</sup>), la protéine cytosolique **IBABP** (Intestinal Bile Acid-Binding Protein) et le transporteur hétérodimérique **Ost $\alpha$ -Ost $\beta$** , localisé au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes (transport indépendant du Na<sup>+</sup>) (Dawson et al., 2003) (Dawson et al., 2005). L'hétérodimère Ost $\alpha$ -Ost $\beta$  permet l'efflux dans la circulation portale des acides biliaires et leur retour au foie. Dans le foie, ils sont recyclés pour retrouver dans la circulation entéro-hépatique.

La captation hépatique des acides biliaires se fait au niveau de la membrane sinusoidale contre un gradient électrochimique par des mécanismes dépendants et indépendants du Na<sup>+</sup>. Le transporteur **NCTP** (Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptides) réalise la captation dépendante du Na<sup>+</sup>, et des membres de la famille des OATP (Organic Anion Transporting Polypeptides) tels que **Oatp1a2** et **Oatp1b1**, sont responsables du transport indépendant du Na<sup>+</sup>. NCTP transporte préférentiellement les acides biliaires conjugués, alors que les OATP transportent plus de la moitié des acides biliaires non conjugués (Alrefai & Gill, 2007).

Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires est représenté de façon schématique dans la Figure 10.





**Figure 10** : Circulation entéro-hépatique des acides biliaries. Au niveau de l'iléum les acides biliaries (BA) vont pénétrer dans les entérocytes par diffusion ou par l'intermédiaire de ASBT. Les acides biliaries seront ensuite transportés au sein de l'entérocyte par IBABP jusqu'à la membrane basolatérale où le transporteur hétérodimérique Osta-Ost $\beta$  assure l'efflux des acides biliaries. Par la veine porte, les acides biliaries absorbés rejoindront le foie où ils seront captés par NTCP et les OATPs. Ces acides biliaries pourront être à nouveau sécrétés dans la bile via BSEP (ABCB11) et, dans une moindre mesure, via MDR1 au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. D'après (Alrefai & Gill, 2007).

## 2.2.4. Le transport intestinal du cholestérol.

### 2.2.4.1. L'absorption intestinale du cholestérol.

Les entérocytes sont des cellules polarisées de l'épithélium intestinal, caractérisées à leur pôle apical par un plateau strié constitué de microvillosités qui forment une bordure en brosse. Au pôle apical, l'absorption intestinale du cholestérol débute par l'hydrolyse des esters de cholestérol d'origine alimentaire, libérant ainsi du cholestérol libre et des acides gras pouvant être absorbés. Certaines protéines, telles que NPC1L1 et ABCG5/8 sont impliquées dans la modulation de l'absorption du cholestérol alimentaire, alors que d'autres, telles que ABCA1, sont impliquées dans l'efflux du cholestérol vers le sang, au niveau du pôle basolatéral des entérocytes.

La protéine **NPC1L1**, est exprimée au niveau de la bordure en brosse de l'intestin chez l'homme et chez la souris et participe à l'absorption intestinale du cholestérol. Les souris invalidées

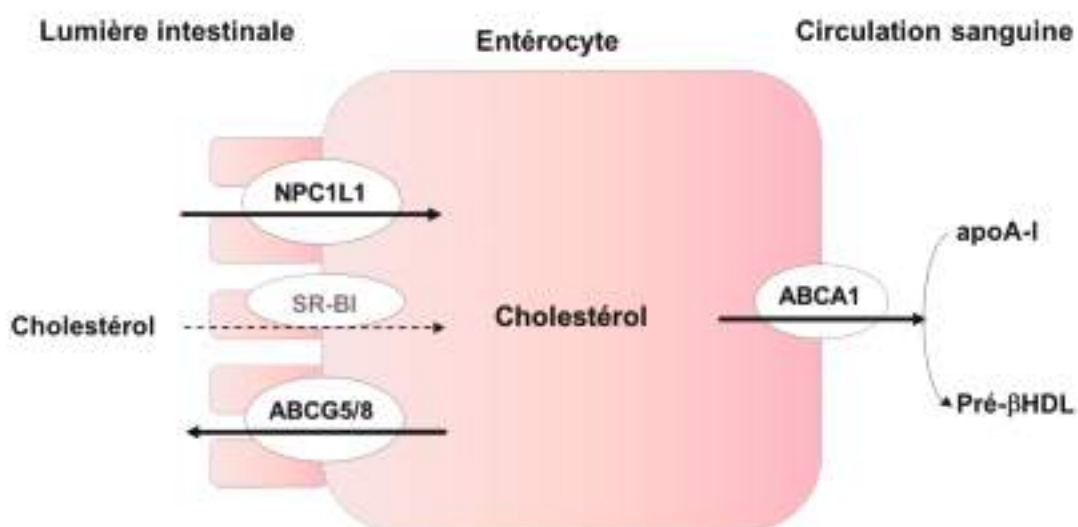
pour NPC1L1 (NPC1L1-KO) sous régime normolipidique présentent une diminution importante de l'absorption de cholestérol alimentaire (~69%) et une diminution de la concentration en cholestérol estérifié dans le foie, par rapport aux souris sauvages. Sous régime riche en acide cholique, régime favorisant l'absorption intestinale des lipides et notamment du cholestérol alimentaire, les souris NPC1L1-KO montrent une baisse de l'absorption de cholestérol intestinal de l'ordre de 80% par rapport aux souris sauvages (Altmann et al., 2004). L'ézetimibe est un inhibiteur de NPC1L1 capable de réduire l'absorption intestinale de cholestérol et les taux de cholestérol plasmatiques ; il constitue actuellement un médicament cliniquement approuvé dans le traitement de l'hypercholestérolémie (Ara et al., 2008). Chez l'homme, contrairement à la souris, NPC1L1 est également exprimé au niveau du foie où il participe au retro-transport du cholestérol du canalicule biliaire vers les hépatocytes. Ainsi, la réduction du cholestérol plasmatique induite par l'ézetimibe pourrait en partie être due à une inhibition de la fonction hépatique de NPC1L1 dans la protection contre la sécrétion du cholestérol dans la bile (Temel et al., 2007).

Le rôle de **SR-BI** dans l'absorption intestinale du cholestérol est controversé. L'inactivation totale de SR-BI chez la souris n'altère ni l'absorption intestinale du cholestérol, ni son excrétion dans les fèces. Ces données suggèrent que le rôle de SR-BI, à la différence de celui de NPC1L1, n'est pas essentiel à l'absorption du cholestérol intestinal (Mardones et al., 2001). Bietrix *et al.* ont montré que des souris surexprimant SR-BI spécifiquement au niveau de l'intestin (modèle présentant également une faible surexpression hépatique), présentent une augmentation de 20% des sécrétions biliaires en cholestérol (Bietrix et al., 2006). Après gavage avec du cholestérol radiomarqué ( $C^{14}$ -cholestérol), ces souris montrent une diminution du traceur  $C^{14}$  dans plasma par rapport aux souris sauvages (diminution de facteur 2, 3h après gavage) associée à une augmentation du traceur  $C^{14}$  dans la muqueuse intestinale, les entérocytes et les sécrétions biliaires. Ces résultats semblent suggérer que la surexpression de SR-BI au niveau intestinal entraîne une accélération de l'absorption intestinale de cholestérol. Récemment, Bura *et al.* (Bura et al., 2013) ont évalué l'absorption intestinale chez ce même modèle de souris surexprimant SR-BI au niveau intestinal, en mesurant l'excrétion fécale de stérols neutres ainsi qu'en utilisant une technique classique pour la mesure directe de l'absorption intestinale, la « fecal dual-isotope method », méthode qui est basée sur l'administration d'une dose orale unique de cholestérol radiomarqué et d'un phytostérol radiomarqué non absorbé, tel que le  $\beta$ -sitostérol (Borgström, 1968) (Wang & Carey, 2003). Ils ont ainsi montré que ces souris ne présentent pas de modifications de l'absorption intestinale de cholestérol ni de l'excrétion fécale de stérols neutres par rapport aux souris sauvages. Les auteurs concluent que SR-BI n'est pas impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol et argumentent que la mesure de l'absorption intestinale *via* SR-BI réalisée par Bietrix *et al.* n'est pas sans biais, le suivi après gavage du cholestérol radiomarqué dans le plasma, la muqueuse intestinale, le foie et la bile n'étant pas uniquement le reflet de

l'absorption intestinale du cholestérol. En effet, d'autres paramètres tels que la clairance plasmatique des lipoprotéines et la sécrétion hépatique du cholestérol issu du cycle entéro-hépatique dans la circulation *via* des lipoprotéines peuvent influencer sur les mesures (Bura et al., 2013).

A la membrane apicale de l'intestin le transporteur hétérodimérique **ABCG5/8**, permet l'efflux des stérols d'origine végétale et du cholestérol des entérocytes vers la lumière intestinale limitant ainsi l'absorption intestinale des stérols (J. Wang et al., 2015). Le transporteur ABCG5/8 est défectueux chez les patients sitostérolémiques, caractérisés par des concentrations plasmatiques en stérols végétaux anormalement élevées (Yoo, 2016). Pour résumer, l'hétérodimère ABCG5/8, *via* sa fonction hépatique et intestinale, limite l'absorption intestinale des stérols et favorise leur sécrétion hépato-biliaire.

Le cholestérol absorbé par l'entérocyte peut également être efflué vers l'apoA-I libre dans la circulation *via* ABCA1, participant ainsi dans la biogénèse des HDL. Un schéma représentatif de l'absorption intestinale du cholestérol est montré dans la Figure 11.



**Figure 11** : Absorption intestinale du cholestérol. Au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, le cholestérol est absorbé par NPC1L1. Le rôle de SR-BI dans l'absorption intestinale est controversé. L'efflux de cholestérol absorbé se fera en partie vers la lumière intestinale *via* ABCG5/G8 situé au pôle apical et en partie vers l'apoA-I libre dans la circulation, participant ainsi à la biogénèse des HDL.

#### 2.2.4.2. Excrétion Trans-intestinale du Cholestérol : TICE.

Le transport retour du cholestérol est décrit comme étant la principale voie d'élimination du cholestérol de l'organisme, avec un rôle majeur des particules HDL qui assurent l'efflux de cholestérol des tissus périphériques puis sa sécrétion dans la bile, soit sous forme de cholestérol libre

soit après transformation en acides biliaires, pour conduire *in fine* à son élimination dans les fèces. Toutefois des travaux menés durant les 10 dernières années ont mis en évidence l'existence d'une voie trans-intestinale d'excrétion du cholestérol (TICE), indépendante du RCT, et contribuant elle aussi à l'élimination du cholestérol. Le TICE est un mécanisme par lequel l'intestin grêle sécrète de façon active le cholestérol plasmatique dans la lumière intestinale (Temel & Brown, 2015) (Brufau, Groen, & Kuipers, 2011a). Initialement, le TICE a été mis en évidence, chez des patients présentant une obstruction des voies biliaires, chez lesquels il a été montré l'existence d'une sécrétion de cholestérol par la muqueuse intestinale (Cheng & Stanley, 1959) (Stanley et al., 1959). Ultérieurement, le TICE a également été mis en évidence dans d'autres études menées chez l'homme (Cheng & Stanley, 1959) (Stanley et al., 1959) (Simmonds et al., 1967) (Deckelbaum et al., 1977) (Hellman et al., 1955) ; et dans des études chez la souris dans différents modèles murins dont des modèles de diversion chirurgicale du canal cholédoque (van der Veen et al., 2009) (Vrins et al., 2009) (van der Velde et al., 2008) (L. Yu et al., 2002) (Voshol et al., 1998). Certaines études suggèrent que 44% de la perte fécale de cholestérol chez l'homme auraient des origines non-biliaires (Stanley et al., 1959). Chez la souris, la voie du TICE contribuerait pour moins de 30% à l'excrétion fécale de cholestérol (Temel & Brown, 2015).

Parmi les modèles murins chez lesquels le TICE est activé (de façon chronique ou aiguë respectivement), on retrouve les souris transgéniques exprimant au niveau du foie le transporteur NCP1L1, impliqué dans le retro-transport hépato-biliaire du cholestérol (souris NPC1L1<sup>FoieTg</sup>) et les souris invalidées pour l'acyl-Coenzyme A: Cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) *via* un oligonucléotide antisens. Les souris NPC1L1<sup>FoieTg</sup> présentent une forte diminution (>90%) des sécrétions biliaires en cholestérol par rapport aux souris sauvages et ont des valeurs inchangées d'excrétion fécale en cholestérol et de RCT des macrophages vers les fèces, ce qui suggère une augmentation du TICE chez ces souris (Temel et al., 2010a) (Temel & Brown, 2010b) (Temel et al., 2007). ACAT2 est une enzyme qui assure l'estérification du cholestérol au niveau du foie et qui semble être impliquée dans le TICE (Figure 12) (Nguyen et al., 2012). Au niveau du foie, en accord avec la fonction hépatique de ACAT2, les souris invalidées pour ACAT2 présentent une forte baisse du cholestérol estérifié mais, pas d'augmentation équivalente du cholestérol libre (Brown et al., 2008) (Marshall et al., 2014a). De façon intéressante l'invalidation hépatique de ACAT2 induit une stimulation de l'excrétion fécale de stérols sans modification des sécrétions biliaires en cholestérol. Les auteurs ont également montré que ces souris présentent une augmentation plasmatique des lipoprotéines contenant l'apoB ainsi qu'une augmentation de la quantité de cholestérol accumulé dans l'intestin grêle. Par ailleurs, l'invalidation de ACAT2 *via* un oligonucléotide antisens, dans un modèle d'athérosclérose (LDLR-KO/apoB100), induit une réduction du développement de l'athérosclérose (Bell et al., 2006). D'après ces deux modèles murins de stimulation chronique du

TICE, on peut proposer que dans des conditions où le pool de cholestérol hépatique libre devient trop important pour être estérifié ou sécrété dans la bile, une voie plasmatique alternative est mise en jeu pour la sécrétion intestinale et l'excrétion fécale du cholestérol. En effet, dans ces conditions, l'excès de cholestérol libre hépatique se retrouve sécrété dans la circulation *via* la production de VLDL (Figure 12). En accord avec ce mécanisme de régulation, une étude menée par l'équipe de Temel a démontré qu'une inhibition de la sécrétion hépatique de VLDL impacte négativement le TICE (Marshall et al., 2014b). De façon élégante, cette étude a utilisé un modèle de souris pour lequel le TICE est chroniquement activé (NPC1L1<sup>FoieTg</sup>) et présentant une invalidation hépatique pour la MTP (microsomal triglyceride transfer protein), protéine impliquée dans la lipodation et la sécrétion des VLDL. Dans ce modèle, les auteurs ont constaté une diminution de l'excrétion fécale de cholestérol par rapport aux souris NPC1L1<sup>FoieTg</sup> exprimant la MTP. En accord avec ces résultats, une autre étude a montré que le RCT des macrophages vers les fèces était diminué chez les souris présentant une invalidation hépatique de MTP (Dijkers et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré que le TICE n'est pas altéré chez des souris invalidées pour ABCA1, caractérisées par un faible taux plasmatique de HDL. **Ainsi, à ce jour, aucune étude n'a formellement démontré l'implication des HDL dans le transport du cholestérol circulant vers l'intestin *via* le TICE** (Vrins et al., 2012).

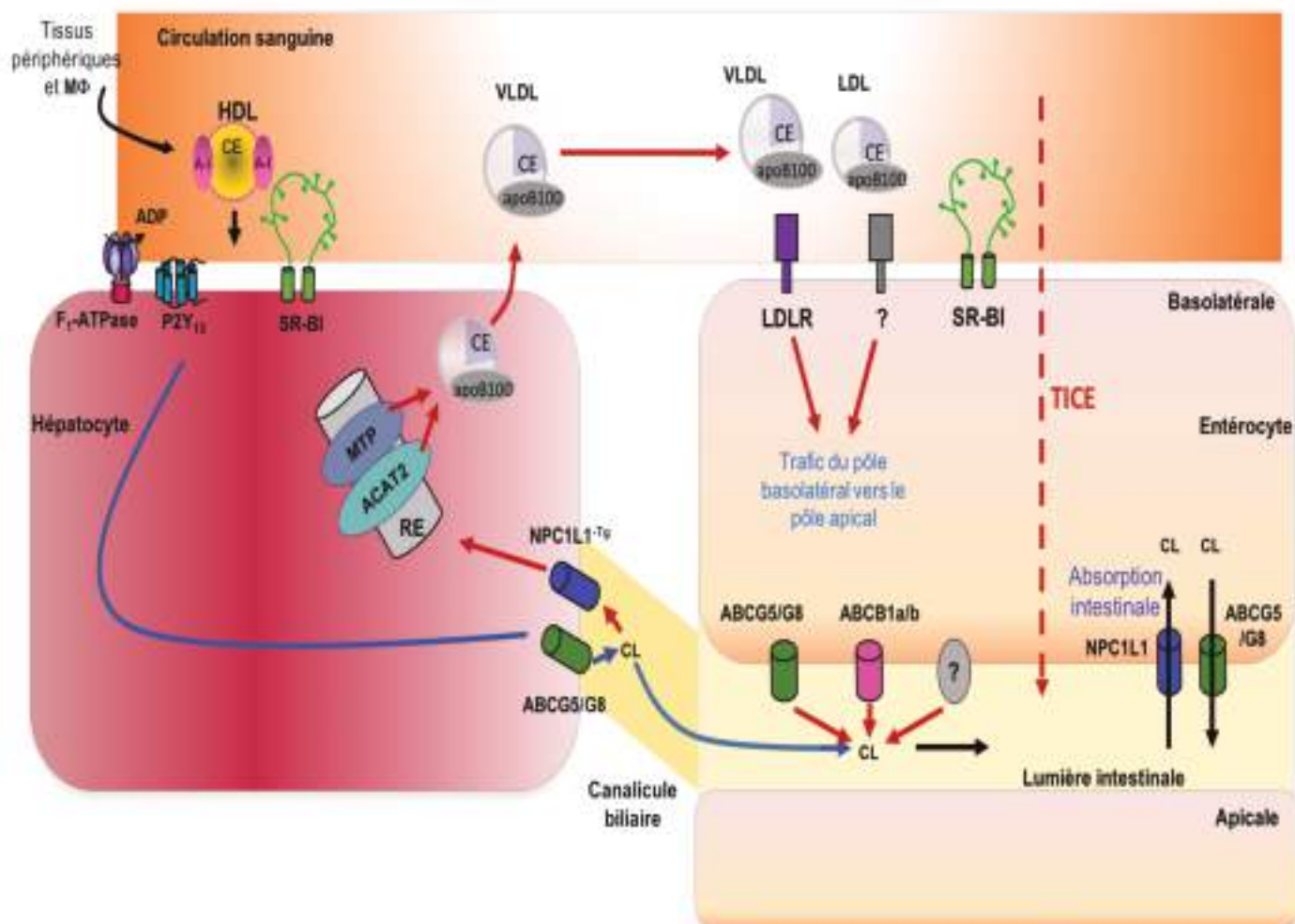
Les lipoprotéines contenant l'apoB (VLDL, LDL) impliquées dans le TICE pourraient être reconnues au niveau de l'intestin grêle proximal par des récepteurs situés au pôle basolateral des entérocytes, tels que le récepteur aux LDL (LDLR) et les récepteurs de la famille du LDL : LRP (LDL related-receptor protein), VLDLR (récepteur aux VLDL) ou apoER2 (apolipoproteinE receptor type 2) (Herz et al., 1988) (García-Miranda et al., 2010). L'implication du LDLR dans le TICE reste cependant un sujet controversé puisque le TICE peut également être mis en évidence chez les souris déficientes pour le LDLR (Brown et al., 2008) et que, inversement, Le May et *al.* ont montré que dans des conditions qui augmentent l'expression du LDLR telles que l'invalidation de PCSK9 (proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9) ou un traitement par des statines, le TICE est augmenté (Le May et al., 2013). Certains auteurs ont suggéré que SR-BI puisse être impliqué dans le TICE. Cependant il n'existe à ce jour aucune évidence qui appuie cette hypothèse. Ainsi, l'équipe de Temel et Brown a montré que des souris surexprimant SR-BI au niveau de l'intestin ne présentent pas de variations de l'absorption intestinale et de l'excrétion fécale de stérols neutres (Bura et al., 2013). Dans une étude mesurant le TICE dans différentes conditions de régime alimentaire, Van der Velde et *al.* ont montré que l'expression génique et protéique de SR-BI au niveau intestinal corrélait positivement avec le TICE (van der Velde et al., 2008). Cependant, de façon paradoxale, le TICE est soit non modifié (Vrins et al., 2012) soit significativement augmenté chez les souris SR-BI-KO (invalidation totale) (van der Velde et al., 2008). Une explication possible à ce paradoxe est que la diminution en sécrétions biliaires de cholestérol observée chez les souris SR-BI-KO conduit, par

compensation, à une augmentation du TICE. Cependant, les souris SR-BI-KO ont une excrétion de stérols neutres légèrement diminuée par rapport aux souris sauvages, ce qui indiquerait que cette compensation n'est que partielle (Mardones et al., 2001).

Le trafic intracellulaire du cholestérol dérivé du TICE du pôle basal vers le pôle apical de l'entérocyte n'est pas clairement compris à ce jour. Etant donné que ce sont les lipoprotéines contenant l'apoB qui semblent être impliquées dans le TICE, il est possible que ce trafic intracellulaire fasse intervenir des compartiments endosomaux et lysosomaux. Deux études *in vivo* ont mis en évidence un efflux du cholestérol issu du TICE du pôle apical de l'entérocyte vers la lumière intestinale *via* l'action des hémi-transporteurs ABCG5/8 et du transporteur ABCB1a/b (modèles d'étude : souris invalidées pour ABCG5/8 et souris invalidées pour les deux isoformes de ABCB1, les isoformes a et b) (Figure 12) (Jakulj et al., 2010) (J. Wang et al., 2015) (Brufau et al., 2011b) (Le May et al., 2013).

Le TICE peut être stimulé par des agonistes des récepteurs nucléaires LXR et PPAR $\delta$ , l'ézetimibe mais également par le contenu en graisse dans l'alimentation (Jakulj et al., 2010) (Vrins et al., 2009) (van der Velde et al., 2008). L'administration d'un agoniste LXR, T0901317, induit une stimulation importante du TICE, avec une contribution du TICE à l'excrétion fécale de cholestérol de 63% chez les souris traitées contre 33% chez les souris contrôles (van der Veen et al., 2009). Un traitement par l'agoniste synthétique du LXR, GW3965 augmente les sécrétions biliaires en cholestérol de 74% chez les souris sauvages mais n'a aucun effet sur les sécrétions des souris invalidées pour ABCB4 (ABCB4-KO), caractérisées par de très faibles sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides. Cependant le traitement augmente l'excrétion fécale en cholestérol chez les souris sauvages et ABCB4-KO et stimule l'excrétion dans les fèces de cholestérol radiomarqué d'origine plasmatique chez les souris ABCB4-KO. Les auteurs ont estimé que, chez les souris ABCB4-KO traitées par l'agoniste LXR, plus de 55% du cholestérol excrété dans les fèces provient du TICE (Kruit et al., 2005).





**Figure 12 :** Modèle intégré du TICE (excretion trans-intestinale du cholestérol) et du RCT (transport retour du cholestérol) hépato-biliaire. Le HDL-C est capté par le foie *via* 2 voies SR-BI et ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> impliquées dans le RCT. Une proportion importante du pool de cholestérol délivré par les HDL peut être sécrétée dans la bile *via* les transporteurs ABCG5/8 situés au niveau de la membrane canaliculaire et *via* d'autres mécanismes mineurs (e.g. SR-BI). Après sécrétion dans la bile, une proportion considérable du cholestérol est délivrée dans la lumière de l'intestin grêle *via* le canal cholédoque où il pourra ultérieurement être excrété dans les fèces. Les données actuelles suggèrent que le TICE peut être initié par le transport du cholestérol du canalicule biliaire vers le foie *via* le transporteur de stérols, NPC1L1 situé au niveau de la membrane canaliculaire chez l'homme (ou dans les modèles de souris NPC1L1<sup>-Tg</sup>), ainsi que par d'autres mécanismes. Ce cholestérol libre biliaire capté par NPC1L1 est dirigé vers le réticulum endoplasmique (RE) où il est empaqueté dans des lipoprotéines naissantes contenant l'apoB, qui seront ultérieurement sécrétées par le foie vers la circulation sanguine. Ces apoB-lipoprotéines sont par la suite reconnues par la partie proximale de l'intestin grêle *via* des récepteurs aux lipoprotéines situés dans la membrane basolatérale des entérocytes, tels que les LDLR et probablement par d'autres mécanismes. Dans l'entérocyte le cholestérol issu du TICE suit un trafic intracellulaire du pôle basolatéral vers le pôle apical, qui est à ce jour mal compris. Au niveau de la membrane apicale des entérocytes, l'efflux de cholestérol vers la lumière intestinale se fait *via* l'action de ABCG5/8, ABCB1a/b, et probablement d'autres mécanismes. Une partie de ce cholestérol sera excrétée dans les fèces. LDLR : low density lipoprotein receptor, ABC : ATP binding cassette, NPC1L1 : Niemann-Pick C1-like 1 (, ACAT2 : acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, MTP : Microsomal triglycerid transfer protein. D'après (Temel & Brown, 2015).

Il existe cependant, certaines études remettant en cause au moins partiellement, l'importance de la voie du TICE. Nijstad et *al.* ont démontré que lorsque les voies biliaires sont altérées, bien que l'excrétion massique en stérols fécaux ne soit pas affectée, le RCT des macrophages vers les fèces est altéré (Nijstad et al., 2011). Le RCT des macrophages marqués au cholestérol tritié vers les fèces est aboli chez les souris ayant subi une ligature du canal cholédoque. Chez les souris ABCB4-KO, chez lesquelles les sécrétions de cholestérol biliaire sont très faibles, le RCT des macrophages vers les fèces est fortement diminué. En accord avec ceci, l'administration d'un agoniste LXR T0901317 augmente le RCT des macrophages vers les fèces chez les souris sauvages mais pas chez les souris ABCB4-KO. L'excrétion massique de stérols fécaux est, quant à elle, stimulée de façon similaire chez les souris sauvages et les souris ABCB4-KO. Cette étude, suggère que la fonctionnalité du RCT dépend des sécrétions biliaires en cholestérol (Nijstad et al., 2011).





## **CHAPITRE II :**

# **CAPTATION HÉPATIQUE DES HDL PAR LES VOIES SR-BI ET ECTO-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>**

La voie SR-BI et la voie Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> sont à ce jour les deux voies distinctes de captation hépatique des HDL, étape clé du transport retour du cholestérol.

Dans un premier temps, nous aborderons les mécanismes moléculaires de ces 2 voies de captation des HDL. Ensuite, nous ferons l'état de l'art sur l'apport des modèles animaux dans la compréhension des implications de ces voies dans le métabolisme des HDL et le développement de l'athérosclérose. Les variants génétiques des deux récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI identifiés chez l'homme seront également abordés. Enfin, nous traiterons des perspectives thérapeutiques pour l'athérosclérose, envisageables ou en cours de développement, ciblant chacune de ces deux voies.

## **1. Voie SR-BI.**

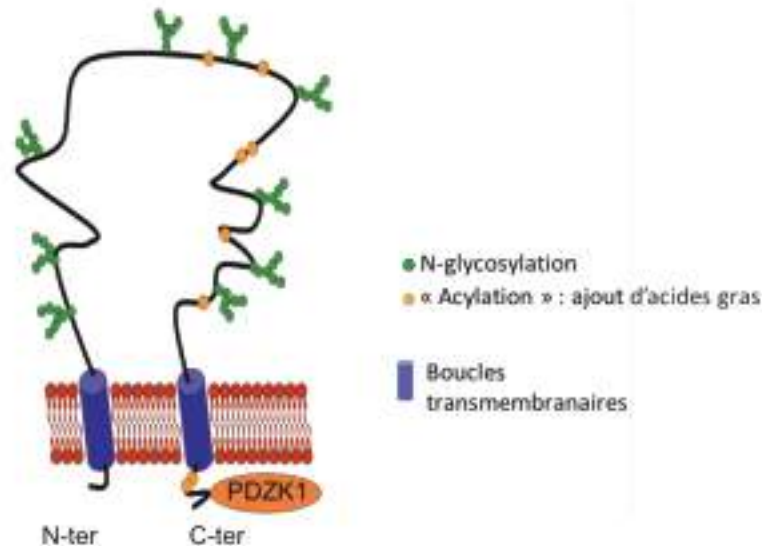
### **1.1. Recherche fondamentale : Fonctions, mécanismes moléculaires impliqués et régulation.**

#### **1.1.1. Description du récepteur SR-BI et ses fonctions.**

Le gène codant pour SR-BI (Scavenger Receptor class B type I), dont l'orthologue humain est CLA-I (CD36 et LIMPII Analogue I) est composé de 13 exons et code pour une protéine de 509 acides aminés et de 82 kDa. La protéine SR-BI est formée d'une large boucle extracellulaire ancrée par deux domaines transmembranaires adjacents aux extrémités cytoplasmiques N- et C-terminales (N- et C-ter) (Figure 13) (M. Krieger, 1999). La boucle extracellulaire de SR-BI contient de nombreux sites de glycosylation et d'acylation par des acides gras (Babitt et al., 1997). L'extrémité C-ter du récepteur contient un motif leucine-zipper qui permet la formation d'homo- ou hétérodimères, ainsi qu'une séquence de ciblage péroxyssomale PTSI grâce à laquelle SR-BI peut être dirigé dans le péroxyssome, organelle impliqué dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras et le transport intracellulaire du cholestérol (M. S. Johnson et al., 1998) (M. S. C. Johnson et al., 2003) (Chu et al., 2015). A l'extrémité C-ter de SR-BI est associée une protéine adaptatrice de 523 acides aminés et contenant 4 domaines PDZ, appelée PDZK1 (Ikemoto et al., 2000). La protéine adaptatrice PDZK1 contrôle de façon post-traductionnelle, l'expression protéique de SR-BI notamment au niveau du foie (Kocher et al., 2003). SR-BI appartient à la famille des récepteurs « scavenger » (« éboueur » en français) de la classe B, comprenant CD36 et LIMPII (récepteurs pouvant lier les LDL modifiés et natifs) et a la capacité de lier plusieurs ligands. En effet, bien que classiquement décrit pour lier les HDL, SR-BI est également capable de lier les LDL natifs ou oxydés, les VLDL, les chylomicrons et des ligands autres que les lipoprotéines (phospholipides, SAA,  $\beta$ -amyloïde, bactéries et cellules apoptotiques) (Baranova et al., 2016). Différents travaux ont pu démontrer l'implication de SR-BI dans la clairance plasmatique des lipoprotéines contenant de l'apoB (LDL, VLDL, chylomicrons) (S. Acton et al., 1996) (M. Krieger, 2001)

(Stangl, Hyatt, & Hobbs, 1999) (Swarnakar et al., 1999) (Gillotte-Taylor et al., 2001) (N Wang et al., 1998) (Ueda et al., 1999) (Out et al., 2005) (Huby et al., 2006). SR-BI est majoritairement exprimé dans des tissus et organes impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que le foie et les tissus stéroïdogéniques (testicules, ovaires, surrénales) (Brundert et al., 2005) (Rigotti et al., 1997). Il est également exprimé dans l'intestin (rôle dans la détection des micelles lipidiques post-prandiales par les entérocytes et la sécrétion de chylomicrons), le tissu adipeux (possible rôle dans la régulation de l'adiposité) et les poumons (Béaslas et al., 2009) (Briand et al., 2016) (Yvan-Charvet et al., 2007).

Une isoforme de SR-BI, appelée SR-BII, a été mise en évidence chez la souris et chez l'homme (Webb et al., 1998) (Chiba-Falek et al., 2010). Elle résulte de l'épissage alternatif du gène de SR-BI (exon 12 exclu), et possède une extrémité C-ter différente de SR-BI (absence de séquence PTSI). Cette isoforme est retrouvée dans les tissus et organes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et constitue la forme prépondérante dans les testicules chez la souris ; cependant, elle ne représente que 12 % de la quantité totale de SR-BI et SR-BII immunodélectables dans le foie de souris (Webb et al., 1998) (Akpovi, 2006). SR-BI et SR-BII lient les HDL avec des affinités similaires mais SR-BII régule la captation sélective du cholestérol estérifié avec une efficacité 4 fois moins importante que SR-BI, ce qui relativise l'importance de cette isoforme (Webb et al., 1998).



**Figure 13** : Structure de SR-BI/CLA-1. N-ter : extrémité N-terminale, C-ter : extrémité C-terminale. D'après (Hoekstra, van Berkel, & van Eck, 2010).

Au niveau hépatique, SR-BI joue un rôle majeur dans le transport retour du cholestérol en assurant la captation sélective du cholestérol estérifié contenu dans le cœur des HDL, sans internalisation ni dégradation de la lipoprotéine entière (Brundert et al., 2005) (Valacchi et al., 2011).

SR-BI exerce également **une fonction athéroprotectrice au niveau de la paroi vasculaire**, d'une part *via* son expression dans les macrophages de l'espace sous-endothélial, en participant à **l'efflux du cholestérol** vers les HDL, et d'autre part *via* son expression dans les cellules endothéliales où il contribue aux **activités protectrices des HDL sur l'endothélium** (de la Llera-Moya et al., 1999). SR-BI contribue à la vasodilatation, en induisant l'activation de la eNOS (Yuhanna et al., 2001) (Assanasen et al., 2005). Cette activation a été associée à 2 voies de signalisation différentes: la voie AMPK qui va stimuler les acteurs PI3-kinase/Akt qui à leur tour activent la eNOS (phosphorylation de eNOS sur la sérine 1177 par Akt), et la voie MAPK (PI3-kinase/MAPK) dont le mécanisme associé est moins clair (Figure 4) (Mineo et al., 2003) (Kimura et al., 2010). SR-BI participe également à la vasodilatation en permettant un apport de cholestérol par les HDL qui empêche la délocalisation et l'inactivation de la eNOS cavéolaire par les LDLox (de la Llera-Moya et al., 1999). SR-BI est aussi impliqué dans les effets anti-inflammatoires des HDL. La capacité de l'apoA-I lipidée et de certaines espèces de phosphatidylcholines constituant les HDL à inhiber l'expression endothéliale des molécules d'adhérence VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 fait appel à une activation du récepteur SR-BI et de sa protéine adaptatrice PDZK1 qui déclenche une voie de signalisation intracellulaire faisant intervenir la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la eNOS (Figure 4) (Baker et al., 1999) (Baker et al., 2000) (Kimura et al., 2006). L'inhibition de la molécule d'adhérence à la surface des monocytes et neutrophiles activés, CD11b, fait également intervenir SR-BI (Murphy et al., 2008) (Murphy et al., 2011).

### 1.1.2. Mécanisme moléculaire : Captation sélective du cholestérol estérifié.

Les mécanismes moléculaires de captation sélective du cholestérol *via* SR-BI sont encore mal connus mais pourraient impliquer la formation d'un canal hydrophobe, composé d'un dimère ou multimère de SR-BI, au travers duquel diffuserait le cholestérol estérifié. (Rodriguez et al., 1999). En 2016, Ganesan *et al.* ont analysé la localisation de SR-BI dans le foie chez la souris, en utilisant 2 approches différentes : la microscopie confocale à haute résolution sur des sections ultrafines de foie de souris et la cytométrie en flux de 2 populations de cellules purifiées par ultracentrifugation, les cellules parenchymateuses (hépatocytes) et les cellules non parenchymateuses. Les cellules non parenchymateuses incluent principalement des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques ou LSEC pour Liver sinusoidal endothelial cells. Par ces 2 approches, les auteurs montrent que SR-BI est majoritairement localisé au niveau des LSEC et très minoritairement au niveau des hépatocytes, cellules qui avaient jusqu'à alors été considérées comme étant les seules cellules du foie exprimant SR-BI. Ces résultats ont été confirmés par des analyses transcriptomiques qui montrent que l'expression de SR-BI est 5 fois plus importante au niveau des LSEC qu'au niveau des hépatocytes. Les

auteurs expliquent que les limitations technologiques des approches qui avaient été utilisées jusqu'à présent ne permettaient pas de mettre en évidence la localisation précise de SR-BI au niveau du foie. Cette étude récente pourrait remettre en cause les études précédentes, qui ont toujours considéré que l'implication de SR-BI dans le RCT était majoritairement attribuable à son activité dans les hépatocytes. Pour expliquer ce paradoxe, les auteurs proposent plusieurs hypothèses (Ganesan et al., 2016). Selon la 1<sup>ère</sup> hypothèse, une très faible quantité de SR-BI, non détectable par les technologies existantes, pourrait être présente au niveau des hépatocytes et lier les HDL. Selon l'autre hypothèse, les HDL pourraient se lier à SR-BI exprimé dans les LSEC et être dirigées vers les hépatocytes par un mécanisme de transcytose. Après avoir atteint les hépatocytes, les HDL pourraient se lier à SR-BI ou à d'autres récepteurs tels que ceux impliqués dans la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>. Des mécanismes similaires de transcytose ont déjà été observés dans d'autres types de cellules endothéliales aortiques ou de vaisseaux lymphatiques (Rohrer et al., 2009) (Lim et al., 2013). Finalement, il est également possible que la captation sélective du cholestérol estérifié des HDL ait lieu au niveau des LSEC et ce cholestérol soit ensuite transféré aux hépatocytes. Par la suite, il sera intéressant d'évaluer l'existence de tels mécanismes chez l'homme.

### 1.1.3. Régulation de l'expression de SR-BI.

#### 1.1.3.1. Régulation transcriptionnelle.

Le gène codant pour le récepteur SR-BI/CLA-1, SCARB1 (Scavenger Receptor Class B Member 1), est exprimé au niveau du foie et des tissus stéroïdogéniques. Des études menées chez l'homme et les espèces murines ont montré que plusieurs facteurs de transcription se lient au promoteur de SCARB1. Au niveau du foie chez l'homme et le rat, **LXR $\alpha$  et  $\beta$**  et **PPAR $\alpha$  et  $\gamma$**  se fixent sur les séquences distales LXRE (LXR Response Element) et PPRE (PPAR Response Element) respectivement du promoteur de SCARB1 et régulent positivement l'expression de SR-BI en réponse aux oxystérols et aux fibrates (Malerod et al., 2002) (Malerod et al., 2003). **LRH-1** (Liver receptor homolog-1) active également le promoteur de SCARB1 chez l'homme et les espèces murines. La surexpression de LRH-1 par adénovirus dans des hépatocytes (lignées cellulaires BNCL-2) induit l'expression de SR-BI et est associée à l'acétylation de l'histone H3 dans le promoteur de SCARB1 (Schoonjans et al., 2002). Il a également été montré que **SF-1** (Steroidogenic factor-1) se lie au promoteur de SCARB1 et active sa transcription. Il sert également de médiateur de la régulation AMPc-dépendante du gène SCARB1 en réponse aux hormones stéroïdiennes (Lopez et al., 1999a). Les stérols intracellulaires activent également l'expression de SCARB1 *via* **SREBP-1a** qui se lie sur des éléments de réponse aux stérols (SREs) présents au niveau du promoteur de SCARB1 chez le rat. Les facteurs de transcription ubiquitaires SP1 et SP3 se lient à plusieurs séquences nucléotidiques riches en GC au niveau de la

région proximale du promoteur de SCARB1 et sont nécessaires à la transactivation SREBP-1a-dépendante du promoteur de SCARB1 (Lopez & McLean, 1999b) (Cao et al., 1997) (Shea-Eaton et al., 2001).

Diverses études ont montré que l'œstradiol (E2), principal œstrogène produit par les ovaires, régule négativement l'expression de SR-BI dans le foie chez le rat et dans des lignées cellulaires issues d'hépatomes humains (HepG2) *via* les récepteurs des œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  (**ER $\alpha$**  et  **$\beta$** ) qui se fixent sur les éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) au niveau du promoteur du gène SR-BI. Cependant, E2 régule positivement cette fois, l'expression de l'isoforme de SR-BI, SR-BII. SR-BII régule la captation sélective du cholestérol estérifié avec une moindre efficacité que SR-BI, ce qui explique qu'en réponse à un traitement par œstrogènes, bien que les niveaux de protéine SR-BII des cellules HepG2 soient augmentés d'un facteur 3,2, la captation sélective du cholestérol estérifié est réduite de 25%. Contrairement à l'effet de l'œstradiol dans le foie, E2 stimule l'expression de SR-BI et la captation sélective du cholestérol estérifié dans les cellules du cortex surrénal et les cellules lutéales de l'ovaire (Lopez & McLean, 2006).

L'expression de SR-BI est négativement régulée par le récepteur nucléaire **DAX-1** (dorsal sensitive sex adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome gène 1), qui, chez le rat, interfère avec la transactivation de ce promoteur par SF-1 et SREBP-1a (Lopez et al., 2001).

Certains miRNAs ont également été impliqués dans la régulation de l'expression de SR-BI. La transfection de cellules hépatiques de souris (lignée cellulaire Hepa 1-6) avec le miR-125a entraîne une diminution de l'expression de SR-BI et une réduction de la captation sélective du cholestérol estérifié médiée par SR-BI (Hu et al., 2012). MiR-185, miR-96 et miR-223 ciblent également le 3' UTR de SR-BI et inhibent la captation hépatique du HDL-C *in vivo* et dans des cellules HepG2 (L. Wang et al., 2013).

### 1.1.3.2. Régulation post-traductionnelle.

La protéine adaptatrice de SR-BI, **PDZK1**, régule l'expression post-traductionnelle de SR-BI de façon tissu-spécifique. Elle assure la stabilité de l'expression de SR-BI à la membrane plasmique notamment au niveau des hépatocytes (Ikemoto et al., 2000). Les souris invalidées pour PDZK1 (PDZK1-KO), présentent une expression protéique de SR-BI diminuée de 95% au niveau du foie et de 50% au niveau de l'intestin grêle, sans diminution de son ARNm dans ces tissus et sans variation au niveau des organes stéroïdogéniques. L'expression hépatique de l'isoforme SR-BII n'est pas affectée chez les souris PDZK1-KO. Une augmentation du HDL-C et des larges particules HDL, riches en cholestérol, a également été observée chez ces souris, bien que cette augmentation soit inférieure à celle caractéristique des souris invalidées pour SR-BI (Kocher et al., 2003) (Kocher & Krieger, 2009).

L'expression hépatique de SR-BI au niveau post-traductionnel est régulée négativement par les **régimes athérogènes**, régimes supplémentés en cholestérol et/ou en cholate (diminution de l'expression protéique de SR-BI d'un facteur 3) (Niemeier et al., 2009). Récemment, dans un modèle de cellules HepG2 exprimant une protéine SR-BI fusionnée avec la GFP (Green Fluorescent protein) et *via* diverses méthodes d'exploration fonctionnelle et d'imagerie (liaison des HDL, biotinylation du récepteur de surface, microscopie confocale de fluorescence), il a été montré que l'activation de la **PI3K** régule la localisation subcellulaire de SR-BI et son expression à la surface (Shetty et al., 2006). Finalement, les hormones telles que T3 (triiodothyronine), les thyromimétiques, et le **probucol**, agent pharmacologique hypolipémiant, augmentent l'expression post-traductionnelle de SR-BI (Leiva et al., 2011).

Récemment il a été démontré que la chimiokine **MCP-1**, exprimée par les cellules endothéliales durant l'inflammation, diminue l'expression de SR-BI ainsi que de ABCA1 et ABCG1 de façon dose-dépendante et temps-dépendante (C. Huang et al., 2013).

## 1.2. Rôles de SR-BI : l'apport des modèles animaux.

### 1.2.1. Invalidation ubiquitaire de SR-BI.

L'**invalidation totale de SR-BI** chez la souris par knocking-out (souris **SR-BI-KO**) se traduit par une forte **diminution de la captation sélective du cholestérol estérifié** contenu dans les HDL (-90% vs. souris sauvages) (Brundert et al., 2005) (Varban et al., 1998). En effet après injection intrapéritonéale de HDL doublement marquées sur leur composante protéique à l'iode 125 et sur leur composante lipidique au cholestérol tritié, on retrouve une diminution du marqueur tritium au niveau du foie. Au niveau plasmatique, ceci se reflète par une augmentation du cholestérol total plasmatique, due principalement à une **augmentation du taux plasmatique de HDL-C** mais également de LDL-C et VLDL-C (Rigotti et al., 1997) (Mardones et al., 2001) (Huby et al., 2006).

Au niveau hépato-biliaire, ces souris présentent une **diminution des sécrétions biliaires en cholestérol** par rapport aux souris sauvages mais sans modification du flux biliaire, ni des sécrétions en acides biliaires et phospholipides (Mardones et al., 2001), ou de variation des concentrations hépatiques en cholestérol estérifié (Huby et al., 2006) (Van Eck et al., 2003). Dans les conditions physiologiques, SR-BI pourrait faciliter la sécrétion de cholestérol biliaire soit en participant à la captation hépatique du cholestérol transporté par les lipoprotéines, soit en contribuant à la sécrétion biliaire de cholestérol depuis les membranes canaliculaires, soit les deux. En parallèle, les souris SR-BI-KO montrent un **RCT altéré** (Zhang et al., 2005) (El Bouhassani et al., 2011), couplé à une légère



baisse de l'excrétion fécale de cholestérol par rapport aux souris sauvages (WT, Wild type) ( $7,9 \pm 2,2$  vs.  $9,5 \pm 1,2$   $\mu\text{M}/\text{jour}/100\text{g}$  masse corporelle,  $p < 0,05$ ), sans modification de la quantité ou composition des acides biliaires fécaux, ni de l'absorption intestinale (Mardones et al., 2001).

Ce phénotype métabolique est associé à une augmentation du **développement de l'athérosclérose** chez les souris SR-BI-KO sous **régime hypercholestérolémique** (Van Eck et al., 2003) (Huby et al., 2006). On observe également un développement d'athérosclérose accru lorsque SR-BI est invalidé chez les modèles murins d'athérosclérose, telles que les souris invalidées pour l'apoE (apoE-KO) sous régime normolipidique et les souris invalidées pour le récepteur LDLR (LDLR-KO) sous régime hypercholestérolémique constitué, en pourcentage calorique, de 40% de gras, 40% de carbohydrates, 20% de protéines et 0,02% de cholestérol (Trigatti et al., 1999) (Covey et al., 2003). Sous fond apoE-KO l'invalidation de SR-BI entraîne une cardiomyopathie sévère avec une mortalité précocité (Braun et al., 2002) (Braun et al., 2003) (Karackattu, Trigatti, & Krieger, 2006).

### 1.2.2. Invalidation ou surexpression de SR-BI spécifiquement au niveau du foie.

Huby *et al.* ont développé un modèle de souris invalidées pour SR-BI spécifiquement au niveau du foie en utilisant le système Lox / Albumine-Cre (Alb-Cre). Le croisement de ces souris avec des souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine spécifique du foie permet une recombinaison des sites lox ce qui entraîne une **perte quasi-totale de l'expression hépatique de SR-BI** (souris **hypomSR-BI-KO<sup>foie</sup>** que nous nommerons pour la suite du manuscrit souris **SR-BI-KO<sup>foie</sup>**). Par ailleurs, l'expression hépatique de l'isoforme de SR-BI, SR-BII était également indétectable chez ces souris. Ces souris sont originellement nommées **hypomSR-BI-KO<sup>foie</sup>** car l'introduction des deux sites loxP au sein du gène SR-BI (souris hypomSR-BI aussi nommées SR-BI<sup>flox/flox</sup>) entraîne une réduction de l'expression de SR-BI dans ses principaux tissus et cellules d'expression (foie, surrénales, tissu adipeux blanc, macrophages), indépendamment de l'expression de la Cre-recombinase. Les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> présentent une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol par rapport aux souris sauvages, atteignant un taux équivalent à celui retrouvé chez les souris SR-BI-KO. Cette augmentation, comme dans le cas des souris SR-BI-KO, reflète une **augmentation du HDL-C** mais également du LDL-C et du VLDL-C. De manière analogue aux souris SR-BI-KO, les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> sont caractérisées par des HDL plus larges enrichies en apoE par rapport aux HDL des souris sauvages. Les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, comme les souris SR-BI-KO, montrent un ratio cholestérol libre/cholestérol total élevé par rapport aux souris sauvages, suggérant une contribution du récepteur SR-BI dans la captation hépatique du HDL-cholestéryl estérifié (HDL-CE) ainsi que du HDL-Cholestérol libre (HDL-CL) (Huby et al., 2006). La capacité de SR-BI à capter le

HDL-CL a été démontrée chez des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> mais également chez des souris transgéniques surexprimant SR-BI dans le foie, en injectant des HDL marquées sur le cholestérol libre ou estérifié par des isotopes différents et en suivant la distribution plasmatique, hépatique et biliaire de chacun des traceurs (Y. Ji et al., 1999). Toutefois, chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, la diminution de la captation hépatique du cholestérol libre et estérifié des HDL ne se traduit pas par des variations des concentrations hépatiques en cholestérol libre et estérifié par rapport aux souris sauvages.

Les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> présentent une **baisse du RCT** des macrophages marqués au cholestérol tritié vers les fèces, avec augmentation de la radioactivité dans le plasma et une baisse au niveau du foie et des fèces (El Bouhassani et al., 2011).

Sous régime hypercholestérolémique, ce phénotype métabolique retrouvé chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> est associé à une **augmentation du développement de l'athérosclérose** par rapport aux souris sauvages, montrant le **rôle athéroprotecteur de SR-BI au niveau hépatique** (Huby et al., 2006) (El Bouhassani et al., 2011).

Une analyse comparative de l'histologie de la plaque d'athérome au niveau du sinus aortique des souris SR-BI-KO et SR-BI-KO<sup>foie</sup> a permis de mettre en évidence une sensibilité accrue au développement de l'athérosclérose des souris SR-BI-KO par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> *via* notamment une augmentation de l'inflammation dans les lésions vasculaires chez les souris SR-BI-KO par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>. Ceci montre que **SR-BI exerce une activité athéroprotectrice dans les tissus extra-hépatiques** indépendamment des paramètres plasmatiques (Tableau 3) (Huby et al., 2006) (El Bouhassani et al., 2011).

Inversement, la **surexpression** de SR-BI au niveau hépatique par infection à adénovirus ou par transgénèse se traduit par une très forte **diminution du taux de HDL-C et LDL-C** (Arai, 1999a) (Ueda et al., 1999) (Y Ji et al., 1999) et une augmentation des **sécrétions biliaires en cholestérol** sans modification des sécrétions en phospholipides et acides biliaires (Kozarsky et al., 1997) (Sehayek et al., 1998). De plus, les souris surexprimant SR-BI au niveau du foie, présentent une diminution importante de l'absorption intestinale du cholestérol (Sehayek et al., 1998). Chez un modèle murin d'athérosclérose, les souris LDLR-KO, la surexpression de SR-BI entraîne une **diminution de la sévérité de l'athérosclérose** par rapport aux souris contrôles (Tableau 3) (Arai, 1999a)

### 1.2.3. Invalidation de SR-BI dans le foie dans un modèle de souris exprimant la CETP.

L'effet de l'**invalidation hépatique de SR-BI** a été étudié dans un **modèle de souris** ayant un métabolisme des **lipoprotéines qui se rapproche de celui de l'homme**, les souris transgéniques exprimant la protéine humaine de transfert des esters de cholestérol des HDL vers les LDL, la CETP. Les souris sont naturellement déficientes en CETP, et, par conséquent, elles ont un métabolisme des

lipoprotéines et un profil lipoprotéique très différents de celui de l'homme, avec la majorité du cholestérol transporté par les lipoprotéines HDL. Ainsi des souris transgéniques exprimant la CETP humaine, CETP<sup>Tg</sup>, ont été croisées avec des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> (**SR-BI-KO<sup>foie</sup>/CETP<sup>Tg</sup>**), et leur phénotype a été analysé dans des conditions de régime nomolipidique et hypercholestérolémique (El Bouhassani et al., 2011). Dans ces 2 conditions de régime, les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>/CETP<sup>Tg</sup> ont montré une baisse importante du cholestérol total et des HDL larges riches en cholestérol, par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>. L'expression de la CETP a donc permis de retrouver une distribution quasi normale de HDL-C chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique. Cependant le ratio de cholestérol libre/cholestérol total des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>/CETP<sup>Tg</sup> reste inchangé par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>. Ceci renforce la notion que SR-BI hépatique est un déterminant important des paramètres plasmatiques.

De plus, les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>/CETP<sup>Tg</sup> montrent un **RCT** (de macrophages marqués au cholestérol tritié vers les fèces) identique à celui des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>. La radioactivité quantifiée au niveau du foie et des fèces est diminuée de la même façon chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>/CETP<sup>Tg</sup> et SR-BI-KO<sup>foie</sup> par rapport aux souris sauvages. Ceci souligne l'importance de SR-BI dans la captation du cholestérol même en présence de CETP, et confirme les résultats obtenus dans une étude faite chez le lapin, espèce exprimant la CETP, concernant l'importance de la captation sélective du cholestérol estérifié par le foie en présence de CETP (Goldberg, Beltz, & Pittman, 1991).

De façon intéressante, l'expression de la CETP chez des souris invalidées pour SR-BI au niveau du foie, **atténue l'effet délétère** de la perte de SR-BI hépatique sur le développement de **l'athérosclérose**. La taille des plaques d'athérome est augmentée d'un facteur 8 chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> (par rapport aux souris contrôles sauvages) et d'un facteur 4 chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>/CETP<sup>Tg</sup> (par rapport aux souris contrôles CETP<sup>Tg</sup>) (Tableau 3).

**Ces modèles murins d'inactivation et de surexpression** révèlent que l'activité hépatique de SR-BI dans la captation hépatique des HDL, mais aussi possiblement des LDL et VLDL, protège contre le développement de l'athérosclérose (Tableau 3).

	Invalidation totale de SR-BI (souris SR-BI-KO)	Invalidation de SR-BI spécifiquement au niveau du foie (souris SR-BI-Ko <sup>hep</sup> )		Surexpression de SR-BI spécifiquement au niveau du foie (souris SR-BI <sup>hep</sup> *)	Invalidation de SR-BI spécifiquement au niveau du foie sous fond CETP tg (souris SR-BI-Ko <sup>hep</sup> /CETP <sup>tg</sup> )
	Régime	CD/HCD	CD	HCD	CD/HCD
HDL-C, LDL-C	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓	↑
Lipides Biliaires	↓ <sup>1,2</sup>	ND	ND	↑ <sup>3</sup> (CD)	ND
RCT	↓	↓	ND	ND	↓
Plaque d'athérome	↑ (sous HCD)	ND	↑ (x8 vs. souris sauvages)	↓ (sous fond LDLR-KO, HCD)	↑ (sous HCD, x4 vs. souris CETP <sup>tg</sup> )
Référence	(Rigotti et al., 1997), <sup>1</sup> (Mardones et al., 2001), (Zhang et al., 2005), <sup>2</sup> (Van Eck et al., 2003), (Huby et al., 2006), (Bouhassani et al., 2011)	(Huby et al., 2006) (Bouhassani et al., 2011)	(Huby et al., 2006) (Bouhassani et al., 2011)	(Ueda et al., 1999), (Y Ji et al., 1999), <sup>3</sup> (Kozarsky et al., 1997), <sup>4</sup> (Sehayek et al., 1998), (Arai et al., 1999)	(Bouhassani et al., 2011)

Tableau 3 : Relations entre les taux plasmatiques de HDL-C, les sécrétions biliaires et RCT, et le développement de l'athérosclérose en réponse à l'invalidation ou la surexpression du récepteur SR-BI impliqué dans la captation hépatique du HDL-C et LDL-C, dans différents modèles murins. \*Ou surexpression par infection à adénovirus. Souris CETP<sup>tg</sup> : model murin exprimant la CETP, CD : Chow Diet (régime normolipidique), HCD : High Cholesterol Diet, RCT : Reverse cholesterol transport.

### 1.3. Variants nucléotidiques du récepteur SR-BI chez l'homme.

#### 1.3.1. Mutations de SR-BI.

L'homologue humain de SR-BI est la protéine **CLA-1** localisée sur le chromosome 12. Chez l'homme, il existe deux transcrits du gène SCARB1 codant pour deux isoformes différentes. La première isoforme code pour une protéine de 509 acides aminés alors que la seconde code pour une protéine de 506 acides aminés, plus courte du côté C-terminal. Certaines familles ont pu être identifiées comme étant hyperHDLémiques suite à une mutation de CLA-1. Vergeer et al. ont été les premiers à identifier une mutation faux-sens fonctionnelle, **P297S**, chez un patient ayant des taux de HDL-C supérieurs au 95<sup>ème</sup> percentile. Les auteurs ont séquencé ce gène chez 124 membres de sa famille, parmi eux, 18 étaient également porteurs de cette mutation, aucun porteur hétérozygote n'a été identifié. Leurs taux de HDL-C étaient 32% plus élevés que ceux des non-porteurs. Leurs macrophages présentaient une moindre capacité d'efflux du cholestérol et leurs hépatocytes étaient incapables de réguler la captation sélective du cholestérol estérifié. En accord avec les observations faites chez les souris invalidées pour SR-BI, les porteurs de cette mutation avaient des particules HDL plus larges. Les porteurs de P297S présentaient également des plaquettes enrichies en cholestérol ayant une altération de leur fonction d'agrégation ainsi qu'une diminution de la stéroïdogénèse,

reproduisant ainsi le phénotype des souris déficientes pour SR-BI. Cependant, l'épaisseur intima-média carotidienne et le nombre d'évènements cardio-vasculaires des porteurs n'étaient pas significativement différents de ceux des non porteurs. Toutefois, cette étude a été réalisée sur un faible nombre de sujets relativement jeunes (moyenne d'âge de 45 ans environ), ce qui pourrait expliquer l'absence de différence significative (Vergeer et al., 2011).

Une seconde étude menée chez 120 sujets sans lien de parenté et ayant des taux de HDL-C au-delà du 90<sup>ème</sup> percentile a permis de mettre en évidence deux nouvelles mutations faux-sens, **S112F** et **T175A**, la fréquence des mutations de SCARB1 pour l'ensemble de ces sujets étant de 1,2%. Les porteurs hétérozygotes présentaient une augmentation de 37% des taux de HDL-C sans variation du LDL-C. Ces mutations ont été associées à une diminution de la liaison des HDL sur SR-BI et une captation sélective du cholestérol estérifié diminuée. Ces individus ne présentaient aucun antécédent de maladies cardiovasculaires (Brunham et al., 2011).

Au début de l'année 2016, Zanoni *et al.* ont mis en évidence une nouvelle mutation de SCARB1, **P376L**, dans une étude menée chez 852 sujets d'ascendance européenne ayant des taux de HDL-C élevés (moyenne de HDL-C de 95 mg/dl). Parmi cette population, 1 porteur homozygote de P376L et 15 hétérozygotes ont été identifiés, et bien que 3 hétérozygotes de cette mutation aient été identifiés au sein d'une autre cohorte de 758 sujets avec des faibles taux de HDL-C, le variant P376L est significativement surreprésenté chez des sujets avec des hyperHDLémies. L'analyse a ensuite été élargie au Global Lipid Genetics Consortium, consortium regroupant des données de génotypages d'exons issues de multiples GWAS chez >300 000 individus. Le variant P376L était rare dans cette population (minor allele frequency ou MAF d'environ 0,0003). Les porteurs hétérozygotes et homozygotes présentaient une augmentation de particules HDL larges, HDL<sub>2b</sub>, d'un facteur 2,8 et 6,1 respectivement, reproduisant donc le phénotype des souris invalidées pour SR-BI. Aucune altération du phénotype plaquettaire ou de la stéroïdogénèse n'a été rapportée dans leur étude. Pour analyser la fonctionnalité hépatique du récepteur SR-BI chez ces porteurs, des cellules souches pluripotentes (iPSCs) obtenues par induction de cellules mononucléaires sanguines périphériques et issues des porteurs ont été différenciées en hépatocytes. Les hépatocytes iPSCs du porteur homozygote présentaient une diminution significative de la captation sélective du cholestérol estérifié. Une altération de ce paramètre a également été détectée *in vitro* dans des cellules COS7 transfectées avec des plasmides codant pour SR-BI P376L. Afin d'étudier la captation hépatique des HDL *in vivo*, les auteurs ont surexprimé SR-BI-WT ou son variant P376L chez des souris sauvages par infection à adénovirus. Après injection de HDL radiomarquées sur la composante lipidique (<sup>3</sup>H-HDL-CE) ou protéique (<sup>125</sup>I-HDL), les souris exprimant le variant P376L présentaient une baisse de la clairance des <sup>3</sup>H-HDL-CE sans modification de la clairance du <sup>125</sup>I-HDL, reflétant une diminution de la captation

sélective du cholestérol estérifié contenu dans les HDL. Finalement, les auteurs ont voulu tester l'association entre le variant P376L et le risque coronarien, en analysant des données issues de 2 consortia, le CARDIoGRAM Exome Consortium et le CHD Exome+ Consortium. Parmi 49 846 coronariens et 88 149 témoins, les auteurs ont rapporté une augmentation significative du risque de maladie coronarienne chez les porteurs du variant P376L par rapport aux non porteurs (odds ratio = 1,79,  $p = 0,018$ ). La mutation P376L est donc la première mutation de SR-BI associée à la fois à une hyperHDLémie et à une augmentation nette du risque de maladie coronarienne chez l'homme (Zanoni et al., 2016).

En conclusion, la mutation P376L, qui reproduit les caractères phénotypiques principaux des souris invalidées pour SR-BI, est une preuve de concept chez l'homme que la concentration statique en HDL-C n'est pas systématiquement associée à une protection cardiovasculaire mais que la fonctionnalité des particules HDL, notamment dans le RCT, serait plus importante que le taux de HDL-C dans la protection cardiovasculaire.

### 1.3.2. Polymorphismes de SR-BI.

Acton et *al.* ont été les premiers à analyser les associations des SNPs dans SCARB1 et les paramètres lipidiques. En particulier, dans une cohorte de 489 hommes et femmes espagnols, le polymorphisme **rs4238001** (exon 1) a été retrouvé comme étant significativement associé à des taux de HDL-C augmentés et de LDL-C diminués chez les hommes mais pas chez les femmes ( $p < 0,05$ ) (Acton *et al.*, 1999). Le polymorphisme **rs5888** a également été largement étudié, avec une association avec le HDL-C uniquement significative parmi des hommes caucasiens, coronariens ou pas, et des femmes amishs (Nock & Chandran Pillai, 2009). Une étude plus récente a toutefois montré que l'association de ce variant avec le profil lipoprotéique et le risque myocardique dépendrait de l'âge et du sexe (Stanislovaitiene *et al.*, 2013).

Dans une étude pangénomique (GWAS) à grande échelle impliquant 100 000 individus, le SNP de SCARB1 **rs838880** a été associé à des taux de HDL-C élevés mais pas à la maladie coronarienne (Teslovich et al., 2010). Cependant, des polymorphismes dans l'exon 8 et l'intron 5 de SCARB1 ont été associés à la maladie coronarienne dans plusieurs populations (Acton *et al.*, 1999) (Hong et al., 2002) (McCarthy et al., 2003) (Rodriguez-Esparragon et al., 2005) (Ritsch et al., 2007), alors que le polymorphisme **rs4238001** (exon 1) a été associé à une augmentation de l'épaisseur intima-média des artères carotides (Fox et al., 2004). Plus récemment, le SNP **rs10846744** (intron 1) a été significativement associé avec l'épaisseur intima-média de l'artère carotide commune parmi plusieurs groupes ethniques et raciaux d'une cohorte du Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), avec une association particulièrement forte chez les femmes (Naj et al., 2010). Ultérieurement une

association du rs10846744 avec le risque d'infarctus du myocarde et de maladies cardiovasculaires a été rapportée dans cette même cohorte (Manichaikul et al., 2012). Ainsi, en synthèse, aucun polymorphisme n'a été clairement identifié comme étant associé à la fois à une hyperHDLémie et à une augmentation nette du risque de maladie coronarienne.

#### **1.4. Perspectives thérapeutiques.**

Dans le but d'augmenter les concentrations de HDL-C, les chercheurs ont développé des agents pharmaceutiques ciblant la captation hépatique des HDL *via* SR-BI. Dans cette perspective, Masson et *al.* ont testé un nouvel inhibiteur de SR-BI, ITX5061, chez la souris et chez l'homme. La molécule ITX5061, initialement caractérisée comme un inhibiteur de MAPK p38, a été identifiée comme un inhibiteur de l'activité SR-BI à la fois dans des cultures cellulaires et chez la souris. L'administration de ITX5061 chez des patients hypertriglycéridémiques augmente les concentrations de HDL-C d'environ 20% sans modification des concentrations de LDL-C et triglycérides. De plus, ITX5061 a induit une régression des lésions précoces dans l'arc aortique (-40% de la taille des lésions) dans un modèle murin d'athérosclérose, les souris LDLR<sup>+/-</sup> sous un régime athérogène. A ce jour, l'effet de cet inhibiteur sur le développement de l'athérosclérose chez l'homme n'a pas été évalué. Cependant l'effet bénéfique de l'inhibition de SR-BI qui participe à la captation hépatique des HDL et à l'efflux de cholestérol cellulaire est questionnable, puisque ceci entraînerait possiblement une altération du RCT chez l'homme (Masson et al., 2009) (Remaley, Norata, & Catapano, 2014). La protéine adaptatrice PDZK1, qui régule notamment l'expression protéique de SR-BI au niveau hépatique permettant ainsi une régulation tissu-spécifique de la fonction de SR-BI dans la captation sélective du cholestérol estérifié pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires. Par ailleurs, le miR-223 inhibe l'expression de SR-BI en se fixant sur la région 3' UTR de SR-BI et inhibe la captation hépatique du HDL-C dans des cellules HepG2 (L. Wang et al., 2013). Le miR-223 a été identifié comme un marqueur prédictif de la mortalité cardiovasculaire dans une large cohorte de patients atteints de maladie coronarienne (Schulte et al., 2015). L'inhibition de miR-223 permettra de mieux évaluer l'effet de ce miRNA dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose.

## 2. Voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>.

### 2.1. Découverte et mécanismes moléculaires impliqués.

#### 2.1.1. Rôle de la voie de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase / P2Y<sub>13</sub> dans l'endocytose de l'holo-particule HDL.

Notre laboratoire a montré sur des hépatocytes humains l'existence d'une voie d'endocytose de l'holoparticule HDL (lipides + protéines) dépendante de la formation des vésicules à clathrine (Garcia et al., 1996). Cette voie implique la participation de 2 récepteurs d'affinité différente pour les HDL : un site de haute affinité pour la particule HDL ( $K_d \sim 10^{-9}M$ ) et un site de basse affinité ( $K_d \sim 10^{-7}M$ ) et de grande capacité pour la particule HDL entière uniquement (Barbaras *et al*, 1994) (Guendouzi et al., 1998). Ces 2 sites de haute et basse affinité pour les HDL ont également été mis en évidence sur des membranes d'hépatocytes purifiées à partir de foie de rat et de porc (Morrison, McPherson, & Fidge, 1992) (Martinez et al., 2000). Le **récepteur de haute affinité** a été identifié comme étant la chaîne  $\beta$  de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase (Martinez et al., 2003), un complexe enzymatique classiquement localisé à la membrane interne de la mitochondrie. Contrairement au complexe mitochondrial qui possède une activité de synthèse d'ATP en condition de normoxie et une activité ATPasique en condition d'hypoxie, l'ATP synthase présente à la surface cellulaire possède uniquement une activité ATP hydrolase. Pour cette raison, ce complexe de surface a été nommé **ecto-F<sub>1</sub>-ATPase**. L'activité hydrolase de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase est stimulée par la liaison de l'apoA-I (libre ou associée au HDL) et l'ADP extracellulaire ainsi généré va stimuler spécifiquement un **récepteur purinergique P2Y<sub>13</sub>** (Jacquet et al., 2005). L'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> va ensuite déclencher une voie de signalisation intracellulaire impliquant une réorganisation du cytosquelette RhoA/ROCK I-dépendante (Malaval et al., 2009), qui *in fine* stimule l'endocytose de l'holo-particule HDL par un **récepteur de basse affinité, d'identité inconnue** mais distinct de SR-BI (Martinez et al., 2000) (Fabre et al., 2010).

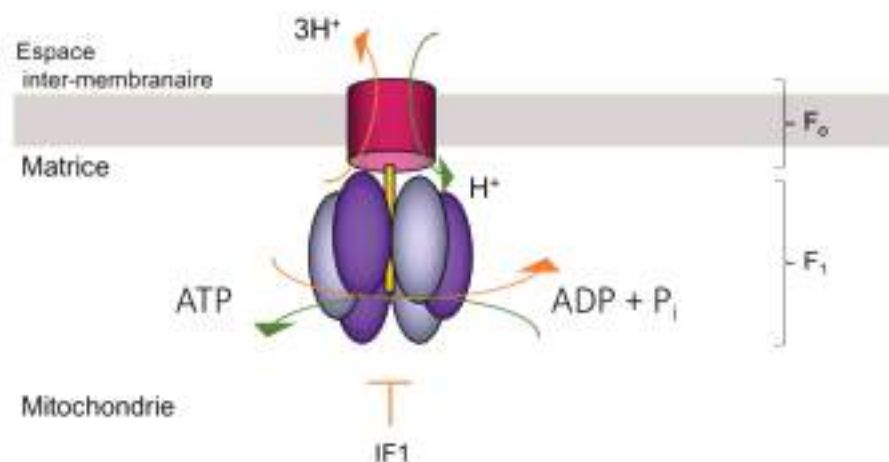
Il est intéressant de noter, que ce récepteur de haute et basse affinité, lie préférentiellement certaines sous-populations de HDL. En effet les petites HDL<sub>3</sub> et les remnants de HDL<sub>2</sub>, qui sont des particules petites et denses issues de la lipolyse des HDL<sub>2</sub> par la lipase hépatique, se lient aux sites de liaison de haute (ecto-F<sub>1</sub>-ATPase) et de basse affinité, alors que les HDL<sub>2</sub> ne se lient qu'au site de basse affinité (Barbaras et al., 1994) (Guendouzi et al., 1998). Sur des cellules HepG2 et sur foie de souris perfusé, l'internalisation des HDL<sub>2</sub> est stimulée d'environ 30% en présence d'apoA-I, ligand du site de liaison de haute affinité (i.e. de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase) (Martinez et al., 2003) (Jacquet et al., 2005). De plus, les remnants de HDL<sub>2</sub> sont internalisés par le foie plus rapidement et en plus grande



quantité que les HDL<sub>2</sub>, ces derniers se liant uniquement au site de liaison de basse affinité (Guendouzi et al., 1998).

### 2.1.2. La F<sub>1</sub>-ATPase : Structure, fonctions et implication dans l'endocytose des HDL.

L'ATP synthase est connue comme étant le complexe enzymatique terminal (Complexe V) associé à la chaîne respiratoire mitochondriale qui permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P<sub>i</sub> en utilisant l'énergie générée par un gradient de protons. L'ATP synthase est localisée dans le feuillet interne de la mitochondrie et est constituée de deux domaines majeurs, F<sub>1</sub> et F<sub>0</sub>. Le domaine F<sub>0</sub>, formé d'un nombre variable de sous-unités, est enchâssé dans la membrane où il joue un rôle de canal pour les protons issus des réactions de la chaîne respiratoire. Le domaine F<sub>1</sub> est un complexe globulaire extra-membranaire ancré sur F<sub>0</sub> et orienté vers la matrice mitochondriale. Celui-ci est composé de 9 sous-unités ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ) et comporte les 3 sites catalytiques pour la synthèse d'ATP (un dans chaque sous-unité  $\beta$ ). Dans des conditions normales, en présence de flux de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie, l'ATP synthase phosphoryle l'ADP en ATP (Boyer, 1997). Quand le flux de protons est absent, ce qui arrive en condition d'hypoxie, l'ATP synthase exerce la fonction inverse, à savoir, l'hydrolyse d'ATP en ADP et P<sub>i</sub>. Cette réaction inverse est régulée par la protéine mitochondriale de 10 kDa IF1, un inhibiteur naturel de l'activité hydrolase de l'ATP synthase, qui limite ainsi la perte d'énergie associée à l'hydrolyse de l'ATP produit et se révèle ainsi comme étant protecteur dans les conditions d'hypoxie (Pullman & Monroy, 1963) (Faccenda & Campanella, 2012) (Green & Grover, 2000).



**Figure 14** : Mécanisme d'action de l'ATP synthase mitochondriale. F<sub>0</sub> fonctionne comme une pompe à protons et F<sub>1</sub> est capable de synthétiser ou d'hydrolyser l'ATP suivant le sens de la force protomotrice. La protéine mitochondriale IF1 est un inhibiteur naturel de l'activité hydrolase de l'ATP synthase.

Notre équipe a montré la présence du domaine catalytique  $\alpha\beta$  de l'ATP synthase à la surface des hépatocytes humains. En effet, la liaison spécifique de l'apoA-I sur le récepteur de haute affinité a permis d'identifier par résonance plasmonique de surface (Biacore) et chromatographie d'affinité la chaîne  $\beta$  de l'ATP synthase comme étant le récepteur de haute affinité pour l'apoA-I (Martinez et al., 2003). L'ATP synthase de surface, également appelée ecto- $F_1$ -ATPase, possède uniquement une activité ATPasique qui est stimulée par la liaison de l'apoA-I (Vantourout et al., 2010).

IF1, l'inhibiteur endogène de l'activité ATPasique de l'ATP synthase mitochondriale (Campanella et al., 2008), est également capable d'inhiber l'activité ATPasique de l'ecto- $F_1$ -ATPase, avec pour conséquence une inhibition de l'endocytose des HDL (Martinez et al., 2003). IF1 exerce donc un effet inverse à celui de l'apoA-I. Ainsi, l'ajout d'IF1 recombinant sur des hépatocytes humains réduit l'activité de l'ecto- $F_1$ -ATPase et inhibe l'endocytose des HDL. Sur des foies de rats perfusés, IF1 recombinant est également capable d'inhiber de 50% l'internalisation de HDL radiomarquées (Martinez et al., 2003).

Par ailleurs l'ecto- $F_1$ -ATPase est également exprimée à la surface de différentes lignées de cellules endothéliales (BAEC, HUVEC) où elle est également capable de lier l'apoA-I (Cavelier et al., 2012) (Moser et al., 1999) (Radojkovic et al., 2009). Sur les cellules endothéliales aortiques bovines (BAEC), l'équipe de Von Eckardstein a montré que l'activité de l'ecto- $F_1$ -ATPase module la transcytose de l'apoA-I et des HDL (Cavelier et al., 2012). Sur les cellules endothéliales humaines (HUVEC), la liaison de l'apoA-I sur l'ecto- $F_1$ -ATPase stimule l'activité hydrolase et génère de l'ADP extracellulaire qui entraîne la prolifération des cellules endothéliales et réduit l'apoptose (Radojkovic et al., 2009).

### 2.1.3. Le récepteur P2Y<sub>13</sub> : caractéristiques et implication dans la voie d'endocytose des HDL.

Les nucléotides extracellulaires sont des molécules de signalisation qui activent des récepteurs nucléotidiques à la surface cellulaire et induisent différents effets biologiques. Il existe 2 groupes de récepteurs aux purines, les récepteurs P1 qui reconnaissent l'adénosine et les récepteurs P2 qui reconnaissent les nucléotides de type ADP, ATP, UDP, UTP. La famille des récepteurs P2 comporte 2 sous-groupes : les P2X qui sont des canaux ioniques et les P2Y qui sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Chez les mammifères, 8 récepteurs P2Y ont été identifiés et clonés : P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub> (von Kügelgen, 2006). Parmi ces 8 membres, uniquement les récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>13</sub> sont activés par l'ADP. Le récepteur P2Y<sub>13</sub> a une forte homologie avec P2Y<sub>12</sub> et possède des propriétés fonctionnelles similaires telles que le couplage à  $G\alpha_i$  (Communi et al., 2001).

L'expression de P2Y<sub>13</sub> est assez ubiquitaire mais est plus forte dans le foie, la rate, les leucocytes (surtout macrophages), les ganglions, la moelle osseuse et le cerveau, suggérant un rôle de ce récepteur dans le système immunitaire, hématopoïétique et nerveux. Le rôle de P2Y<sub>13</sub> dans le système immunitaire n'a pas encore été clairement identifié. Au niveau du système nerveux, des études récentes ont montré que P2Y<sub>13</sub> joue un rôle dans la douleur, la protection neuronale contre le stress oxydant et l'inhibition de la différenciation neuronale et de l'élongation axonale (Kobayashi et al., 2012) (Espada et al., 2010) (Yano et al., 2012) (del Puerto et al., 2012). Quant à sa fonction dans l'hématopoïèse, P2Y<sub>13</sub> oriente la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes au détriment de la différenciation en cellules adipocytaires, un phénomène observé dans l'ostéoporose liée à l'âge (Biver et al., 2013). De plus P2Y<sub>13</sub> est exprimé dans les ostéoblastes et les ostéoclastes et joue un rôle dans le remodelage osseux (N. Wang et al., 2012a) (Orriss et al., 2011).

Au niveau du foie, notre laboratoire a mis en évidence l'implication du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans l'endocytose de l'holoparticule HDL, en aval de l'activation de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase par l'apoA-I. Dans les travaux pionniers de l'équipe, la stimulation spécifique de l'endocytose hépatique des HDL par l'ADP extracellulaire a suggéré l'intervention d'un récepteur purinergique ayant pour agoniste l'ADP (Martinez et al., 2003). Le laboratoire a ensuite montré la présence d'ARNm des récepteurs purinergiques P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>13</sub> dans les hépatocytes humains et murins et l'absence du récepteur purinergique P2Y<sub>12</sub> (Jacquet et al., 2005). En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et des petits ARN interférents (siRNA), l'équipe a démontré que l'ADP extracellulaire généré par l'activation de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase par l'apoA-I stimule spécifiquement le récepteur P2Y<sub>13</sub> (Jacquet et al., 2005). Le récepteur P2Y<sub>13</sub> va ensuite déclencher une voie de signalisation intracellulaire impliquant une réorganisation du cytosquelette RhoA/ROCK I-dépendante (Malaval et al., 2009), qui stimule *in fine* l'endocytose clathrine-dépendante de l'holo-particule HDL par un récepteur de basse affinité, d'identité inconnue mais distinct de SR-BI (Figure 15) (Martinez et al., 2000) (Fabre et al., 2010).

L'identification du cangrelor (AR-C69931MX), classiquement décrit comme antagoniste du récepteur P2Y<sub>12</sub>, puis comme agoniste partiel du P2Y<sub>13</sub>, a fait de cette molécule un composé de choix pour le laboratoire dans l'étude de l'impact de ce récepteur dans le métabolisme des HDL.

#### 2.1.4. Régulation de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase et du récepteur P2Y<sub>13</sub>.

La voie d'adressage de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase à la membrane plasmique est à ce jour inconnue. Quant aux régulations pharmacologiques de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, il a été démontré que la niacine (vitamine B3), réduit d'environ 27% l'expression de la chaîne  $\beta$  de la F<sub>1</sub>-ATPase dans les cellules HepG<sub>2</sub> sans modifier ses taux d'ARNm et diminue l'endocytose des HDL par ces cellules. Les

mécanismes moléculaires de cette régulation restent encore non élucidés (L.-H. Zhang et al., 2008). La niacine est l'un des agents les plus puissants pour augmenter les taux de HDL-C chez l'homme. Un des mécanismes par lequel la niacine augmente les concentrations de HDL-C chez l'homme pourrait impliquer son action sur l'expression de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase *via* une diminution de la clairance des HDL plasmatiques par le foie (Verdier et al., 2013). Deux essais cliniques à grande échelle portant sur la niacine (AIM-HIGH et HPS2-TRHIVE) ont montré que la niacine ne diminue pas l'incidence des événements cardiovasculaires. Ces résultats soutiennent le concept selon lequel un taux élevé en HDL-C n'est pas forcément associé à une protection cardiovasculaire mais que les fonctions des particules HDL, incluant leur fonction dans le RCT, seraient plus importantes dans l'athéroprotection (Mani & Rohatgi, 2015).

La régulation post-transcriptionnelle du récepteur P2Y<sub>13</sub> a été étudiée. Notre équipe a démontré que l'ubiquitination constitutive du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le réticulum endoplasmique contribue à sa dégradation par le protéasome. Par conséquent, des inhibiteurs du protéasome, tels que le Bortezomib ou le MG-132, induisent une augmentation de l'expression du récepteur P2Y<sub>13</sub> à la membrane plasmique et une stimulation consécutive de l'endocytose hépatique du HDL médiée par P2Y<sub>13</sub> à la fois *in vitro* dans des cellules HepG2 mais aussi *ex vivo* dans des foies de souris perfusés (Pons et al., 2014). Une meilleure connaissance des mécanismes et des partenaires impliqués dans l'ubiquitination du récepteur P2Y<sub>13</sub> pourrait mettre en évidence de nouvelles approches thérapeutiques permettant d'augmenter son expression afin de promouvoir le RCT.

## 2.2. Etudes précliniques : rôle de P2Y<sub>13</sub> dans le RCT et l'athérosclérose.

L'importance de la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> dans le métabolisme des HDL et le développement de l'athérosclérose a été étudiée chez plusieurs modèles animaux pour lesquels le récepteur P2Y<sub>13</sub> a été invalidé par modification génétique ou activé pharmacologiquement par des agonistes.

### 2.2.1. Invalidation ubiquitaire du récepteur P2Y<sub>13</sub>.

Des souris invalidées pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> sous fond génétique C57BL/6 (P2Y<sub>13</sub>-KO) ont été générées par l'équipe de JM. Boeynaems et B. Robaye. Notre équipe a étudié le phénotype de ces souris sur le métabolisme des HDL, le RCT et le développement de l'athérosclérose.

En condition de normolipémie (régime chow diet), les souris P2Y<sub>13</sub> KO présentent des taux de cholestérol total, HDL-C, non-HDL-C et triglycérides qui restent inchangés par rapport aux souris contrôles (Fabre et al., 2010). Cependant, par rapport aux souris sauvages, les souris P2Y<sub>13</sub>-KO présentent **une diminution d'environ 20% de la captation hépatique des HDL** (marquées à l'iode

125), associée à une baisse de la concentration hépatique en cholestérol libre et une **baisse des sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides** (Tableau 4). L'impact de ce phénotype hépatobiliaire sur le RCT des macrophages vers les fèces a ensuite été étudié. Les souris P2Y<sub>13</sub>-KO ont montré une diminution du traceur tritium dans les stérols neutres et les acides biliaires retrouvés dans les fèces (Tableau 4). Ainsi, les souris P2Y<sub>13</sub> présentent un phénotype métabolique altéré, sans modification de la concentration plasmatique en HDL-C. Il est possible que chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO, les taux circulants de HDL ne soient pas affectés puisque la diminution de la captation hépatique des HDL, pourrait être compensée par une diminution de la biogénèse hépatique des HDL. Cette hypothèse est soutenue par la diminution de l'expression hépatique des transporteurs ABCA1 et ABCG1, impliqués dans la biogénèse des HDL, observée chez ces souris P2Y<sub>13</sub>-KO. Il est important de souligner que le phénotype de ces souris P2Y<sub>13</sub> (i.e. phénotype métabolique altéré, sans modification de la concentration plasmatique en HDL-C), suggère que la concentration statique en HDL-C ne reflète pas nécessairement le flux du cholestérol transporté par les particules HDL des tissus périphériques vers le foie (Francis, 2010).

En parallèle à cette étude, Blom *et al.* ont également généré des souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> et ont montré que l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> entraîne, à la fois chez les souris mâles et femelles, une légère diminution du cholestérol total plasmatique et du HDL-C, une diminution du RCT et une diminution de l'excrétion fécale de stérols neutres sans variations de l'excrétion fécale d'acides biliaires (Blom et al., 2010). Une des hypothèses proposées par les auteurs pour expliquer l'effet de l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> sur les lipides plasmatiques est que P2Y<sub>13</sub> ne modifie pas directement le métabolisme des HDL mais plutôt le catabolisme des métabolites dans les tissus hépatiques et extra-hépatiques qui à leur tour modifient le métabolisme des HDL. Un exemple de ces métabolites pourrait être les acides gras générés par la lipolyse dans les adipocytes qui peuvent altérer l'activité PPAR $\alpha$  dans le foie. L'activation de PPAR $\alpha$  étant associée à une augmentation modérée de HDL-C, son altération pourrait être responsable de cette baisse de HDL-C plasmatique observée chez ces souris (Wahli & Michalik, 2012) (Contreras, Torres, & Tovar, 2013) (Linsel-Nitschke & Tall, 2005) (Sahebkar, Chew, & Watts, 2014). Dans cette hypothèse proposée, la délétion de P2Y<sub>13</sub> aurait un effet différent dans le foie et dans le reste de l'organisme.

Notre équipe a ensuite étudié l'impact de l'inactivation de P2Y<sub>13</sub> en condition d'hypercholestérolémie, cause majeure de dyslipidémie chez l'homme. Pour cela, les souris P2Y<sub>13</sub>-KO ont été nourries avec un régime riche en cholestérol (1,25% cholestérol, 6% gras) pendant 16 semaines. Comme sous régime normal (chow diet), sous régime hypercholestérolémique, les souris P2Y<sub>13</sub>-KO ne présentent pas de variation des lipides plasmatiques par rapport aux souris sauvages (Lichtenstein et al., 2013). Par contre, les sécrétions de lipides biliaires et le RCT des macrophages vers les fèces sont diminués de façon plus importante chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO en condition

d'hypercholestérolémie qu'en condition de normolipémie (Lichtenstein et al., 2013). Ces données indiquent qu'un régime hypercholestérolémique accentue le phénotype métabolique des souris P2Y<sub>13</sub>-KO (Tableau 4).

L'impact sur le développement de l'athérosclérose induit par l'inactivation du récepteur P2Y<sub>13</sub> a été évalué en utilisant un modèle de souris susceptibles de développer l'athérosclérose, les souris apoE-KO. Ce travail, qui a permis de montrer que le récepteur P2Y<sub>13</sub> protège contre l'athérosclérose *via* son rôle sur le RCT hépato-biliaire, a fait l'objet d'un article auquel je suis associée et qui sera décrit dans la partie expérimentale de ce manuscrit (chapitre IV).

### 2.2.2. Activation du récepteur P2Y<sub>13</sub>.

L'effet de la surexpression de P2Y<sub>13</sub> n'a pas encore été étudié. Cependant, notre équipe a étudié l'effet de l'activation pharmacologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> *in vivo* chez la souris *via* l'administration en aigu et en chronique d'un agoniste partiel, le cangrelor (AR-C69931MX) (Fabre et al., 2010) (Serhan et al., 2013). En parallèle, la société Cerenis Therapeutics a étudié l'effet d'un agoniste spécifique de P2Y<sub>13</sub>, CT1007900, sur le métabolisme des HDL et le développement de l'athérosclérose chez différents modèles murins comme décrit ci-dessous (Tableau 4).

## 2.3. Etudes cliniques.

### 2.3.1. IF1 : un biomarqueur des maladies coronariennes.

Giorgio *et al.* ont montré que l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase et son inhibiteur naturel IF1 sont présents sur des membranes plasmiques purifiées à partir de foies de rats. Dans le cas de cholestase hépatique aiguë induite chez l'animal, caractérisée par une diminution de l'endocytose de l'holoparticule HDL, il a été observé une augmentation de l'expression d'IF1 associée à une diminution de l'activité de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase (Giorgio et al., 2010). Notre équipe a récemment mis en évidence la présence d'IF1 circulant dans le sérum humain, et nous avons mesuré ses niveaux sériques dans le cadre d'une étude cas-témoin (GENES) sur la maladie coronarienne. Cette étude a inclus 800 patients coronariens stables, âgés de 45 à 74 ans, et 800 individus contrôles de même âge et de sexe masculin. De façon intéressante, chez les sujets normolipémiques, les concentrations d'IF1 circulants sont positivement et indépendamment associées aux taux de HDL-C et d'apoA-I (Genoux et al., 2011). De plus, après ajustement en fonction de multiples facteurs de risque, IF1 apparaît comme un contributeur important et indépendant de la variabilité du HDL-C et de l'apoA-I, d'environ 10 et 30%, respectivement. En comparant les témoins aux patients coronariens (cas), les concentrations moyennes d'IF1 étaient 20% plus basses chez les cas que chez les témoins (0,43 mg /L *versus* 0,53

mg/L respectivement,  $p < 0,001$ ). De plus, après de multiples ajustements sur les facteurs de risque cardiovasculaire, les concentrations d'IF1 sont négativement liées au risque de maladie coronarienne. Plus particulièrement, chez les sujets ayant des taux abaissés de HDL-C ou d'apoA-I, ( $< 0,43$  g/L et  $< 1,37$  g/L, respectivement) un niveau élevé d'IF1 ( $\geq 0,47$  mg/L) est associé à une réduction de 70% du risque de maladie coronarienne. Ainsi ces études définissent IF1 comme un nouveau déterminant du HDL-C inversement corrélé au risque de maladies coronariennes. La mesure du taux d'IF1 sérique pourrait donc être particulièrement pertinente pour l'évaluation du risque cardiovasculaire chez les individus avec des taux de HDL-C bas. Ces travaux mettent également en évidence la relevance physiologique de la voie ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$  sur le métabolisme des HDL chez l'homme (Genoux et al., 2013).

Plus récemment, grâce à un suivi prospectif de 11 ans des patients coronariens inclus dans l'étude GENES, mon laboratoire a analysé la valeur prédictive d'IF1 sur la mortalité à long terme chez les patients coronariens. Sa valeur informative a été comparée à celle du HDL-C. Dans cette étude les concentrations d'IF1 ont été mesurées chez 577 hommes atteints de maladie coronarienne stable (âgés de 45 à 74 ans) issus de l'étude GENES. Le statut vital a été évalué chaque année. Le taux de mortalité rapporté a été de 29,5%, la mortalité cardiovasculaire représentant 62,4% de ces décès. La mortalité sur 10 ans a été de 28,5% chez les patients avec des taux d'IF1 bas ( $< 0,42$  mg/L) et de 21,4% chez ceux avec des taux élevés ( $\geq 0,42$  mg/L,  $p < 0,02$ ). L'étude a révélé que des taux d'IF1 circulant élevés, mais pas l'HDL-C, sont négativement associés à la mortalité toutes causes confondues ainsi que celle associée aux maladies cardiovasculaires. Pour IF1, cette corrélation reste significative après ajustement en fonction de multiples facteurs de risque cardiovasculaire associés à la mortalité (Genoux et al., 2016). De plus, l'étude a montré une corrélation positive entre IF1 et le nombre de particules HDL (HDL-P), ainsi que la taille des particules HDL (HDL-S).

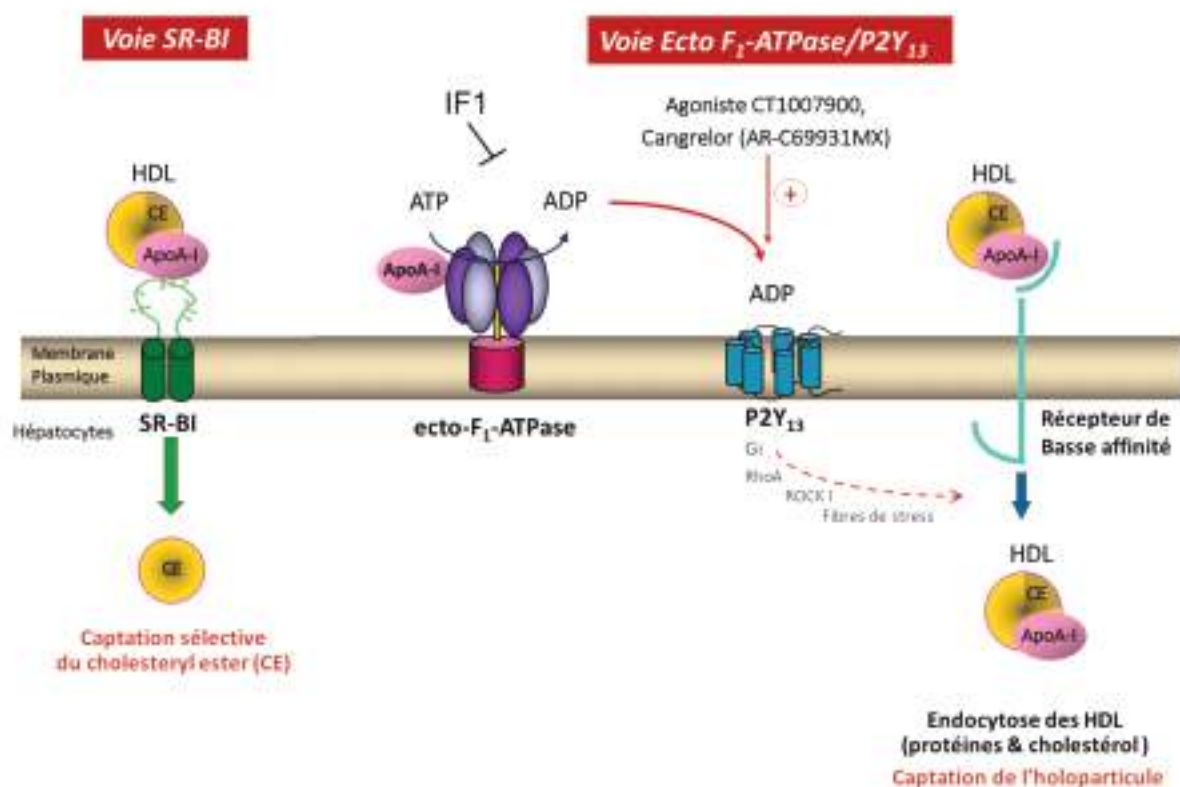
L'absence d'association entre le taux de HDL-C et la mortalité chez les patients coronariens est en accord avec d'autres études (Silbernagel et al., 2013). Une des hypothèses qui pourrait expliquer ceci est que les fonctions protectrices des HDL sont altérées chez les patients coronariens (Angeloni et al., 2013) et que le taux de HDL-C ne refléterait alors plus la fonctionnalité des particules HDL. En effet, comme démontré par les auteurs de ces études (Angeloni et al., 2013), les patients coronariens présentent des caractéristiques du syndrome métabolique avec une hypertriglycéridémie modérée, condition qui altère à long terme la composition lipidique et protéique des HDL, conduisant à la perte de leur propriétés athéroprotectrices.

Nous pouvons émettre 2 hypothèses pour expliquer l'association négative entre le taux d'IF1 et le risque cardiovasculaire. En prenant en compte que l'ajout d'IF1 recombinant exogène diminue l'endocytose des particules HDL dans les cellules HepG2 et sur des foies de rats perfusés, l'IF1 endogène circulant chez l'homme pourrait ralentir l'endocytose hépatique des HDL. Ainsi, un taux

élevé d'IF1 serait associé à un ralentissement de l'endocytose hépatique des HDL et donc à une augmentation du HDL-C qui permettrait de prolonger le temps de résidence des particules HDL en leur permettant de mieux exercer leurs effets pléiotropiques athéroprotecteurs (i.e. antioxydant, anti-inflammatoire, antithrombotique, cytoprotecteur). Cependant, un ralentissement de l'endocytose hépatique des HDL pourrait avoir également des effets délétères en diminuant le RCT. Une deuxième hypothèse que nous privilégions et qui expliquerait cette association négative entre IF1 et risque cardiovasculaire est que IF1 puisse se dissocier de la membrane plasmique où il serait constitutivement lié à l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase en l'inhibant. Ainsi, le taux d'IF1 circulant refléterait une activité augmentée de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase dans l'endocytose des HDL. Cette hypothèse est soutenue par des études qui montrent que l'IF1 endogène est retrouvé à la membrane plasmique de plusieurs lignées cellulaires, incluant les hépatocytes, où il inhibe de façon constitutive l'activité de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase (Giorgio et al., 2010) (Cortés-Hernández et al., 2005) (Contessi et al., 2007). Dans ce contexte, il a été démontré que l'apoA-I entre en compétition avec l'IF1 pour les mêmes sites de liaison sur l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase (Radojkovic et al., 2009). La liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase contribuerait donc à la dissociation d'IF1, avec pour conséquence une levée de l'inhibition de l'activité ATPasique de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase et la génération d'ADP extracellulaire capable de stimuler l'endocytose des HDL *via* le récepteur P2Y<sub>13</sub>. Cependant les voies sécrétoires d'IF1 ne sont pas encore élucidées et d'autres mécanismes pourraient réguler les taux sériques d'IF1.

En conclusion, ces études mettent en évidence que l'IF1 est un nouveau biomarqueur associé au HDL-C et à l'apoA-I, négativement corrélé au risque cardiovasculaire et à la mortalité chez les patients coronariens, indépendamment des facteurs de risque classiques. La mesure d'IF1 permet d'apporter une valeur informative additive sur le risque cardiovasculaire, que les taux de HDL-C soient faibles ou élevés.





**Figure 15 :** Captation hépatique du HDL-C par la voie SR-BI et la voie ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ . La voie SR-BI est responsable de la captation sélective du cholestérol estérifié contenu dans le cœur des HDL. La voie ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$ , est responsable de l'endocytose de l'holoparticule HDL (composante protéique et lipidique). Dans cette voie, l'apoA-I, apolipoprotéine majoritaire des HDL, se lie à l'ecto- $F_1$ -ATPase en surface des hépatocytes, et active son activité ATP hydrolase. L'ADP extracellulaire ainsi généré, va activer spécifiquement le récepteur purinergique  $P2Y_{13}$ , qui à son tour, induit une cascade de signalisation intracellulaire qui permet *in fine* l'endocytose clathrine-dépendante de la particule HDL par un récepteur de basse affinité, différent de SR-BI, et dont l'identité reste à être élucidée. Cette voie ecto- $F_1$ -ATPase/ $P2Y_{13}$  est inhibée *in vitro* (hépatocytes humains) et *ex vivo* (foies de rats perfusés) par l'inhibiteur endogène de la  $F_1$ -ATPase, IF1, et peut être activée par des agonistes du récepteur  $P2Y_{13}$  tels que le cangrelor et le CT1007900 (Cerenis Therapeutics).

## 2.4. Perspectives thérapeutiques.

Notre équipe a étudié l'effet de l'activation du récepteur  $P2Y_{13}$  *in vivo* chez la souris via l'administration d'un agoniste partiel, le cangrelor (AR-C69931MX), en administration aiguë et chronique. L'administration aiguë du cangrelor a été réalisée en injectant un bolus par voie intraveineuse. Pour l'administration en chronique, du fait de sa demi-vie d'une dizaine de minutes, le cangrelor a été infusé sur 3 jours à l'aide de pompes osmotiques de type Alzet® implantées en sous-cutané (Fabre et al., 2010) (Serhan et al., 2013). Chez la souris sauvage (C57BL/6), l'activation du récepteur  $P2Y_{13}$  en aigu par le cangrelor se traduit par une augmentation de l'endocytose hépatique

des HDL qui se reflète par une diminution du HDL-C plasmatique et une augmentation des sécrétions de lipides dans la bile. Ces effets n'étaient pas retrouvés chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO. De façon intéressante, cet effet stimulateur du cangrelor sur l'endocytose hépatique des HDL et les sécrétions de lipides biliaires est également observé chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, suggérant que l'endocytose hépatique des HDL médiée par la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> est indépendante de la voie de captation sélective du cholestérol estérifié des HDL médiée par SR-BI. Plus récemment l'équipe a montré que l'administration chronique du cangrelor pendant 3 jours stimule l'endocytose hépatique des HDL par le foie, avec cette fois-ci une diminution des taux de HDL-C plasmatique (Tableau 4) (Serhan et al., 2013).

La société Cerenis Therapeutics a récemment développé un agoniste spécifique du récepteur P2Y<sub>13</sub>, (CT1007900) qui a la capacité de réguler le métabolisme des HDL et d'inhiber la progression de l'athérosclérose *in vivo*. Des souris C57BL/6 ont reçu une administration de l'agoniste CT1007900 en aigu par injection intraveineuse ou gavage oral et des HDL radiomarquées sur leur composante lipidique (<sup>3</sup>H-Cholestérol-HDL) ont été injectées par voie intraveineuse. L'agoniste induit une augmentation du marqueur tritié dans le foie et dans les fèces reflétant une augmentation de la captation hépatique du HDL-C. Cette augmentation est associée à une **augmentation des concentrations biliaires** en cholestérol et acides biliaires et une diminution du taux de cholestérol plasmatique. Pour évaluer l'effet de l'agoniste sur le développement de l'athérosclérose, les auteurs ont administré l'agoniste par doses répétées pendant 2 semaines dans deux modèles murins d'athérosclérose, le modèle de lésion par ligature de la carotide chez les souris apoE-KO (« flow cessation model ») et le modèle d'athérosclérose induite par un régime hypercholestérolémiant chez les souris apoE-KO. L'agoniste a induit une **diminution de la taille des plaques d'athérome**, de leur épaisseur et de leur contenu en cholestérol et en macrophages chez ces deux modèles murins. Afin de démontrer que les effets de cet agoniste sur le métabolisme des HDL et la plaque sont bien spécifiques de l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub>, ces souris ont été infectées par un adénovirus comportant un shRNA (Short hairpin RNA, molécule d'ARN interférence) ciblant le récepteur P2Y<sub>13</sub>. L'effet du CT1007900 sur le contenu hépatique en cholestérol libre et le contenu en cholestérol au sein des carotides est aboli chez les souris traitées par ce shRNA. Leur étude a également montré que l'agoniste induit une stimulation de la synthèse hépatique de l'apoA-I et de la formation des particules HDL de petite taille. Ceci, associé à l'augmentation de l'endocytose hépatique des HDL, se traduit par un profil lipoprotéique particulier avec **diminution du HDL-C** associée à une **augmentation des particules HDL de taille intermédiaire et une diminution des HDL larges**. Ces particules HDL de taille intermédiaire sembleraient être plus efficaces dans l'efflux de cholestérol à partir des macrophages situés dans la plaque, et contribueraient ainsi à limiter le contenu en cholestérol de la plaque. En effet les auteurs ont observé que le plasma des souris traitées avec le

CT1007900 a une capacité d'efflux de cholestérol augmentée par rapport aux contrôles (Tableau 4) (Goffinet et al., 2014). Enfin, des effets similaires du CT1007900 sur le métabolisme des HDL et le développement de l'athérosclérose ont également été retrouvés chez le lapin. L'administration de cet agoniste pendant 4 semaines chez des lapins sous régime gras induit une diminution de l'épaisseur de la plaque d'athérome de 30% (Barbaras et al., 2012).

L'ensemble de ces travaux montre pour la première fois le rôle important du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le métabolisme des HDL et le RCT (Tableau 4). L'agoniste du récepteur P2Y<sub>13</sub>, CT1007900, montre des résultats prometteurs dans ces premières études précliniques et constitue un candidat-médicament intéressant dans le traitement de la maladie coronarienne.

Régime/ traitement	Invalidation de P2Y <sub>13</sub> (souris P2Y <sub>13</sub> KO)		Activation de P2Y <sub>13</sub> par un agoniste (chez les souris WT)		Activation de P2Y <sub>13</sub> par un agoniste (chez le lapin)
	CD	HCD	Cangrelor	CT1007900 (Cerenis)	CT1007900 (Cerenis)
HDL-C	↔	↔	↓	↓ (avec ↓ des HDL larges et ↑ des petites HDL)	↓ (avec ↓ des HDL larges et ↑ des petites HDL)
Lipides Biliaires	↓	↓↓	↑	↑	ND
RCT	↓	↓	ND	ND	ND
Plaque d'athérome	Sous fond apoE-KO	↔	ND	↓ (fond apoE-KO)	↓ (-30%, sous HCD)
Référence	(Fabre et al., 2010) (Blom et al., 2010)	(L. Lichtenstein, Serhan et al., 2013)	(Serhan et al., 2013)	(Goffinet et al., 2014)	(Barbaras et al., 2012)

**Tableau 4** : Relations entre les taux plasmatiques de HDL-C, les sécrétions biliaires et RCT, et le développement de l'athérosclérose en réponse à l'invalidation ou l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> impliqué dans l'endocytose hépatique des HDL. CD : Chow Diet (régime normolipidique), HCD : High Cholesterol Diet, RCT : Reverse Cholesterol Transport.

## **CHAPITRE III :**

# **LES HDL DANS LA PRÉVENTION ET LE TRAITEMENT DU RISQUE CARDIOVASCULAIRE : UN CHANGEMENT DE PARADIGME?**

## 1. HDL et génétique.

L'étude épidémiologique de Framingham a mis en évidence qu'une concentration de HDL-C  $<1$  mmol/L (40 mg/dL) est considérée comme un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires (Castelli et al., 1977). Ultérieurement d'autres études épidémiologiques prospectives à grande échelle, dont les études de Tromsø Heart (Miller et al., 1977) et PROCAM (Assmann et al., 1996) ont montré une corrélation positive entre des concentrations basses de HDL et un développement accéléré de l'athérosclérose et des maladies coronariennes. Une baisse de 0,03 mmol/L (1 mg/dL) de la concentration de HDL-C a été associée avec une hausse de 2-3% du risque cardiovasculaire (Hausenloy & Yellon, 2008). De plus l'étude Tromsø Heart a démontré qu'un nombre réduit de particules HDL (en utilisant les concentrations d'apoA-I comme marqueur) et une réduction du contenu en cholestérol des particules HDL, constituent deux facteurs cruciaux dans l'association entre un taux plasmatique de HDL-C bas et l'incidence de l'infarctus du myocarde (IDM) (Ishikawa et al., 1978). La relevance clinique des conclusions a été renforcée par l'étude à grande échelle INTERHEART conduite dans 52 pays du monde entier, dans laquelle le risque d'un premier IDM a été démontré comme fortement associé à un ratio élevé de LDL-C sur HDL-C ( $>6:1$ ) (McQueen et al., 2008) (Yusuf et al., 2004). Cependant ces données épidémiologiques n'infèrent pas de lien causal entre un taux de HDL-C abaissé et une augmentation du risque cardiovasculaire.

### 1.1. Mutations monogéniques et concentrations de HDL-C.

Les taux de HDL-C seraient génétiquement déterminés pour une part de 40 à 60% (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). Ceci explique que de nombreuses études génétiques familiales aient mis en évidence des désordres monogéniques portant sur des partenaires du métabolisme des HDL. Caractérisés par des taux extrêmes de HDL-C, ces désordres se transmettent de façon autosomale (dominante ou récessive).

Parmi les désordres monogéniques conduisant à l'hypoHDLémie, on retrouve les mutations d'acteurs clés du métabolisme des HDL telles que l'apoA-I, l'ABCA1 et la LCAT ou encore la LPL.

Les déficits en **apoA-I** se caractérisent par un tableau clinique varié qui diffère selon le lieu de la mutation. Les mutations faux-sens ou non-sens altèrent la biogénèse des particules HDL et engendrent une très forte diminution de HDL chez les homozygotes (Arnold von Eckardstein, 2006). Des taux indétectables d'apoA-I ne sont pas toujours associés à un risque cardiovasculaire augmenté comme en témoignent certains cas rapportés. A titre d'exemple, nous avons le cas rapporté par H

Yokota, d'une femme porteuse d'une mutation perte de fonction d'apoA-I (Yokota *et al.*, 2002). Cette patiente de 69 ans, présentait des taux d'apoA-I inférieurs à 0,6 mg/dL et un HDL-C compris entre 0,10 et 0,18 mmol/L, associés à des taux de LDL-C élevés malgré un traitement par statines et souffrait également d'une hypertension artérielle. De façon remarquable, cette patiente ne présentait aucun symptôme de maladie coronarienne, malgré la présence de nombreux facteurs de risque. Nous pouvons également citer l'exemple de l'apoA-I Oita (Val156Glu ou V156E). Cette mutation faux-sens a été retrouvée chez un individu de 67 ans et est associée à des déficits importants en apoA-I et en HDL et une atteinte coronaire. Ce patient homozygote pour cette mutation présente de nombreux facteurs de risque (indice de masse corporelle à 27,5 kg/m<sup>2</sup>, tabagisme important). Cependant son frère plus âgé, lui aussi porteur homozygote, n'a jamais présenté de symptômes pouvant être associés à une pathologie cardiovasculaire (Huang *et al.*, 1998). Finalement, l'apoA-I Milano (variant de l'apoA-I caractérisé par la substitution d'une arginine en position 173 par un cystéine) est l'exemple le plus connu et le mieux étudié illustrant le paradoxe posé par de faibles taux d'apoA-I sans développement d'athérosclérose associé. Dans une ville d'Italie, approximativement 40 porteurs de l'apoA-I Milano ont été identifiés. Ces individus présentaient des taux de HDL-C très faibles (10 à 30 mg/dL) et un développement d'athérosclérose beaucoup moins sévère que celui attendu en se basant sur leur taux de HDL-C (Franceschini *et al.*, 1985). Certaines études ont montré que le sérum de ces malades a une capacité d'efflux de cholestérol (via ABCA1) qui est augmentée (Favari *et al.*, 2007) (Franceschini *et al.*, 1999), d'autres ont montré que cette capacité est similaire à celle des individus contrôles, mais que l'apoA-I Milano possède une puissante activité anti-oxydante qui lui permet d'empêcher l'oxydation des phospholipides par la lipoxygénase (Bielicki & Oda, 2002). Le phénotype athéroprotecteur conféré par l'apoA-I Milano a conduit au développement de HDL reconstituées contenant de l'apoA-I Milano (Franceschini *et al.*, 1999). A la fin de l'année 2016, le développement clinique des HDL reconstituées contenant de l'apoA-I Milano a été arrêté par manque d'efficacité sur la régression du volume de la plaque d'athérosclérose mesuré par ultrason intra-vasculaire (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02678923). Cependant, des HDL reconstituées de composition différente telles que le **CSL-112** (CSL Behring) et le **CER-001** (Cerenis Therapeutics) sont encore en évaluation dans des essais cliniques de phase II (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02108262) et III (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02697136), respectivement, et leurs résultats permettront d'évaluer le réel bénéfice clinique des infusions de HDL reconstituées.

Les désordres associés aux mutations monogéniques de **ABCA1**, comme nous l'avons vu précédemment, sont associés à l'apparition de 2 syndromes : l'hypoalphalipoprotéïnémie familiale causée par des mutations hétérozygotes de ABCA1 et la maladie de Tangier causée par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites de ABCA1. Parmi les patients atteints de

l'hypoalphalipoprotéinémie familiale, il existe une hétérogénéité importante des taux de HDL-C (variant de 5% à la normale). Les individus souffrant de la maladie de Tangier présentent, quant à eux des taux extrêmement bas de HDL-C variant entre 1% et 10% par rapport à des individus contrôles. Le risque de développer une pathologie cardiovasculaire de façon précoce chez les patients souffrant de ces désordres existe mais il n'est pas proportionnel à la baisse du HDL-C (Frikke-Schmidt, 2010). Par ailleurs, dans certaines familles porteuses on n'observe pas d'augmentation du risque, ce qui pourrait s'expliquer par les faibles concentrations de LDL-C de ces patients (Schaefer et al., 1980).

Dans la littérature, très peu de cas de déficit en **LCAT** sont recensés. La transmission est autosomale récessive et la prévalence est inférieure à 1 pour 1 000 000 (description de 30 familles atteintes) (Savel *et al.*, 2012). Ces mutations se traduisent par 2 syndromes cliniques différenciés selon l'intensité du déficit enzymatique : la maladie de Norum, caractérisée par un déficit total de la LCAT (perte des activités  $\alpha$  et  $\beta$  de la LCAT) et la « maladie des yeux de poisson », caractérisée par un déficit partiel de la LCAT (perte uniquement de l'activité  $\alpha$ ) qui résulte dans une perte de l'estérification du cholestérol des HDL mais pas des LDL. Le défaut de formation d'esters de cholestérol est responsable de l'absence de particules HDL matures chez ces patients. Les patients souffrant de l'une ou l'autre de ces pathologies présentent habituellement des faibles taux de HCL-C (<0,1g/L ou 0,3 mM), valeurs qui restent supérieures à celles retrouvées pour les déficits en apoA-I ou la maladie de Tangier. Malgré les faibles taux de HDL-C, l'association de ces deux syndromes avec un risque accru d'athérosclérose n'est pas clairement établie, des études conflictuelles ayant été publiées à ce sujet (Fotakis et al., 2015) (Savel *et al.*, 2012).

La **lipoprotéine lipase** possède une activité enzymatique d'hydrolyse des triglycérides présents dans les chylomicrons et les VLDL. La transmission est autosomale récessive et très peu de cas sont recensés (prévalence de 1 pour 1 000 000). Le phénotype lipidique/lipoprotéique chez les patients porteurs de ces mutations est caractérisé par une hypertriglycémie sévère (accumulation de chylomicrons et de VLDL) et des taux très bas de LDL-C et HDL-C (<20mg/dL), (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). Ces individus ne présentent pas un risque accru de maladie coronarienne, ce qui suggère qu'une augmentation significative des taux plasmatiques de triglycérides ne suffit pas à augmenter le risque coronarien (Kral & Becker, 2007) (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010).

Les études sur l'association entre un risque cardiovasculaire élevé et les désordres familiaux conduisant à une diminution de HDL-C tels que ceux concernant les mutations de l'apoA-I, l'ABCA1, la LCAT et la LPL ont donc conduit à une conclusion mitigée. Il en est de même pour les mutations conduisant à une augmentation des taux de HDL-C ou hyperalphalipoprotéinémie familiale, telles que les mutations des gènes codant pour la CETP, SR-BI, comme nous l'avons vu précédemment, ou

encore la lipase hépatique. Les hyperalphalipoprotéïnémies familiales sont définies par un contexte familial d'élévation des taux de HDL-C au-delà du 90<sup>ème</sup> percentile de la distribution selon l'âge et le sexe. Le déficit en **lipase hépatique** se caractérise par une diminution de l'activité lipolytique, une élévation des taux de HDL-C et LDL-C et une hypertriglycéridémie (Kral & Becker, 2007). La mutation la plus étudiée de ce gène est le polymorphisme rs1800588. Une méta-analyse portant sur 18 études et plus de 11 000 cas a rapporté une absence d'association entre ce polymorphisme et les maladies cardiovasculaires (H. Wang, Jiang, & Qiu, 2010). Concernant les mutations du gène **SR-BI**, la mutation P376L est à ce jour la seule mutation de SR-BI associée à la fois à une hyperHDLémie et à une augmentation significative du risque de maladie coronarienne chez l'homme (odds ratio = 1,79, p = 0,018) (Zanoni et al., 2016). Ainsi, les études épidémiologiques ayant évalué l'association entre les mutations dans le gène CETP, qui conduisent à une forte augmentation des taux de HDL-C, et le risque cardiovasculaire, offrent une réponse ambiguë. Il semblerait donc que la susceptibilité à développer l'athérosclérose soit en partie liée au type de mutations, à la présence de facteurs de risque ou encore au groupe ethnique.

## **1.2. Lien entre les SNPs régulant les taux de HDL-C et le risque coronarien.**

Afin d'approfondir les connaissances sur le lien entre la génétique et les HDL, une dizaine d'études pangénomiques ciblant des populations d'ascendance européenne ont étudié les associations entre des centaines de milliers de SNPs et les taux de HDL-C (Heid *et al.*, 2008) (Kathiresan *et al.*, 2008) (Kathiresan *et al.*, 2009) (Aulchenko *et al.*, 2009) (Ridker *et al.*, 2009) (Sabatti *et al.*, 2009) (Waterworth *et al.*, 2010) (Willer *et al.*, 2008) (Teslovich *et al.*, 2010) (K. Wang *et al.*, 2011). Parmi ces études, figure notamment une méta-analyse de 46 études génétiques qui a permis de mettre en évidence l'association de 95 loci avec les lipides plasmatiques chez plus de 100 000 individus (Teslovich *et al.*, 2010). Une association avec le HDL-C a été trouvée pour 47 loci et les associations les plus fortes concernent des acteurs déjà connus du métabolisme du HDL : CETP, lipase hépatique et lipoprotéine lipase. Le lien entre polymorphismes associés aux taux de HDL-C et le risque coronarien a été étudié dans certaines des GWAS. Teslovich *et al.* (Teslovich *et al.*, 2010) ont évalué l'effet de loci identifiés chez 24 607 coronariens d'ascendance européenne et 66 197 contrôles. Cela a permis de mettre en évidence trois nouveaux loci associés aux taux de HDL-C mais aussi à la maladie coronarienne : *IRS-1* (Insulin receptor substrate 1), *C6orf106* (chromosome 6 open reading frame 106) et *KLF14* (Kruppel-like factor 14). La fonction du gène de *C6orf106* n'est toujours pas connue, *KLF14*, quant à lui, code un facteur de transcription dont l'expression est induite par la TGF- $\beta$  (Gonzalez et al., 2013). Toutefois, il n'existe pas un lien de causalité entre la régulation des



taux de HDL-C et le risque coronarien pour ces trois gènes là. D'autres loci influençant les taux de HDL-C s'associent également au risque coronarien ; c'est le cas du rs708272 (proche du gène codant la *CETP*) dans une cohorte de 18 245 individus américains initialement en bonne santé (Ridker *et al.*, 2009).

Deux études de **randomisation mendélienne** ont récemment remis en cause le rôle du HDL-C dans l'athéroprotection. La première a testé l'impact d'un SNP de la lipase endothéliale (*LIPG*, Asn396Ser) dans 20 études incluant plus de 20 000 cas IDM et 95 000 contrôles (Voight *et al.*, 2012). Les porteurs de cette mutation avaient des taux plus élevés de HDL-C de 0,14 mmol/L, mais le reste du bilan lipidique et des facteurs de risque étaient similaires aux autres individus de l'étude. Alors que cette augmentation du HDL-C aurait dû être associée à une réduction du risque d'IDM de 13%, il n'y avait ici aucune diminution du risque. La même méthode d'analyse a été utilisée pour étudier l'effet d'une mutation associée au gène de la *LCAT* (S208T, rs4986970) (Haase *et al.*, 2012). Alors que les études épidémiologiques ont montré qu'une diminution de 0,21 mmol/L du HDL-C était associée à une augmentation du risque d'IDM de 18%, une diminution similaire des taux de HDL-C résultant de cette mutation n'était pas associée à une augmentation du risque d'IDM. Les résultats de ces deux études ont donc mis en cause la notion de rôle athéroprotecteur du HDL-C en mettant en avant l'absence de causalité entre taux de HDL-C et IDM. Toutefois, ces études de randomisation mendélienne présentent des limites qu'il faut considérer afin de les interpréter au mieux. Il faut que le phénotype intermédiaire ici, le taux de HDL-C, soit associé à la survenue (IDM), que le variant s'associe à l'IDM uniquement à travers ses effets sur le HDL-C et que la technique de génotypage permette d'éviter les biais instrumentaux (Harrison, Holmes, & Humphries, 2012). Une des principales limites possibles dans ces études serait qu'il n'est pas possible d'exclure les autres effets de la *LIPG* et de la *LCAT*, notamment leurs effets antioxydants.

## **2. Biomarqueurs associés aux HDL et leur intérêt dans la prédiction et le traitement du risque cardiovasculaire.**

Alors que les études épidémiologiques ont mis en évidence qu'une concentration de HDL-C <1 mmol/L (40 mg/dL) était considérée comme un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires (Hausenloy & Yellon, 2008), il a récemment été montré que 33% des hommes et 40% des femmes traités pour des dyslipidémies en Europe présentent des concentrations de HDL-C faibles (Bruckert, 2006). Les taux plasmatiques bas de HDL-C sont donc fréquents dans la population et les stratégies visant à augmenter ces taux peuvent donc être prometteuses. Des nombreux agents pharmaceutiques ont été développés dans ce but. La **niacine**, aussi connue comme acide nicotinique ou vitamine B3 est l'agent pharmacologique le plus utilisé pour augmenter les taux de HDL-C

(augmentation de 16 à 25%) (Mani & Rohatgi, 2015). La niacine diminue également les lipides et lipoprotéines pro-athérogènes tels que le cholestérol total, les triglycérides, les VLDL et les LDL. Les mécanismes impliqués dans les effets de la niacine sur le HDL-C restent peu clairs mais pourraient impliquer la modulation de l'activité de la CETP ou la clairance des HDL (diminution de l'expression de la chaîne  $\beta$  de l'ATP Synthase à la surface des cellules HepG2). Deux essais à grande échelle, AIM-HIGH (Atherosclerosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglycerides and Impact on Global Health Outcomes) et HPS2-THRIVE (Heart protection Study 2-Treatment of High density lipoprotein to reduce the Incidence of Vascular Events), ont évalué l'effet de l'adjonction de niacine aux statines, par rapport à l'administration des statines en monothérapie, sur la diminution du risque cardiovasculaire chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires associées à l'athérosclérose (3500 et plus de 25 600, respectivement) (Nicholls, 2012) (Mani & Rohatgi, 2015). Or malgré l'augmentation du HDL-C observée, l'ajout de la niacine ne diminuait pas les événements cardiovasculaires. A l'inverse, une méta-analyse de 11 essais cliniques, incluant l'étude AIM-HIGH, menée sur un total de 9 959 individus, a montré qu'une thérapie à base de niacine était associée à une réduction significative des événements associés aux maladies cardiovasculaires (Lavigne & Karas, 2013).

Les **fibrates** (Fénofibrate, Bézafibrate, Ciprofibrate, Gemfibrosil), ligands de PPAR $\alpha$  couramment utilisés en clinique comme médicaments hypolipémiants, sont d'autres molécules pharmacologiques permettant d'augmenter les taux de HDL-C, *via* la régulation de gènes clés du métabolisme des HDL tels que l'ABCA1, la LPL, l'apoC-III, la PLTP, l'apoA-I et l'apoA-II (Farnier et al., 2006). En accord avec la capacité des fibrates à augmenter les concentrations de HDL-C et diminuer celles de triglycérides et LDL-C, les effets des fibrates sur l'incidence des maladies coronariennes semblent être plus prononcés chez des patients présentant des taux de triglycérides élevés (200 mg/dL) et/ou HDL-C faibles (40 mg/dL) (Jun et al., 2010) (Staels, 2010). Cependant, des nombreuses essais cliniques (essai ACCORD, essai FIELD, etc..) rapportent des résultats controversés et mettent en avant l'absence de preuve irréfutable du bénéfice clinique à utiliser des fibrates dans la réduction du risque coronarien (Ginsberg, 2011) (Keech et al., 2005) (Goldfine, Sanjay, & Hiatt, 2011).

Finalement, les **inhibiteurs de la CETP** sont une autre classe importante d'agents pharmacologiques permettant d'augmenter de façon significative les taux de HDL-C. Comme nous l'avons vu, les essais cliniques de phase III de 3 inhibiteurs de la CETP ont été arrêtés par manque d'efficacité sur le risque d'événements cardiovasculaires et l'Anacetrapib (Merck) est le seul inhibiteur de la CETP en cours d'évaluation. La fin de l'essai clinique de phase III, REVEAL (Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification), qui évalue les effets de cet inhibiteur est prévue pour janvier 2017 ; elle déterminera si l'anacetrapib réduit le risque d'événements coronariens majeurs.

A ce jour, les résultats des essais cliniques achevés visant à augmenter le HDL-C à travers des interventions pharmacologiques telles que la niacine (Rader, 2016) ou les inhibiteurs de la CETP (T.

Gautier, Masson, & Lagrost, 2016) (Rader, 2016) ont soulevé plusieurs doutes sur le fait qu'une augmentation du HDL-C soit athéroprotectrice. Ces résultats ainsi que ceux des études génétiques ayant évalué le lien entre les mutations influençant les taux de HDL-C et le risque cardiovasculaire, nous poussent à nous interroger sur la pertinence du HDL-C comme biomarqueur corrélé au risque cardiovasculaire et les bénéfices d'augmenter le HDL-C dans l'athéroprotection.

Les différentes **sous-populations de HDL** mesurées par RMN ou encore le nombre de particules HDL (HDL-P) ont été proposés comme biomarqueurs négativement associés au risque cardiovasculaire. L'évidence d'une association entre la protection contre la maladie coronarienne et les taux circulants d'une sous-population spécifique de HDL chez l'homme, est cependant sujette à controverses, les informations fournies à ce sujet par les analyses RMN dans des études épidémiologiques étant contrastées. Dans l'essai PLAC-I (Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries statin Intervention), les concentrations des particules de HDL larges et de petites HDL ont été inversement associées à la progression de maladie coronarienne avec suivi angiographique indépendamment du HDL-C et d'autres lipides (Rosenson et al., 2002). Dans l'étude WHS (Women's Health Study) et dans l'étude EPIC (European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition) Norfolk, seuls les niveaux des particules HDL larges ont été négativement associés avec le risque coronarien (El Harchaoui et al., 2009) (Mora et al., 2009). Dans l'essai VA-HIT (Veterans Affairs High Density Lipoprotein Intervention) les concentrations de particules HDL totales et petites ont été rapportées comme des prédicteurs indépendants d'évènements cardiovasculaires récurrents (Otvos et al., 2006)

Khera et *al.* ont montré que la **capacité d'efflux de cholestérol du plasma** représente un biomarqueur sanguin utile pour la détection et le suivi des pathologies cardiovasculaires (Khera et al., 2011). L'étude a été menée dans 2 cohortes différentes : une cohorte de 203 individus sains, qui a permis d'étudier l'association de l'efflux de cholestérol et l'athérosclérose préclinique évaluée par la mesure de l'épaisseur intima-média carotidienne ; et une cohorte cas-témoins composée de 442 patients souffrant d'une maladie cardiovasculaire (documentée par une angiographie) appariés à 351 sujets contrôles. La capacité d'efflux de cholestérol a été évaluée en mesurant l'efflux de cholestérol radiomarqué d'une lignée de macrophages, J774, vers du plasma préalablement déplété en lipoprotéines contenant l'apoB, après stimulation des macrophages à l'AMPc (qui stimule l'expression de ABCA1, ABCG1 et SR-BI et la diffusion aqueuse au niveau des macrophages). Les auteurs ont montré que la capacité des HDL à promouvoir l'efflux de cholestérol des macrophages était inversement corrélée à la fois à l'athérosclérose préclinique et aux maladies cardiovasculaires (Khera et al., 2011).

Comme nous l'avons vu précédemment, les études de Genoux et *al.* ont permis d'identifier l'inhibiteur de l'activité ATP hydrolase de l'ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, l'**IF1**, comme nouveau biomarqueur

associé au HDL-C et à l'apoA-I et négativement associé au risque cardiovasculaire, indépendamment des taux de HDL-C (Genoux et al., 2011) (Genoux et al., 2013) (Genoux et al., 2016). En outre, par rapport à d'autres biomarqueurs associés aux HDL qui se sont avérés être meilleurs que le HDL-C tels que le nombre de particules (HDL-P) et les sous-populations de HDL mesurées par RMN (Qi et al., 2015) (Gebhard, Rhainds, & Tardif, 2015) ou encore la capacité d'efflux de cholestérol mesurée *in vitro* (Saleheen et al., 2015), la mesure d'IF1 par un immuno-dosage serait vraisemblablement plus facile à réaliser en termes d'accessibilité, de coût et de durée. La reproductibilité analytique semble aussi plus facile à assurer. Dans le futur, la mesure d'IF1 circulant pourrait servir de nouveau biomarqueur associé aux HDL pour mieux identifier et stratifier le risque cardiovasculaire afin de mieux adapter la thérapie des patients.

En ce qui concerne la pertinence des thérapie-HDL, les HDL possédant de multiples propriétés athéroprotectrices (i.e. transport retour du cholestérol, activités antioxydantes, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, antiapoptotiques et antithrombotiques) il semble que, à l'avenir, les stratégies visant à améliorer la fonctionnalité des HDL soient plus pertinentes que celles visant seulement à augmenter les taux de HDL-C.



## **CHAPITRE IV :**

# **RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**

## 1. Introduction générale.

Etant donné les résultats décevants des thérapies qui augmentent le taux de HDL-C telles que la niacine ou les inhibiteurs de CETP, sur la réduction du risque cardiovasculaire, il apparaît aujourd'hui que les futures thérapies-HDL devraient viser à améliorer la fonctionnalité des HDL. Ainsi, s'intéresser à la compréhension des mécanismes du RCT, cause majeure des effets athéroprotecteurs des HDL, a un intérêt clinique dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose. Deux voies indépendantes ont été impliquées dans la captation hépatique du HDL-C : la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> et la voie SR-BI. Le récepteur P2Y<sub>13</sub> est un acteur essentiel de la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> d'endocytose des holoparticules HDL (protéines + lipides) par le foie (Martinez et al., 2003) (Jacquet et al., 2005). L'analyse du phénotype métabolique des souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> (P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>) a permis de mettre en évidence le rôle du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le métabolisme des HDL. Sous régime normolipidique (Chow Diet, CD), ces souris présentent une diminution de l'endocytose hépatique des HDL marquées à l'iode 125 sur leur composante protéique (<sup>125</sup>I-HDL) et une diminution des sécrétions biliaires de cholestérol et phospholipides. Ces altérations hépato-biliaires s'accompagnent d'une diminution du transport retour du cholestérol (RCT) des macrophages chargés en cholestérol radiomarqué vers les fèces (Fabre et al., 2010). Le régime riche en cholestérol (HCD) accentue ce phénotype (Lichtenstein et al., 2013).

Ces travaux montrent le rôle clé du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le RCT hépato-biliaire. L'implication du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans l'athérosclérose n'a pu être mise en évidence chez des souris de fond génétique C57BL/6 en condition de dyslipidémie induite par un régime hypercholestérolémique (Lichtenstein et al., 2013). Ceci pourrait être dû au fait que les souris C57BL/6 ne développent que très peu de lésions, y compris sous régime hypercholestérolémique. Dans un premier temps (**Article 1**) nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact de l'inactivation du récepteur P2Y<sub>13</sub> sur le métabolisme du cholestérol et le développement de l'athérosclérose sur une lignée murine de fond génétique susceptible à l'athérosclérose, les souris invalidées pour l'apoE (apoE<sup>-/-</sup>). Les souris apoE<sup>-/-</sup> présentent une hypercholestérolémie caractérisée par une augmentation du LDL-C et VLDL-C et développent sous régime normolipidique des lésions d'athérosclérose dès l'âge de 10 semaines. Le phénotype des souris apoE<sup>-/-</sup> invalidées pour P2Y<sub>13</sub> (P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>) a donc été analysé à l'âge de 15 semaines sous régime normolipidique, en le comparant à celui des souris apoE<sup>-/-</sup>.

Concernant la voie SR-BI, responsable de la captation sélective du cholestérol estérifié par le foie, les souris invalidées pour SR-BI au niveau du foie (SR-BI-KO<sup>foie</sup>) présentent une hypercholestérolémie principalement attribuée à une augmentation du HDL-C et du LDL-C et développent des plaques d'athérosclérose sous régime hypercholestérolémique. L'objectif principal

de ma thèse (**Article 2**) a été d'étudier la contribution respective des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose. Pour cela nous avons croisé des souris P2Y<sub>13</sub>-KO avec des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> pour obtenir des souris doublement invalidées (P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO) et j'ai étudié le phénotype métabolique des souris dKO sous régime normolipidique et hypercholestérolémique, ainsi que le développement d'athérosclérose sous régime hypercholestérolémique. La double invalidation des deux récepteurs SR-BI et P2Y<sub>13</sub> pourrait avoir un effet cumulatif avec pour conséquence un phénotype exacerbé par rapport à la simple invalidation de chacun des récepteurs. Alternativement, des phénomènes compensatoires pourraient se mettre en place chez ces animaux.



## **2. Rôle du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose dans le modèle murin pro-athérogène, apoE<sup>-/-</sup>.**

### **2.1. Article 1.**

(cf. (Lichtenstein et al., 2015) pour article complet) :

Lichtenstein L, Serhan N, Espinosa-Delgado S, Fabre A, Annema W, Tietge UJ, Robaye B, Boeynaems JM, Laffargue M, Perret B, Martinez LO. Increased atherosclerosis in P2Y<sub>13</sub>/apolipoprotein E double-knockout mice : contribution of P2Y<sub>13</sub> to reverse cholesterol transport. *Cardiovasc Res.* 2015 May 1;106(2):314-23.

### **2.2. Matériel et méthodes.**

#### **2.2.1. Animaux et régimes.**

Toutes les souris utilisées dans cette étude sont des mâles sous fond génétique C57BL/6. Les souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> ont été obtenues par croisement des souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup> avec des souris apoE<sup>-/-</sup> (Laboratoire Jackson, Bar Harbor, ME, USA). Les souris contrôles apoE<sup>-/-</sup> proviennent du même élevage que les souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>. Les souris ont été maintenues dans un environnement contrôlé, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture (régime normolipidique ou chow diet, CD, # R04-10, SAFE, Augy, France) pendant 15 semaines. A l'âge de 15 semaines, les souris ont été sacrifiées après 3h de jeûne. Le sang et les différents organes ont été prélevés pour analyse. Durant l'expérimentation animale, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (2%) et ont été sacrifiées par dislocation cervicale.

#### **2.2.2. Analyse des lésions d'athérosclérose au niveau du sinus aortique.**

L'évaluation du développement des lésions d'athérosclérose a été faite en mesurant les dépôts lipidiques au niveau du sinus aortique. Les cœurs ont été prélevés et placés dans du PBS à 4°C pendant 24h. Ensuite la partie supérieure a été incluse dans un gel « O.C.T » de protection des tissus (Tissue-Tek), congelée dans un moule de cryostat puis conservée à -80°C. Pour chaque cœur, environ 50 coupes de 10 µm d'épaisseur (5 coupes par lame séparées de 200µm et 10 lames par cœur) ont été préparées au cryostat et récupérées l'une derrière l'autre sur lames, en partant de la partie supérieure du ventricule gauche, où les valves aortiques commencent à être visibles, jusqu'à une position de l'aorte où les lames valvulaires commencent à disparaître du champ. Après séchage des lames pendant 2h, les coupes ont été congelées à -80°C. Pour chaque cœur, la lame 0 et la lame 5 ont été colorées à l'huile rouge (Oil Red O, ORO) et les noyaux à l'hématoxyline. Les images ont été

prises en utilisant un microscope Leica DM400 B puis analysées à l'aide du logiciel Image J. L'étendue des lésions d'athérosclérose a été mesurée à partir de la quantification des aires colorées à l'huile rouge et exprimée en moyenne de l'aire de la lésion (en  $\mu\text{m}^2$ ) du groupe de lames analysées.

### **2.2.3. Transplantation de moelle osseuse.**

Pour induire l'aplasie de la moelle osseuse (MO), des souris apoE<sup>-/-</sup> et des souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> âgées de 7 semaines ont été exposées 1 jour avant la transplantation à une dose d'irradiation  $\gamma$  de 9 Gy (2,8 Gy/min, BIOBEAM, Gamma-Service Medical GmbH). Les cellules de la MO des donneurs, P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup> et P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> ont été isolées en effectuant un rinçage avec du PBS stérile de la partie intérieure de leurs fémurs et tibias. Des suspensions cellulaires ont été préparées en passant les cellules par un tamis cellulaire de nylon de porosité 30  $\mu\text{m}$ . Après comptage cellulaire, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS stérile. Les souris receveuses irradiées ont reçu 10<sup>7</sup> cellules de MO *via* une injection intraveineuse dans la veine orbitale, et 4 groupes ont été constitués : *i*) les souris receveuses apoE<sup>-/-</sup> transplantées avec la MO des souris apoE<sup>-/-</sup> (KO > KO), *ii*) les souris receveuses apoE<sup>-/-</sup> transplantées avec la MO des souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> (dKO > KO), *iii*) les souris receveuses P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> transplantées avec la MO des souris P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> (dKO > dKO), et *iv*) les souris receveuses P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> transplantées avec la MO des souris apoE<sup>-/-</sup> (KO > dKO). Après la transplantation, les souris ont reçu du régime normolipidique (CD, chow diet), pendant 8 semaines et de l'eau contenant des antibiotiques (250  $\mu\text{L}$  de Baytril 10%, Bayer, dilués dans 250 mL d'eau avec un renouvellement de l'eau 3 fois/semaine). Les souris ont ensuite été euthanasiées et les cœurs collectés et traités comme décrit dans la section 2.2.2, pour l'analyse de la taille des lésions d'athérosclérose. Le succès de la transplantation de MO a été confirmé par PCR.

### **2.2.4. Analyse des lipides et lipoprotéines plasmatiques.**

Les souris ont été mises à jeun pendant 3h puis le sang (750  $\mu\text{L}$ ) a été collecté sur tube EDTA et centrifugé à 4 500 rpm pendant 10 min à 4°C afin de récupérer le plasma. Pour chaque souris, le cholestérol et les triglycérides plasmatiques ont été dosés par les méthodes enzymatiques CHOD-PAD et GPO-PAP, respectivement (Biolabo SA, Maizy, France). Le contenu en cholestérol dans chaque classe de lipoprotéines a été mesuré consécutivement à une séparation des lipoprotéines plasmatiques par chromatographie de type FPLC (*Fast Protein Liquid chromatography*) sur un système Ultimate 3000 (Dionex, USA). Brièvement, 10  $\mu\text{L}$  de plasma ont été injectés sur colonne Superose® 6 10/300 GL (GE HealthCare, Suède) avec comme phase mobile une solution de PBS pH 7,4 et un débit de 0,5 mL / min puis le cholestérol total a été dosé dans chacune des fractions de 0,3 mL collectées en sortie de colonne.

### **2.2.5. Analyse de l'expression génique hépatique par rt-qPCR.**

L'isolation d'ARN à partir du foie, la reverse transcription et la PCR quantitative en temps réel ont été réalisées par les méthodes standards (Serhan et al., 2013). Le niveau d'expression d'ARNm des gènes cibles étudiés chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  a été calculé relativement au niveau d'expression du gène de ménage RPS29 et a ensuite été normalisé par rapport à leurs niveaux d'expression relatifs chez les souris  $apoE^{-/-}$  (8 souris par groupe).

### **2.2.6. Western blot.**

Pour chaque souris, le foie a été homogénéisé en utilisant le kit de lyse pour Precellys (Bertin technologies) dans du tampon TNE [Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM) et EDTA (0,1 mM) 1% NP40] contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase (leupeptine, aprotinine et pepstatine A). La concentration protéique a été mesurée en utilisant la méthode de Bradford (Biorad). Des homogénats de foie (100 µg) ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) et en conditions réductrices ; les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF (Millipore) puis analysées par immunomarquage selon les protocoles standards. Nous avons utilisé un anticorps de lapin dirigé contre la protéine SR-BI de souris (clone EP1556Y, ab52629) provenant de Abcam et un anticorps de souris dirigé contre l'actine-β (clone AC-15, ab6276) provenant de Sigma. Après 3 lavages, les membranes ont été incubées une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-igG de lapin couplés à la HRP (*Horseradish peroxidase*) (Promega, W4018), ou anti-igG de souris couplés à la HRP (Promega, W4028), selon l'espèce où l'anticorps primaire a été produit. La révélation a été effectuée avec le réactif chimio-luminescent ECL (sigma, 170-5060). Le signal de western blot a été détecté à l'aide du chemidoc MP (Bio-RAD©) et la quantification a été réalisée avec le logiciel image J.

### **2.2.7. Analyses statistiques.**

Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± SEM. Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney pour des échantillons indépendants. Les valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme significatives. Les analyses ont été réalisées par le logiciel Graphpad Prism Software version 6.

## 2.3. Résultats.

### 2.3.1. Augmentation du développement de l'athérosclérose chez les souris $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$ par rapport aux souris $apoE^{-/-}$ .

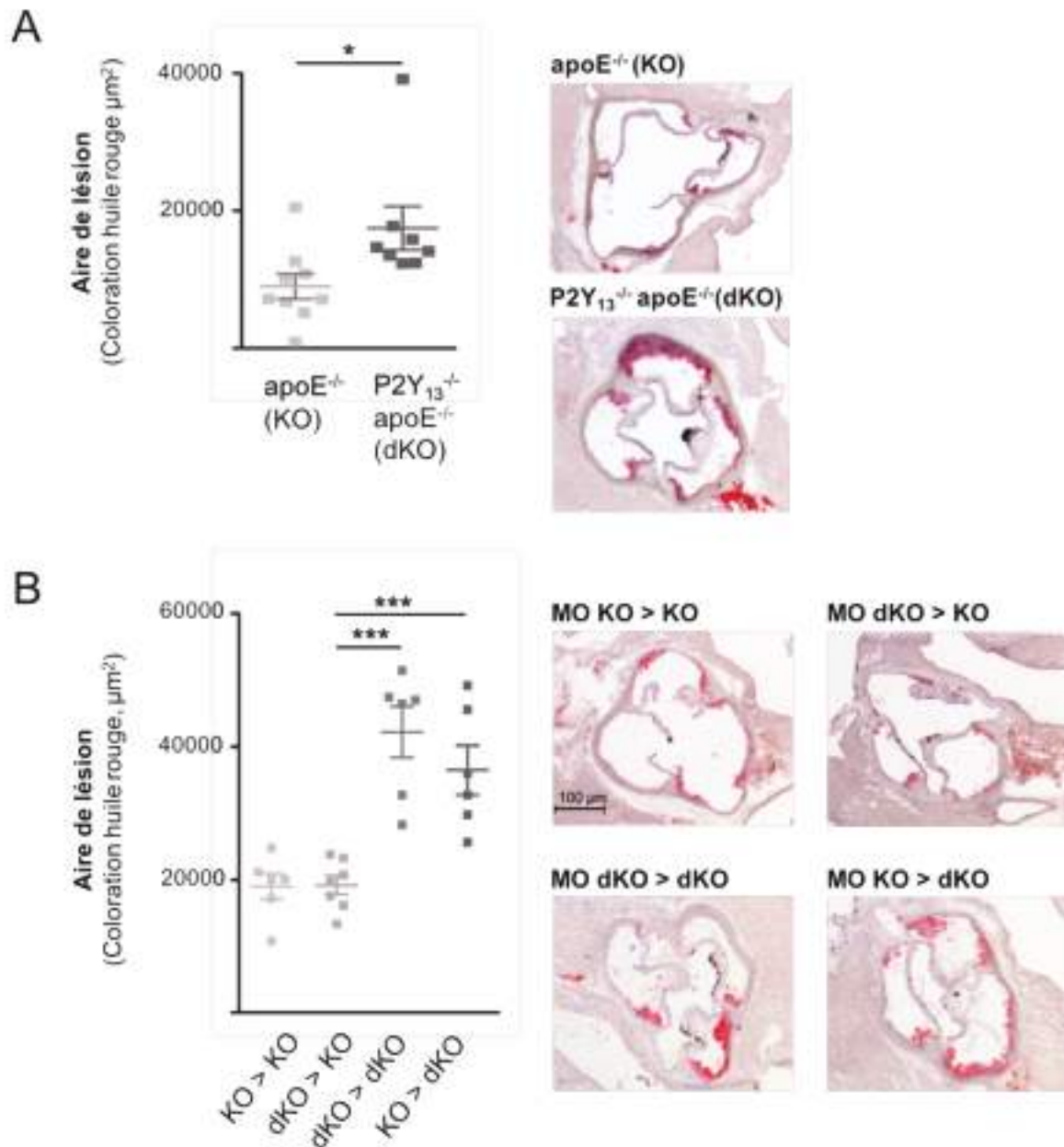
Nous avons évalué l'effet de l'inactivation de  $P2Y_{13}$  sur le développement de l'athérosclérose chez les souris  $apoE^{-/-}$ , à l'âge de 15 semaines.

Par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$ , les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  montrent une augmentation significative des lésions d'athérosclérose, évaluées par la quantification des dépôts lipidiques au niveau de la crosse aortique (Figure 1A). Ceci indique que l'absence du récepteur  $P2Y_{13}$  induit une augmentation des lésions lors de l'initiation du développement de l'athérosclérose.

Pour évaluer la contribution du récepteur  $P2Y_{13}$  exprimé dans les cellules sanguines, nous avons effectué des transplantations de moelle osseuse (MO). Pour cela, après irradiation à une dose sublétalement induisant une aplasie de la MO, les souris  $apoE^{-/-}$  (KO) et  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  (dKO) ont été transplantées avec de la MO provenant de l'un ou l'autre de ces génotypes, et 4 groupes de souris ont été constitués :

- i) les souris receveuses  $apoE^{-/-}$  transplantées avec la MO des souris  $apoE^{-/-}$  (KO > KO),
- ii) les souris receveuses  $apoE^{-/-}$  transplantées avec la MO des souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  (dKO > KO),
- iii) les souris receveuses  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  transplantées avec la MO des souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  (dKO > dKO), et
- iv) les souris receveuses  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  transplantées avec la MO des souris  $apoE^{-/-}$  (KO > dKO).

Le développement des lésions d'athérosclérose a ensuite été évalué pour chaque groupe de souris à l'âge de 15 semaines. Nous avons observé que les souris receveuses  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  (souris dKO > dKO et KO > dKO), présentaient des lésions d'athérosclérose plus développées que les souris receveuses  $apoE^{-/-}$  (souris KO > KO et dKO > KO) (Figure 1B). Ces données indiquent que l'absence du récepteur  $P2Y_{13}$  dans les cellules du système hématopoïétique n'est pas responsable du développement plus important de l'athérosclérose observé chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$ .

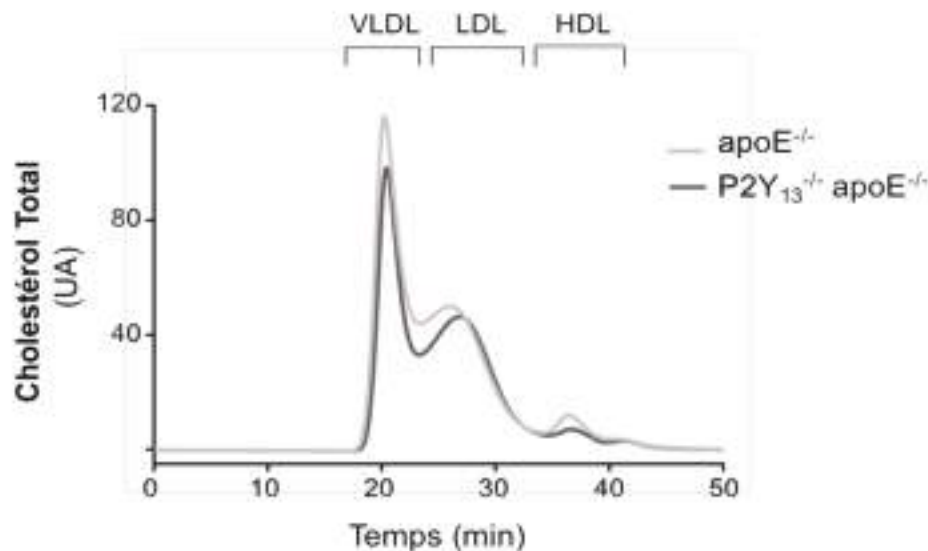


**Figure 1. Mesure du développement de l'athérosclérose chez les souris apoE<sup>-/-</sup> (KO) et P2Y<sub>13</sub><sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> (dKO) et évaluation du rôle du récepteur P2Y<sub>13</sub> exprimé dans les cellules hématopoïétiques.**

**A.** Quantification par marquage à l'huile rouge des lésions aortiques d'athérosclérose chez les souris KO (n =9) et dKO (n =8) à 15 semaines d'âge. **B.** Des souris KO et dKO ont été irradiées et transplantées avec de la moelle osseuse comme décrit dans la partie Matériel et méthodes, pour obtenir 4 groupes de souris (KO > KO, n=6 ; dKO > KO, n = 7 ; dKO > dKO, n=6 ; KO > dKO, n=6). Les lésions aortiques d'athérosclérose ont ensuite été quantifiées après 8 semaines de régime normolipidique. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. \* indique  $p < 0,05$ , \*\*\* indique  $p < 0,001$  entre les groupes indiqués. Les images (grossissement x50) sont représentatives des coupes du sinus aortique après marquage des lipides à l'huile rouge.

### 2.3.2. Diminution du HDL-C chez les souris $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$ par rapport aux souris $apoE^{-/-}$ .

Les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  présentent une diminution de la concentration plasmatique en cholestérol total (-15%) et triglycérides (-25%) par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$ . L'analyse de la distribution du cholestérol dans les différentes classes de lipoprotéines montre une diminution des taux de HDL-C chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$ , avec également une légère diminution du LDL-C (Figure 2).

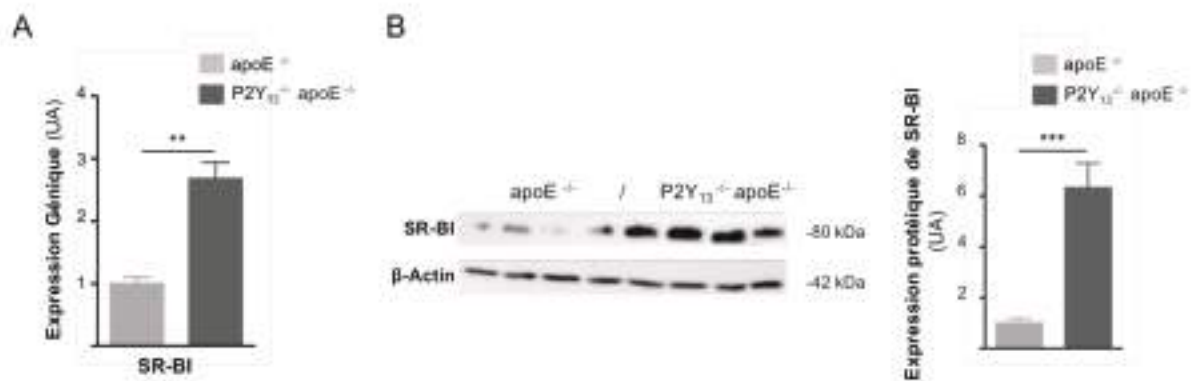


**Figure 2. Profil FPLC d'échantillons plasmatiques représentatifs.** Les lipoprotéines issues d'échantillons plasmatiques ont été séparées par la technique de chromatographie d'exclusion FPLC. Chaque ligne représente la valeur moyenne de 3 souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  (ligne gris foncé) et 3 souris  $apoE^{-/-}$  (ligne gris clair).

### 2.3.3. Augmentation de l'expression génique et protéique de SR-BI au niveau du foie chez les souris $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$ par rapport aux souris $apoE^{-/-}$ .

Le déficit en  $P2Y_{13}$  étant responsable d'une altération des lipides plasmatiques, hépatiques et biliaires, nous avons analysé l'expression génique des autres récepteurs et transporteurs impliqués dans la captation des HDL (SR-BI) et la biogénèse des HDL (ABCA1 et ABCG1) au niveau du foie. Cette analyse a révélé une augmentation significative de l'ARNm de SR-BI au niveau du foie chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$  (augmentation de  $2,67 \pm 0,29$  fois,  $p < 0,01$ ) (Figure 3A). Cette augmentation de l'expression génique de SR-BI se traduit par une augmentation de l'expression protéique de SR-BI au niveau du foie chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$  (augmentation de  $4,14 \pm 1,19$  fois,  $p < 0,05$ ) (Figure 3B). Ceci suggère que les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  modulent leur expression de SR-BI pour compenser le déficit du récepteur  $P2Y_{13}$  et l'absence de l'endocytose des holoparticules HDL associée.





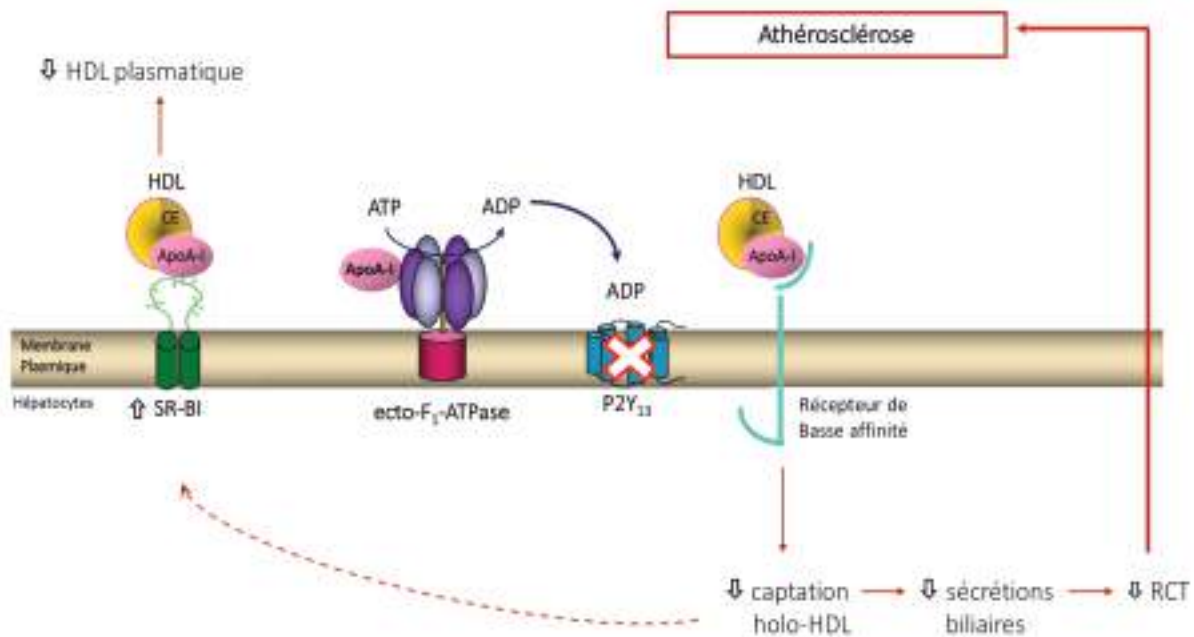
**Figure 3. Expression génique et protéique de SR-BI au niveau du foie.**

**A.** Expression génique de SR-BI au niveau du foie. L'analyse de l'expression génique de SR-BI a été faite par rt-qPCR. Le niveau d'expression d'ARNm de SR-BI chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  a été calculé relativement au niveau d'expression du gène de ménage RPS29 et a ensuite été normalisé par rapport à son niveau d'expression relatif chez les souris  $apoE^{-/-}$ . **B.** Expression protéique de SR-BI au niveau du foie. Les niveaux d'expression des protéines ont été analysés par immunomarquage en utilisant des anticorps dirigés contre SR-BI et actine- $\beta$ . Chaque ligne représente un échantillon issu d'une seule souris. L'expression protéique de SR-BI a été normalisée par rapport au niveau d'expression de l'actine- $\beta$ . Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. \*\* indique  $p < 0,01$ , \*\*\* indique  $p < 0,001$  par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$ .

## 2.4. Discussion.

Ce travail a mis en évidence un rôle protecteur du récepteur  $P2Y_{13}$  dans le développement de l'athérosclérose. A l'âge de 15 semaines, sous régime normolipidique, les souris doublement invalidées pour  $P2Y_{13}$  et apoE ( $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$ ) ont des sécrétions de lipides biliaires diminuées et présentent une diminution de l'excrétion du cholestérol et des acides biliaires dans les fèces par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$ . Les souris invalidées pour le récepteur  $P2Y_{13}$  sous fond C57BL/6,  $P2Y_{13}^{-/-}$ , présentaient des taux plasmatiques de HDL-C inchangés par rapport aux souris WT. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cela : *i)* la contribution du récepteur  $P2Y_{13}$  dans le métabolisme hépato-bilaire du cholestérol n'a que peu d'impact sur le taux circulant de HDL-C ; *ii)* Il existe chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}$  une diminution de la biogénèse hépatique des HDL qui compenserait la diminution de leur endocytose. Cette dernière hypothèse était soutenue par la diminution chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}$  de l'expression hépatique des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Fabre et al., 2010), connus pour être impliqués dans la biogénèse hépatique des HDL. De manière inattendue les taux plasmatiques de HDL-C et LDL-C sont diminués chez les souris  $P2Y_{13}^{-/-}/apoE^{-/-}$  par rapport aux souris  $apoE^{-/-}$ , alors que le rôle du récepteur  $P2Y_{13}$  dans l'endocytose hépatique des HDL permettrait plutôt de s'attendre à une augmentation du taux de HDL-C plutôt qu'une diminution. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'expression hépatique de SR-BI (ARNm et protéine) observée chez les souris

$P2Y_{13}^{-}/apoE^{-}$  et qui serait responsable de la diminution des taux de HDL-C et LDL-C associée à une augmentation du contenu hépatique en cholestérol estérifié. Cependant, alors que SR-BI hépatique est décrit comme ayant une action athéroprotectrice (Huby et al., 2006), l'augmentation de la taille des lésions d'athérome d'environ 30% chez les souris  $P2Y_{13}^{-}/apoE^{-}$  par rapport aux souris  $apoE^{-}$  suggère que l'augmentation de l'activité hépatique de SR-BI ne suffit pas à compenser l'effet délétère de l'invalidation du récepteur  $P2Y_{13}$  sur les sécrétions de lipides biliaires et le RCT.



**Figure 16 :** Effets de l'inactivation du récepteur  $P2Y_{13}$  dans le modèle d'athérosclérose  $apoE^{-}$  ( $P2Y_{13}^{-}/apoE^{-}$ ). L'inactivation du récepteur  $P2Y_{13}$  induit une diminution de l'endocytose de l'holoparticule HDL (composante protéique et lipidique) associée à une diminution des sécrétions de lipides biliaires et du RCT des macrophages vers les fèces, se traduisant par une augmentation des lésions d'athérosclérose chez les souris  $P2Y_{13}^{-}/apoE^{-}$  par rapport aux souris  $apoE^{-}$ . Une augmentation de l'expression hépatique de SR-BI chez les souris  $P2Y_{13}^{-}/apoE^{-}$  suggère l'existence d'un possible mécanisme de compensation qui pourrait expliquer la baisse du HDL-C plasmatique observée chez ces souris mais ne suffirait pas à contrebalancer l'effet délétère de l'inactivation du récepteur  $P2Y_{13}$  sur la diminution des sécrétions de lipides biliaires et du RCT qui se traduisent par un développement accéléré de l'athérosclérose.



### 3. ARTICLE 2 : CONTRIBUTION DES RECEPTEURS SR-BI HEPATIQUE ET P2Y<sub>13</sub> DANS LE METABOLISME HEPATO-BILAIRE DU CHOLESTEROL ET LE DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE.

#### RESUME.

**Objectif.** La protection des Lipoprotéines de Haute Densité (HDL) contre l'athérosclérose est principalement attribuée à leur rôle dans le Transport Retour du Cholestérol (RCT) hépato-biliaire. Le RCT est un processus par lequel le cholestérol excédentaire des tissus périphériques est transporté par les particules HDL vers le foie où il sera préférentiellement métabolisé et sécrété dans la bile. La captation des HDL par le foie implique deux mécanismes indépendants : l'endocytose des particules HDL entières (protéines + lipides) *via* une voie qui dépend du récepteur P2Y<sub>13</sub> et la captation sélective du cholestérol estérifié des HDL *via* le scavenger receptor BI (SR-BI). Dans cette étude, j'ai caractérisé phénotypiquement des souris invalidées pour ces deux récepteurs essentiels au métabolisme du HDL.

**Matériel et méthodes.** Des souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> (P2Y<sub>13</sub>-KO) ont été croisées avec des souris invalidées pour SR-BI hépatique (SR-BI-KO<sup>foie</sup>). Le phénotype des souris doublement invalidées P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO a été analysé au regard du métabolisme du HDL-Cholestérol (HDL-C) et du développement de l'athérosclérose.

**Résultats.** Sous régime normolipidique, les souris dKO et SR-BI-KO<sup>foie</sup> présentent une hypercholestérolémie par rapport aux souris sauvages et P2Y<sub>13</sub>-KO, avec une forte augmentation du HDL-C et LDL-C et des particules HDL anormalement larges. Les sécrétions biliaires et l'excrétion fécale en cholestérol sont altérées chez les souris dKO, mais pas chez les SR-BI-KO<sup>foie</sup>. De façon surprenante, les souris P2Y<sub>13</sub>-KO montrent une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol comparable à celle observée chez les souris dKO, mais présentent une augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol, suggérant que l'inactivation du récepteur P2Y<sub>13</sub> pourrait stimuler l'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE) *via* un mécanisme dépendant de SR-BI. Finalement, sous régime hypercholestérolémique, les souris dKO présentent un phénotype métabolique similaire à celui observé sous régime normolipidique, avec des taux de lipides plasmatiques identiques et une excrétion biliaire et fécale en cholestérol diminuée par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, se traduisant par un développement plus important de l'athérosclérose. Ainsi, l'augmentation du développement de l'athérosclérose observée chez les souris dKO serait principalement attribuable à une altération de l'élimination hépato-biliaire du cholestérol.

**Conclusion.** Ces résultats soutiennent le concept selon lequel le flux dynamique du cholestérol transporté par les HDL des tissus périphériques au foie pour être sécrété dans la bile joue un rôle

plus important dans l'athéroprotection que la concentration statique en HDL-C. Le récepteur P2Y<sub>13</sub> protège contre l'athérosclérose, et pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le RCT hépato-biliaire.

### 3.1. Introduction.

L'action protectrice des Lipoprotéines de Haute Densité (HDL) contre le développement de l'athérosclérose est principalement attribuée à leur rôle dans le Transport Retour du Cholestérol (RCT). Le RCT est un processus par lequel le cholestérol est transporté par les HDL des tissus périphériques vers le foie où il sera préférentiellement sécrété dans la bile soit sous forme de cholestérol libre ou après transformation en acides biliaires. La captation hépatique des HDL, qui constitue l'une des dernières étapes du RCT, implique deux voies distinctes : la captation sélective de leur contenu en cholestérol estérifié *via* le scavenger receptor BI (SR-BI) et l'endocytose de l'holo-particule HDL (protéines + lipides) *via* la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub>. A ce jour, chacune des deux voies a été étudiée sur différents modèles pré-cliniques.

Concernant la captation hépatique du HDL-CE médiée par SR-BI, T. Huby et *al.* ont développé une lignée de souris invalidées pour SR-BI au niveau du foie en utilisant un système de recombinaison CreLox (SR-BI<sup>flox/flox</sup>/Alb-Cre, appelée ultérieurement SR-BI-KO<sup>foie</sup>). Brièvement, cette lignée a été obtenue par croisement d'une lignée de souris dans laquelle des sites lox ont été insérés autour de l'exon 1 du gène SCARB1 (SR-BI<sup>flox/flox</sup>) avec des souris transgéniques Alb-Cre. De façon inattendue, les auteurs ont observé que la lignée SR-BI<sup>flox/flox</sup> est hypomorphe puisqu'elle présente, par rapport à SR-BI<sup>+/+</sup>, une diminution de l'expression de SR-BI dans d'autres organes que le foie. Les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> ont une hypercholestérolémie principalement attribuée à une augmentation du HDL-C et du LDL-C et développent des plaques d'athérosclérose sous régime hypercholestérolémique (Huby et al., 2006) (El Bouhassani et al., 2011).

En parallèle, différentes études menées chez la souris ont évalué le rôle physiologique de la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> d'endocytose des HDL, soit en activant le récepteur P2Y<sub>13</sub> ou, inversement, en l'invalidant. Notamment, l'administration d'un agoniste spécifique du récepteur P2Y<sub>13</sub> à des souris sauvages (C57BL/6) augmente les concentrations biliaires en cholestérol et acides biliaires et son administration chronique à un modèle murin d'athérosclérose, les souris apoE-KO, réduit significativement le développement des lésions d'athérosclérose (Goffinet et al., 2014). Inversement, les souris invalidées pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> (P2Y<sub>13</sub>-KO, fond C57BL/6) présentent une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides, accompagnée d'une diminution du RCT des macrophages vers les fèces (Fabre et al., 2010). Un régime hypercholestérolémique (1,25% cholestérol, 6% gras) accentue ce phénotype métabolique (Lichtenstein et al., 2013). L'invalidation

du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans la lignée apoE-KO (P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO) se traduit également par une diminution des sécrétions de lipides biliaires et du RCT des macrophages vers les fèces et ce phénotype métabolique est associé à un développement précoce de l'athérosclérose par rapport aux souris apoE-KO (cf. Article 1 : (Lichtenstein et al., 2015)). De façon intéressante, l'expression hépatique de SR-BI (ARNm et protéine) se trouve significativement augmentée chez les souris P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO, suggérant que l'inactivation du récepteur P2Y<sub>13</sub> pourrait être compensée par l'activité hépatique du récepteur SR-BI. Notamment, cette compensation par SR-BI pourrait expliquer la baisse inattendue de la concentration plasmatique en HDL-C observée chez les souris P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO mais resterait cependant insuffisante pour compenser l'effet délétère de l'inactivation du récepteur P2Y<sub>13</sub> sur les sécrétions de lipides biliaires, le RCT et le développement d'athérosclérose (cf. Article 1 : (Lichtenstein et al., 2015)).

L'hypothèse qu'il pourrait y avoir, sous certaines conditions, un mécanisme de compensation entre les récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI a constitué un élément important dans la conception de cette étude ayant pour objectif principal d'étudier la contribution respective de chacun de ces 2 récepteurs dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose. Pour cela, les souris P2Y<sub>13</sub>-KO ont été croisées avec des souris invalidées pour le récepteur SR-BI au niveau hépatique (SR-BI-KO<sup>foie</sup>) afin d'obtenir des souris doublement invalidées, P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO (dKO).

Dans cette étude, le phénotype des souris dKO, nourries avec un régime normolipidique, a été comparé à celui des souris sauvages (WT) et simplement invalidées pour P2Y<sub>13</sub> et pour SR-BI hépatique, du point de vue des lipides plasmatiques et hépatiques et des sécrétions et excrétions de lipides biliaires et fécaux. Le développement de l'athérosclérose a ensuite été étudié sous régime hypercholestérolémique (1,25% cholestérol, 6% gras) chez les souris dKO et SR-BI-KO<sup>foie</sup> uniquement, étant donné que ce régime a été précédemment décrit pour induire le développement de l'athérosclérose chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> (Huby et al., 2006) (El Bouhassani et al., 2011) mais pas chez les souris WT et P2Y<sub>13</sub>-KO (Lichtenstein et al., 2013).

## **3.2. Matériel et méthodes.**

### **3.2.1. Animaux et régimes.**

Quatre modèles de souris, tous sous fond génétique C57BL/6, ont été utilisés dans cette étude : les souris sauvages (Wild Type, WT), les souris invalidées pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> (P2Y<sub>13</sub>-KO), les souris invalidées pour SR-BI hépatique (SR-BI<sup>flox/flox</sup>/Alb-Cre ou SR-BI-KO<sup>foie</sup>) et les souris doublement invalidées pour P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique (P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO). Les souris sauvages proviennent de l'élevage hétérozygote P2Y<sub>13</sub>-KO.

**Les souris P2Y<sub>13</sub>-KO** (Fabre et al., 2010) ont été générées par recombinaison homologue en remplaçant le premier exon non codant, le premier intron et 182 paires de base du deuxième exon par une cassette de résistance à la néomycine.

**Les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>** (Huby et al., 2006) ont été générées en utilisant le système Cre/lox. Brièvement, 2 sites loxP ont été insérés par recombinaison homologue autour de l'exon 1 du gène SCARB1, ce qui a permis d'obtenir une lignée de souris SR-BI<sup>flox/flox</sup>. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine spécifique du foie (souris Alb-Cre<sup>+</sup>). Les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> ont été élevées à l'état d'hémizygotie pour le transgène Alb-Cre (Alb-Cre<sup>+/-</sup>) et les accouplements ont été réalisés entre souris Alb-Cre<sup>+/-</sup> et souris Alb-Cre<sup>-/-</sup>. Le génotypage des souris a été fait par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en utilisant des amorces spécifiques au site LoxP et des amorces spécifiques à la Cre recombinase.

**Les souris doublement invalidées pour P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique (P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO)** ont été obtenues en croisant les souris P2Y<sub>13</sub>-KO avec les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>. Les souris sont viables et fertiles et cet élevage a été maintenu à l'état d'hémizygotie pour le transgène Alb-Cre (Alb-Cre<sup>+/-</sup>).

Les souris ont été maintenues dans un environnement contrôlé, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Tous les élevages ont été conservés dans la même pièce au sein de l'animalerie. Pour les analyses sous régime normolipidique (chow diet, CD, # R04-10, SAFE, Augy, France), les souris ont été sacrifiées à l'âge de 8 semaines. Pour les études sous régime hypercholestérolémique (HCD, Harlan TD 96335, 1,25% cholestérol, 6% gras), les souris ont été nourries avec ce régime à l'âge de 8 semaines pendant 20 semaines. Durant l'expérimentation animale, les souris ont été anesthésiées avec une injection intrapéritonéale d'hydrochloride de kétamine (100 mg/kg) et d'hydrochloride de xylazine (15 mg/kg) et ont été sacrifiées par dislocation cervicale.

### **3.2.2. Analyse des lipides et lipoprotéines plasmatiques.**

Les souris ont été mises à jeun pendant 3h puis le sang (750 µL) a été collecté sur tube EDTA et centrifugé à 4 500 rpm pendant 10 min à 4°C afin de récupérer le plasma. Pour chaque souris, le cholestérol et les triglycérides plasmatiques ont été dosés par les méthodes enzymatiques CHOD-PAD et GPO-PAP, respectivement (Biolabo SA, Maizy, France). Le contenu en cholestérol dans chaque classe de lipoprotéines a été mesuré consécutivement à une séparation des lipoprotéines plasmatiques par chromatographie de type FPLC (*Fast Protein Liquid chromatography*) sur un système Äkta (GE HealthCare, Suède). Brièvement, 50 µL de plasma provenant d'un pool de 3 souris du même groupe ont été injectés sur colonne Superose® 6 10/300 GL (GE HealthCare, Suède) avec comme phase mobile une solution de PBS pH 7,4 et un débit de 0,3 mL / min puis le cholestérol total a été dosé dans chacune des fractions de 0,3 mL collectées en sortie de colonne.

### 3.2.3. Analyse des lipides hépatiques.

Des échantillons de 1 mg foie ont été homogénéisés dans du méthanol 5mM/EGTA (2 :1 v/v) et les lipides ont été extraits selon la technique de *Blight & Dyer* dans du dichlorométhane/méthanol/eau (2.5:2.5:2.1, v/v/v) en présence de standards internes (4 µg de stigmastérol, 4 µg de cholestéryl heptadécanoate et 8 µg de glycéryltriheptadécanoate). Les lipides neutres ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse (FOCUS Thermo Electron). Un volume de 1 µl a été injecté dans une colonne capillaire en silice fondue Zebron-1 (5 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,50 mm d'épaisseur du film, Phenomenex), avec pour gaz vecteur de l'hydrogène à 0,5 bar, des températures de l'injecteur et du détecteur de 315°C et 345°C respectivement et une température du four programmée pour passer de 200°C à 350°C à raison de 5°C par min.

### 3.2.4. Canulation de la vésicule biliaire et collecte de la bile.

A l'âge de 8 semaines, les souris ont été mises à jeun pendant 3h puis ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'hydrochloride de kétamine (100 mg/kg) et d'hydrochloride de xylazine (15 mg/kg). Après ligature du canal cholédoque, la vésicule biliaire a été canulée avec un cathéter en polyéthylène-10 (0. 11'' x 0.24'' x 0.0065'') et la bile a été collectée 30 min après, pendant 30 min. Pendant toute la durée de la canulation, la température corporelle a été maintenue en utilisant un tapis chauffant. Le flux biliaire, exprimé en µL/min/100 g de poids corporel, a été déterminé gravimétriquement en estimant la densité biliaire à 1 g/mL.

### 3.2.5. Analyses des lipides biliaires.

*Pour l'analyse du cholestérol biliaire*, une réaction d'hydrolyse du cholestérol esterifié suivie d'une réaction d'oxydation du cholestérol est réalisée. Un échantillon de bile de 1 µL a été dilué avec 29 µL d'eau milliQ et a été incubé avec le réactif de travail (100 mM MOPS, pH 8, 0,25 mM HVA; 0,1 % Triton X-100) pendant 4 min. Le mélange a ensuite été incubé avec un réactif de départ (0,1 M MOPS, pH 8, 0,06 U/mL cholestérol oxydase, 0,15 U/mL cholestérol estérase, 0,45 U/mL Peroxydase, 0,06 mM Taurocholate) et la cinétique a été suivie pendant 45 min, avec une longueur d'onde d'excitation de 340/330 nm et d'émission de 440/420 nm (fluorescence du HVA formé).

*Pour l'analyse des acides biliaires*, une réaction de déhydrogénation des sels biliaires est réalisée. Un échantillon de bile de 1 µL a été dilué avec 99 µL d'eau milliQ et a été incubé avec le réactif de travail (6 mg NAD, 0,5 M tampon Hydrazine hydrate 0,05 M Na-pyrophosphate) pendant 4 min. Le mélange a été ensuite incubé avec le réactif de départ (0,03M Tris-EDTA; 0,3 U/mL 3α-OH stéroïde déshydrogénase) et la cinétique a été suivie pendant 30 min, avec une longueur d'onde d'excitation de 340/330 nm et d'émission de 440/420 nm (fluorescence du NADH formé).

*Pour l'analyse des phospholipides biliaires*, une hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) avec la phospholipase-D a été réalisée, en considérant que la concentration biliaire de PC reflète la concentration biliaire en phospholipides. Un échantillon de bile de 1  $\mu$ L a été dilué avec 49  $\mu$ L d'eau milliQ et a été incubé avec le réactif de travail (100 mM MOPS, pH 8; 0,55 mM HVA; 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 11 U/mL Phospholipase-D; 1,66 U/mL Peroxydase; 0,1% Triton X-100) pendant 4 min. Le mélange a ensuite été incubé avec le réactif de départ (1 M MOPS, pH 8; 50 U/mL Choline oxydase) et la cinétique a été suivie pendant 67,5 min, avec une longueur d'onde d'excitation de 340/330 et d'émission de 440/40 (fluorescence du HVA formé).

### **3.2.6. Analyses de l'excrétion fécale de cholestérol et d'acides biliaires.**

Les fèces ont été collectées pendant 48h, lyophilisées puis broyées. Le cholestérol fécal a été extrait des fèces et analysé en suivant le même protocole utilisé pour l'analyse des lipides hépatiques (paragraphe 3.2.3) et en utilisant comme échantillon de départ l'équivalent de 5 mg de fèces. Les acides biliaires fécaux ont été analysés après saponification de 30 mg de fèces dans 1 mL de NaOH 0,2 mol/L pendant 1h à 60°C. La réaction a été arrêtée en ajoutant 2 mL d'eau et le mélange a été centrifugé à 2 500 rpm pendant 30 min. Le surnageant en présence de standards internes a été soumis à une extraction en phase solide (SPE) et finalement élué avec du méthanol. La solution obtenue a été évaporée sous azote et reprise dans 20  $\mu$ L de méthanol puis 5  $\mu$ L ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) de haute résolution (Thermo Exactive) dans une colonne C18.

### **3.2.7- Analyse des lésions d'athérosclérose au niveau du sinus aortique.**

L'évaluation du développement des lésions d'athérosclérose a été faite sous régime hypercholestérolémique en mesurant les dépôts lipidiques au niveau du sinus aortique.

Brièvement, les cœurs ont été prélevés et placés dans du PBS à 4°C pendant 24h puis la partie supérieure a été incluse dans un gel « O.C.T » de protection des tissus (Tissue-Tek), congelée dans un moule de cryostat puis conservée à -80°C. Pour chaque cœur, environ 60 coupes de 10  $\mu$ m d'épaisseur, ont été préparées au cryostat et récupérées l'une derrière l'autre sur lames, en partant de la partie supérieure du ventricule gauche, où les valves aortiques commencent à être visibles, jusqu'à une position de l'aorte où les lames valvulaires commencent à disparaître du champ. Après séchage des lames pendant 2h, les coupes ont été congelées à -80°C. Chaque 5 coupes, les lipides ont été colorés à l'huile rouge (Oil Red O, ORO) et les noyaux à l'hématoxyline. Les images ont été prises en utilisant un microscope Leica DM400 B puis analysées à l'aide du logiciel Image J. L'étendue des lésions d'athérosclérose a été mesurée à partir de la quantification des aires colorées à l'huile rouge et exprimée en moyenne de l'aire de la lésion (en  $\mu\text{m}^2$ ) du groupe de lames analysées.

### 3.2.8. Transplantation de moelle osseuse.

Pour induire l'aplasie de la moelle osseuse (MO) des souris males SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO âgées de 7 semaines ont été exposées 1 jour avant la transplantation à une dose d'irradiation  $\gamma$  de 9 Gy (2,8 Gy/min, BIOBEAM, Gamma-Service Medical GmbH). Les cellules de la MO des donneurs P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO, ont été isolées en effectuant un rinçage avec du PBS stérile de la partie intérieure de leurs fémurs et tibias. Des suspensions cellulaires ont été préparées en passant les cellules par un tamis cellulaire de nylon de porosité 30  $\mu$ m. Après comptage cellulaire, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS stérile. Les souris receveuses irradiées ont reçu 10<sup>7</sup> cellules de MO *via* une injection intraveineuse dans la veine orbitale, et 2 groupes ont été constitués : *i*) les souris receveuses SR-BI-KO<sup>foie</sup> transplantées avec la MO des souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO (dKO > SR-BI-KO<sup>foie</sup>), *ii*) les souris receveuses P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO transplantées avec la MO de souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO (dKO > dKO). Après la transplantation, les souris ont reçu du régime normolipidique (CD, chow diet), pendant 4 semaines et de l'eau contenant des antibiotiques (250  $\mu$ L de Baytril 10%, Bayer, dilués dans 250 mL d'eau avec un renouvellement de l'eau 3 fois/semaine). A la suite de cette période, les souris ont été placées sous régime hypercholestérolémique (HCD, Harlan TD 96335, 1,25% cholestérol) pendant 20 semaines. Les souris ont ensuite été euthanasiées et les cœurs collectés et traités comme décrit dans la section 3.2.7, pour l'analyse de la taille des lésions d'athérosclérose. Le succès de la transplantation de MO a été confirmé par PCR.

### 3.2.9. Analyse de l'expression génique hépatique par rt-qPCR.

L'isolation d'ARN à partir du foie, la reverse transcription et la PCR quantitative en temps réel ont été réalisées par les méthodes standards (Serhan et al., 2013). Le niveau d'expression d'ARNm des gènes cibles étudiés chez les 3 lignées de souris transgéniques (P2Y<sub>13</sub>-KO, SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO) a été calculé relativement au niveau d'expression du gène de ménage RPS29 et a ensuite été normalisé par rapport à leurs niveaux d'expression relatifs chez les souris WT (8 souris par groupe).

### 3.2.10. Analyses statistiques.

Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney pour des échantillons indépendants. Les valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme significatives. Les analyses ont été réalisées par le logiciel Graphpad Prism Software version 6.

### 3.3. Résultats.

#### 3.3.1. Augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol, associée à une baisse du contenu hépatique en cholestérol, chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO par rapport aux souris sauvages.

Aucun défaut de développement et de fertilité n'a été observé chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO.

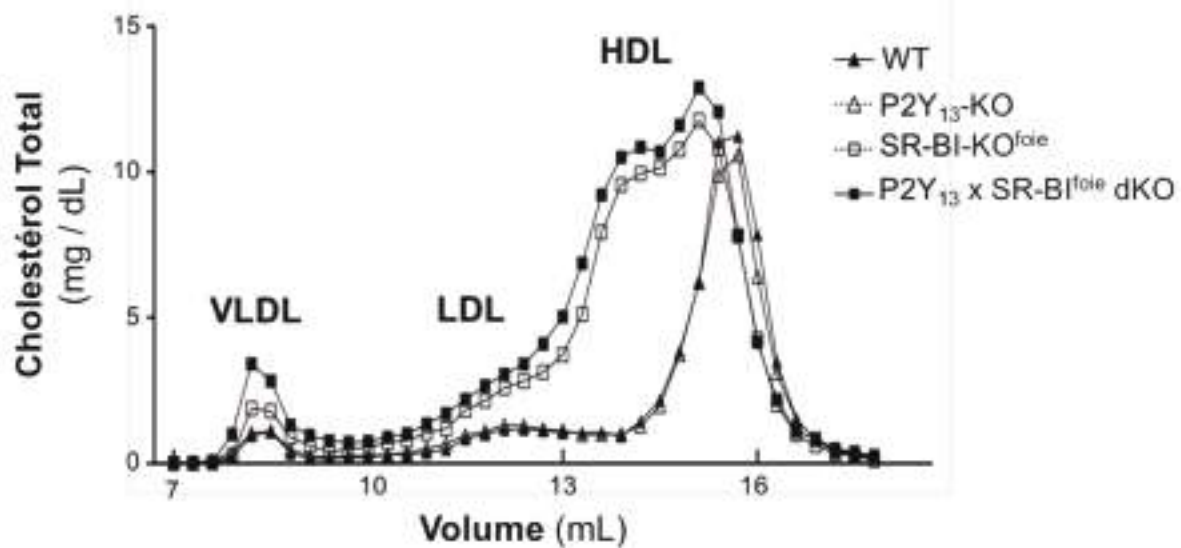
Comme observé précédemment (Huby et al., 2006) (Fabre et al., 2010), sous régime normolipidique (CD), les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> présentent une forte augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol total par rapport aux souris WT (199,3 ± 5,0 mg/dL vs. 95,3 ± 3,9 mg/dL) alors qu'aucune différence n'est observée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO (92,2 ± 2,8 mg/dL) (Tableau 1). Une augmentation similaire de la concentration en cholestérol plasmatique est observée chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO (195,8 ± 9,8 mg/dL) (Tableau 1). L'analyse de la distribution du cholestérol dans les différentes classes de lipoprotéines montre que l'augmentation du cholestérol plasmatique observée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO est attribuable à une augmentation du HDL-C et LDL-C, avec l'apparition de particules HDL anormalement larges (Figure 1). Ces données indiquent que le phénotype plasmatique des souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO est principalement attribuable à l'inactivation hépatique de SR-BI.

La concentration hépatique en cholestérol estérifié est significativement diminuée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO, SR-BI-KO<sup>foie</sup> et dKO par rapport aux souris sauvages (WT) alors que la concentration en cholestérol libre est uniquement diminuée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO. La concentration en triglycérides reste identique chez les 4 lignées de souris (Tableau 1).

	WT	P2Y <sub>13</sub> -KO	SR-BI-KO <sup>foie</sup>	P2Y <sub>13</sub> x SR-BI <sup>foie</sup> dKO
<b>Lipides plasmatiques (mg/dL)</b>				
Cholestérol total	95,3 ± 3,9	92,2 ± 2,8	195,8 ± 9,8 <sup>a,b</sup>	199,3 ± 5,0 <sup>a,b</sup>
Triglycérides	73,8 ± 2,8	77,4 ± 5,5	76,1 ± 6,6	87,7 ± 5,0 <sup>a</sup>
<b>Lipides hépatiques (nmol/mg)</b>				
Cholestérol libre	7,13 ± 0,58	5,81 ± 0,35 <sup>a</sup>	6,58 ± 0,53	6,96 ± 0,27 <sup>b</sup>
Cholesteryl ester	0,90 ± 0,07	0,63 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,05 <sup>a</sup>
Triglycérides	2,49 ± 0,26	1,92 ± 0,23	1,58 ± 0,60	2,63 ± 0,57

**Tableau 1. Concentrations de lipides plasmatiques et hépatiques chez les souris contrôles (WT), P2Y<sub>13</sub>-KO, SR-BI<sup>foie</sup>-KO et P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO avec un régime normolipidique.** Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM; n ≥ 8 souris par groupe. <sup>a</sup> indique une différence significative (p<0,05) par rapport aux souris sauvages (WT). <sup>b</sup> indique une différence significative (p<0,05) par rapport aux souris P2Y<sub>13</sub>-KO.

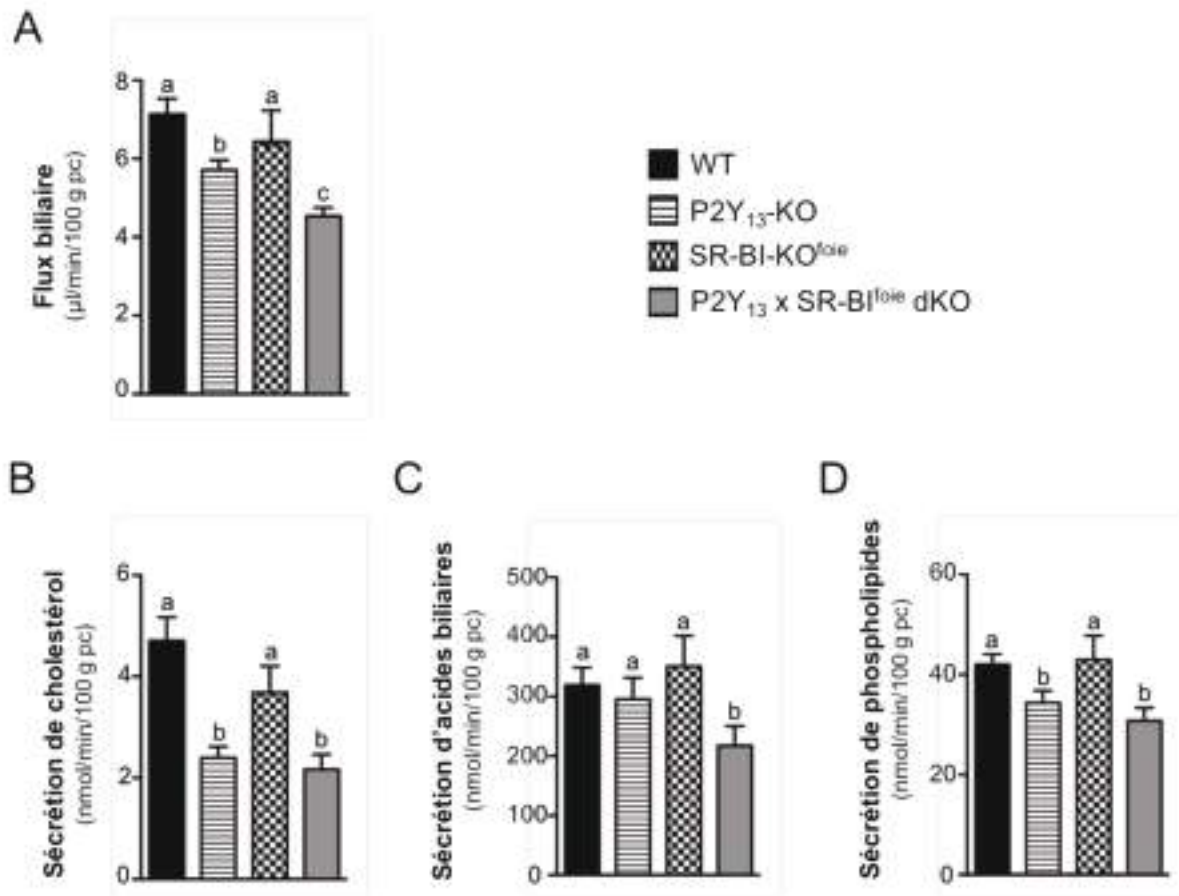




**Figure 1. Profil FPLC d'échantillons plasmatiques représentatifs chez les souris avec un régime normolipidique.** Les lipoprotéines issues d'échantillons plasmatiques ont été séparées par la technique de chromatographie d'exclusion FPLC. Chaque ligne représente la valeur moyenne de 3 pools de 3 souris.

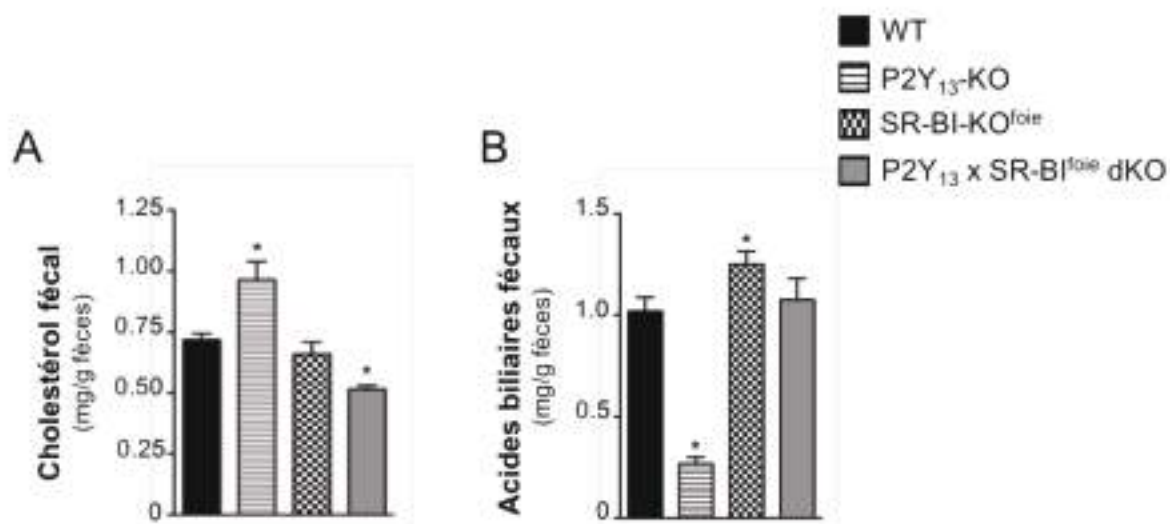
### 3.3.2. Altération des sécrétions de lipides biliaires et de l'excrétion fécale en cholestérol et acides biliaires chez les souris $P2Y_{13} \times SR-BI^{foie} dKO$ .

Les sécrétions de lipides biliaires ont été analysées pour chacun des 4 génotypes de souris. De façon remarquable, les souris  $P2Y_{13}-KO \times SR-BI-KO^{foie} dKO$  présentent une importante diminution du flux biliaire et des sécrétions de l'ensemble des lipides biliaires *i.e.* cholestérol, phospholipides et acides biliaires par rapport aux souris sauvages (Figure 2). Comme précédemment observé (Fabre et al., 2010), les souris  $P2Y_{13}-KO$  présentent un phénotype similaire à celui des souris dKO, avec une diminution significative du flux biliaire et des sécrétions biliaires de cholestérol et de phospholipides par rapport aux souris sauvages, sans toutefois d'altération des sécrétions en acides biliaires (Figure 2). De façon intéressante, les souris  $SR-BI-KO^{foie}$ , dont les sécrétions de lipides biliaires n'avaient jamais été analysées à ce jour, ont un phénotype identique à celui des souris sauvages, suggérant que l'altération des sécrétions de lipides biliaires observée chez les souris dKO est principalement attribuable à l'inactivation du récepteur  $P2Y_{13}$ .



**Figure 2. Sécrétions de lipides biliaires des souris avec un régime normolipidique.** La bile a été collectée 30 min après le début de la canulation de la vésicule biliaire, pendant 30 min et les sécrétions biliaires de cholestérol, phospholipides et acides biliaires ont été analysées. Les valeurs moyennes sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM;  $n \geq 8$  souris par groupe. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les groupes ( $p < 0,05$ ).

Les concentrations fécales en cholestérol et acides biliaires ont ensuite été mesurées pour chacune des 4 lignées de souris (Figure 3). Le contenu en cholestérol retrouvé dans les fèces est significativement diminué chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO par rapport aux souris WT (Figure 3A). Inversement et de façon inattendue, l'excrétion fécale en cholestérol est fortement augmentée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO par rapport aux 3 autres lignées (Figure 3A). L'excrétion fécale en acides biliaires reste quant à elle identique entre les souris dKO et WT mais se retrouve respectivement augmentée et diminuée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub>-KO (Figure 3B).



**Figure 3. Lipides fécaux.** Les fèces ont été collectées pendant 48h et lyophilisées. Le cholestérol et les acides biliaires ont été extraits et analysés par GC et SPE-LC-MS, respectivement (voir Matériels et méthodes). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM;  $n \geq 5$  souris par groupe. \* $p < 0,05$  par rapport aux souris WT.

### 3.3.3. Augmentation du développement de l'athérosclérose associée à une altération des sécrétions de lipides biliaires et fécaux chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO.

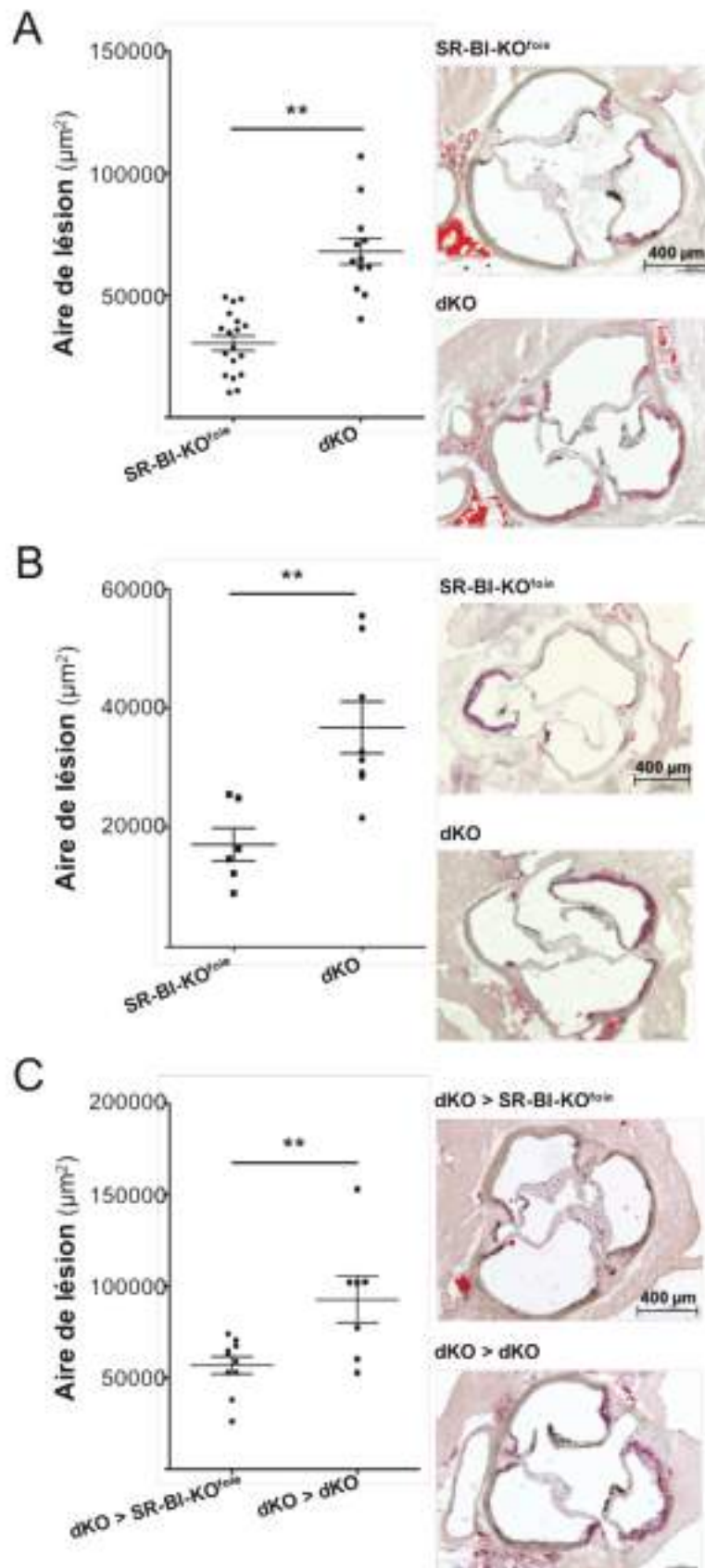
Etant donné que seules les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> ont été décrites pour développer de l'athérosclérose sous régime hypercholestérolémique (Huby et al., 2006) (El Bouhassani et al., 2011) alors que les souris sauvages et P2Y<sub>13</sub>-KO ne développent pas de lésions dans les mêmes conditions (Lichtenstein et al., 2013), j'ai comparé le développement des lésions d'athérosclérose uniquement entre souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub>-KO x SR-BI-KO<sup>foie</sup> dKO, après 20 semaines de régime hypercholestérolémique (1,25% cholestérol).

Par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO montrent une augmentation significative des lésions d'athérosclérose, évaluées par la quantification des dépôts lipidiques au niveau de la crosse aortique, indépendamment du sexe (Figure 4A et 4B). Pour évaluer la contribution du récepteur P2Y<sub>13</sub> exprimé dans les cellules sanguines, nous avons effectué des transplantations de moelle osseuse (MO). Pour cela, après irradiation à une dose sublétales induisant une aplasie de la MO, les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO ont été transplantées avec de la MO de souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO. Deux groupes ont ainsi été obtenus, *i)* les souris receveuses SR-BI-KO<sup>foie</sup> transplantées avec la MO des souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO (dKO > SR-BI-KO<sup>foie</sup>) et *ii)* les souris receveuses P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO transplantées avec la MO de souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO (dKO > dKO). A l'issue d'une période de 20 semaines de régime hypercholestérolémique, le groupe de souris reconstituées dKO > dKO présentait des lésions d'athérosclérose plus développées que le groupe dKO > SR-BI-KO<sup>foie</sup> (Figure 4C). Ces données indiquent que l'absence du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans les

cellules du système hématopoïétique n'est pas responsable du développement plus important de l'athérosclérose observé chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>.

Par conséquent j'ai voulu analyser si une altération du métabolisme hépato-biliaire du cholestérol pouvait être associée à cette augmentation du développement de l'athérosclérose. Comme observé plus haut sous régime normolipidique (Figure 2), les souris dKO nourries sous régime hypercholestérolémique présentent une diminution du flux biliaire et de l'ensemble des sécrétions de lipides biliaires (*i.e.* cholestérol, acides biliaires et phospholipides) par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> alors que les niveaux de lipides plasmatiques restent inchangés entre les 2 lignées (Tableau 2). En accord avec une altération du métabolisme hépato-biliaire du cholestérol, les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO présentent également une diminution significative de leur excrétion fécale en cholestérol et acides biliaires par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> (Tableau 2).





**Figure 4.** Mesure du développement de l'athérosclérose chez les souris  $\text{P2Y}_{13} \times \text{SR-BI}^{\text{foie}} \text{dKO}$  (dKO) et souris  $\text{SR-BI-KO}^{\text{foie}}$  et évaluation du rôle du récepteur  $\text{P2Y}_{13}$  exprimé dans les cellules hématopoïétiques.

**A, B.** Quantification du marquage à l'huile rouge des lésions aortiques d'athérosclérose chez les souris dKO et  $\text{SR-BI-KO}^{\text{foie}}$ , femelles (A) et mâles (B) après 20 semaines de régime hypercholestérolémique,  $n \geq 12$  souris par groupe. **C.** Des souris  $\text{SR-BI-KO}^{\text{foie}}$  et dKO ont été irradiées et transplantées avec de la moelle osseuse de souris dKO, comme décrit dans la partie Matériel et méthodes, pour obtenir 2 groupes de souris (dKO >  $\text{SR-BI-KO}^{\text{foie}}$  et dKO > dKO,  $n \geq 7$  par groupe). Les lésions aortiques d'athérosclérose ont ensuite été quantifiées après 20 semaines de régime hypercholestérolémique. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. \*\* indique  $p < 0,01$ . Les images (grossissement  $\times 50$ ) sont représentatives des coupes du sinus aortique après marquage des lipides à l'huile rouge.

	SR-BI-KO <sup>foie</sup>	P2Y <sub>13</sub> x SR-BI <sup>foie</sup> dKO
<b>Lipides plasmatiques (mg/dL)</b>		
Cholestérol total	266,0 ± 9,2	274,2 ± 12,4
HDL-C	210,3 ± 7,2	211,5 ± 7,3
Triglycérides	47,4 ± 3,4	52,3 ± 2,5
<b>Lipides biliaires</b>		
Flux biliaire (µL/min/100g pc)	5,50 ± 0,3	4,51 ± 0,2*
Sécrétion cholestérol (nmol/min/100g pc)	4,1 ± 0,5	2,4 ± 0,3
Sécrétion acides biliaires (nmol/min/100g pc)	190,5 ± 21,7	118,3 ± 10,3*
Sécrétion Phospholipides (nmol/min/100g pc)	29,4 ± 1,8	17,0 ± 1,3*
<b>Lipides fécaux</b>		
Cholestérol total (mg/g)	76,8 ± 3,5	62,3 ± 5*
Acides biliaires totaux (mg/g)	7,8 ± 0,5	5,7 ± 0,8*

**Tableau 2. Données de lipides plasmatiques, biliaires et fécaux chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO and SR-BI-KO<sup>foie</sup> sous régime hypercholestérolémique.** Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM; n ≥ 8 souris par groupe. \* indique une différence significative (p<0,05) par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>.

### 3.4. Discussion.

Cette étude a évalué pour la première fois, *via* un modèle invalidé pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> et pour le récepteur SR-BI au niveau hépatique, la contribution de chacun des 2 récepteurs dans le catabolisme hépato-biliaire du cholestérol et le développement de l'athérosclérose.

Les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO présentent un phénotype additif par rapport aux souris simplement invalidées pour l'un ou l'autre des récepteurs, avec une hypercholestérolémie caractérisée par une élévation des concentrations plasmatiques en HDL-C et LDL-C qui est strictement attribuable à l'invalidation de SR-BI hépatique et une altération des sécrétions biliaires de lipides (cholestérol, acides biliaires et phospholipides), attribuable à l'invalidation du récepteur P2Y<sub>13</sub>. Ce phénotype métabolique est accentué sous régime riche en cholestérol et est associé à une augmentation de la taille des lésions d'athérosclérose par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, indépendamment de l'expression du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans les cellules hématopoïétiques. Ces résultats indiquent que lorsque le récepteur SR-BI est invalidé, l'activité du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le catabolisme hépato-biliaire du cholestérol est athéroprotectrice. En cohérence avec ces résultats, sur un modèle de souris hypercholestérolémiques et susceptibles à l'athérosclérose, apoE-KO, l'activation pharmacologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> réduit significativement le développement des lésions d'athérosclérose (Goffinet et al., 2014) alors que son invalidation sur le même modèle (P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO) est associée à un développement précoce de l'athérosclérose par rapport aux souris apoE-KO (Lichtenstein et al., 2015). L'ensemble de ces données indique donc, qu'en situation

d'hypercholestérolémie chez la souris, l'activité du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le catabolisme hépato-biliaire du cholestérol est athéroprotectrice.

Le phénotype lipémique des souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub>-KO est similaire à celui rapporté dans les études précédentes (Huby et al., 2006) (El Bouhassani et al., 2011) (Fabre et al., 2010) mais certains paramètres métaboliques qui n'avaient jamais été mesurés à ce jour méritent discussion.

Ainsi, les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> ont précédemment été décrites comme ayant une hypercholestérolémie caractérisée par une concentration en HDL-C et LDL-C plus élevée que chez les souris sauvages, avec la présence de particules HDL plus larges et riches en apoE et une augmentation du ratio cholestérol libre/cholestérol total (Huby et al., 2006). Ce phénotype est attribuable au fait que le récepteur SR-BI lie les HDL mais également les LDL et VLDL et qu'il contribue, essentiellement au niveau hépatique, à la captation sélective du cholestérol estérifié contenu dans les HDL et les LDL (Out et al., 2005) (Brundert et al., 2005) (Y Ji et al., 1999) (Swarnakar et al., 1999). En relation avec cette fonction, une diminution de la concentration hépatique en cholestérol estérifié est observée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> par rapport aux souris sauvages. Dans cette étude, nous observons pour la première fois que, contrairement aux souris totalement invalidées pour SR-BI (Mardones et al., 2001), les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> ne présentent pas de diminution de leur sécrétion biliaire en cholestérol par rapport aux souris sauvages. En accord avec ce phénotype hépato-biliaire, l'excretion fécale en cholestérol n'est pas altérée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>. Ainsi nos résultats, indiquent que, contrairement à toute attente, les activités extra-hépatiques de SR-BI auraient un impact plus important sur le métabolisme hépato-biliaire du cholestérol que son activité hépatique dans la captation sélective du cholestérol des HDL. Notamment, l'activité extra-hépatique de SR-BI dans l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers les HDL (A. Ji et al., 2011) pourrait jouer un rôle majeur dans le catabolisme hépato-biliaire du cholestérol, alors que le cholestérol des HDL et LDL capté par SR-BI hépatique ne serait pas adressé aux voies biliaires. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'une partie du cholestérol capté par SR-BI au niveau du foie est resécrété *via* la production hépatique des VLDL (Wiersma et al., 2010).

Contrairement aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, les souris P2Y<sub>13</sub>-KO présentent, par rapport aux souris sauvages, une diminution importante des sécrétions de l'ensemble des lipides biliaires (cholestérol, acides biliaires et phospholipides) sans modification des concentrations plasmatiques en cholestérol et triglycérides, ni du contenu en cholestérol dans les différentes classes de lipoprotéines. Ces résultats sont identiques à ceux précédemment obtenus chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO, pour lesquelles il a été observé un défaut d'endocytose des particules HDL associé à une altération du catabolisme hépato-biliaire du cholestérol sans modification des concentrations plasmatiques en lipides et HDL-C (Fabre et al., 2010). Ces données indiquent que l'activité du récepteur P2Y<sub>13</sub> n'a que peu d'influence

sur la concentration statique en HDL-C, mais qu'elle est essentielle au catabolisme hépato-biliaire du cholestérol contenu dans les HDL (Fabre et al., 2010). Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que les souris P2Y<sub>13</sub>-KO présentent, par rapport aux souris sauvages, une diminution de l'excrétion fécale en acides biliaires mais, de façon inattendue, une augmentation de l'excrétion fécale en cholestérol. Ce résultat, suggère qu'il existe chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO un mécanisme de compensation de la baisse des sécrétions biliaires en cholestérol qui pourrait impliquer une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol et/ou une augmentation de l'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE). De façon intéressante, une compensation de la baisse des sécrétions biliaires en cholestérol par une augmentation du TICE a déjà été observée chez les souris transgéniques exprimant au niveau du foie le transporteur NPC1L1. Les souris NPC1L1<sup>foieTg</sup>, en concordance avec l'activité connue de NPC1L1 dans le rétro-transport hépato-biliaire du cholestérol chez l'homme, présentent une forte diminution de la sécrétion biliaire en cholestérol mais ont une excretion fécale en cholestérol inchangée, ce qui a été attribuée à une augmentation du TICE, faisant de ces souris un modèle de stimulation chronique du TICE (Temel et al., 2010a) (Temel & Brown, 2010b) (Temel et al., 2007).

La caractérisation du mécanisme de compensation responsable de l'augmentation de l'excrétion fécale en cholestérol chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO fera l'objet d'une autre étude, mais certaines hypothèses peuvent cependant être émises. Notamment, les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO et P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO ne semblent pas soumises à ce mécanisme de compensation puisqu'elles présentent une baisse de l'excrétion fécale en cholestérol et acides biliaires par rapport à leurs contrôles respectifs, les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> (Figure 3 et Tableau 2) et apoE-KO (cf. Article 1 : (Lichtenstein et al., 2015)). Ces données suggèrent que la mise en place d'un mécanisme de compensation par le TICE ou une absorption intestinale diminuée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO nécessitent la présence ou fonctionnalité hépatique de SR-BI. En effet, il a été rapporté que l'apoE est essentielle à l'activité de SR-BI. Chez les souris apoE-KO, l'expression de SR-BI est augmentée mais sa fonctionnalité diminuée, ce qui se traduit par une captation sélective du cholestérol estérifié des HDL diminuée par rapport aux souris WT (Arai et al., 1999b). Chez les souris P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO, l'expression hépatique de SR-BI est également augmentée (ARNm et protéine), mais elle ne suffit pas à compenser les effets délétères de l'inactivation du récepteur P2Y<sub>13</sub> sur le catabolisme hépato-biliaire du cholestérol et le développement de l'athérosclérose (Lichtenstein et al., 2015). Il est ainsi probable que SR-BI soit peu fonctionnel chez les souris P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO.

Bien que notre modèle de délétion hépatique de SR-BI soit hypomorphe, du fait que les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> (SR-BI<sup>flox/flox</sup>/CreAlb) présentent une diminution extra-hépatique partielle de l'expression de SR-BI, il est peu probable que SR-BI intestinal soit impliqué dans ce mécanisme de compensation puisqu'il a été démontré que SR-BI intestinal n'impacte ni l'absorption intestinale du



cholestérol ni le TICE (Bura et al., 2013). Egalement, le fait que l'excrétion fécale en cholestérol ne soit pas modifiée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> par rapport aux souris WT (Figure 3) et que, chez les souris SR-BI-KO, le TICE est, soit non modifié (Vrins et al., 2012), soit significativement augmenté (van der Velde et al., 2008), indique que l'implication de SR-BI dans le mécanisme de compensation mis en évidence chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO pourrait être indirecte.

Il a été démontré que les VLDL fournissent préférentiellement le cholestérol pour le TICE. Ainsi, la réduction de la production hépatique des VLDL par l'inhibition de la MTP (*Microsomal triglyceride transfer protein*) réduit significativement le TICE (Marshall et al., 2014b). Le fait qu'une partie du cholestérol capté par SR-BI au niveau du foie soit resécrétée *via* la production hépatique des VLDL (Wiersma et al., 2010), pourrait donc expliquer un TICE augmenté chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO mais pas chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO.

Egalement, nous avons observé une diminution de l'expression génique hépatique de ACAT2 (acyl-coenzyme A: Cholesterol Acyltransférase 2) chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO par rapport aux souris WT ( $0,55 \pm 0,04$  vs.  $1 \pm 0,09$ ,  $p < 0,05$ ) alors que l'expression génique reste inchangée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> et P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO. Une baisse de l'activité d'ACAT2, enzyme qui assure l'estérification du cholestérol au niveau du foie, a été décrite comme étant associée à une augmentation du TICE. Notamment, l'invalidation hépatique de ACAT2 chez la souris se traduit par une augmentation de l'excrétion fécale en cholestérol sans modification des sécrétions biliaires en cholestérol (Marshall et al., 2014a). Il a été démontré que l'expression transcriptionnelle de ACAT2 est positivement régulée par la charge en cholestérol dans les hépatocytes (Pramfalk et al., 2007). La diminution de ACAT2 observée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO pourrait donc résulter de la baisse du contenu hépatique en cholestérol libre et estérifié. Cette diminution de l'expression hépatique de ACAT2 chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO, supporte l'idée d'une compensation par la voie du TICE.

Ainsi, l'invalidation du récepteur P2Y<sub>13</sub> contribue au développement de l'athérosclérose dans les modèles P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO et P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO, pour lesquels l'altération du catabolisme hépato-biliaire du cholestérol dépendante du récepteur P2Y<sub>13</sub> n'est pas compensée et est accompagnée d'une baisse de l'excrétion fécale en cholestérol et acides biliaires.

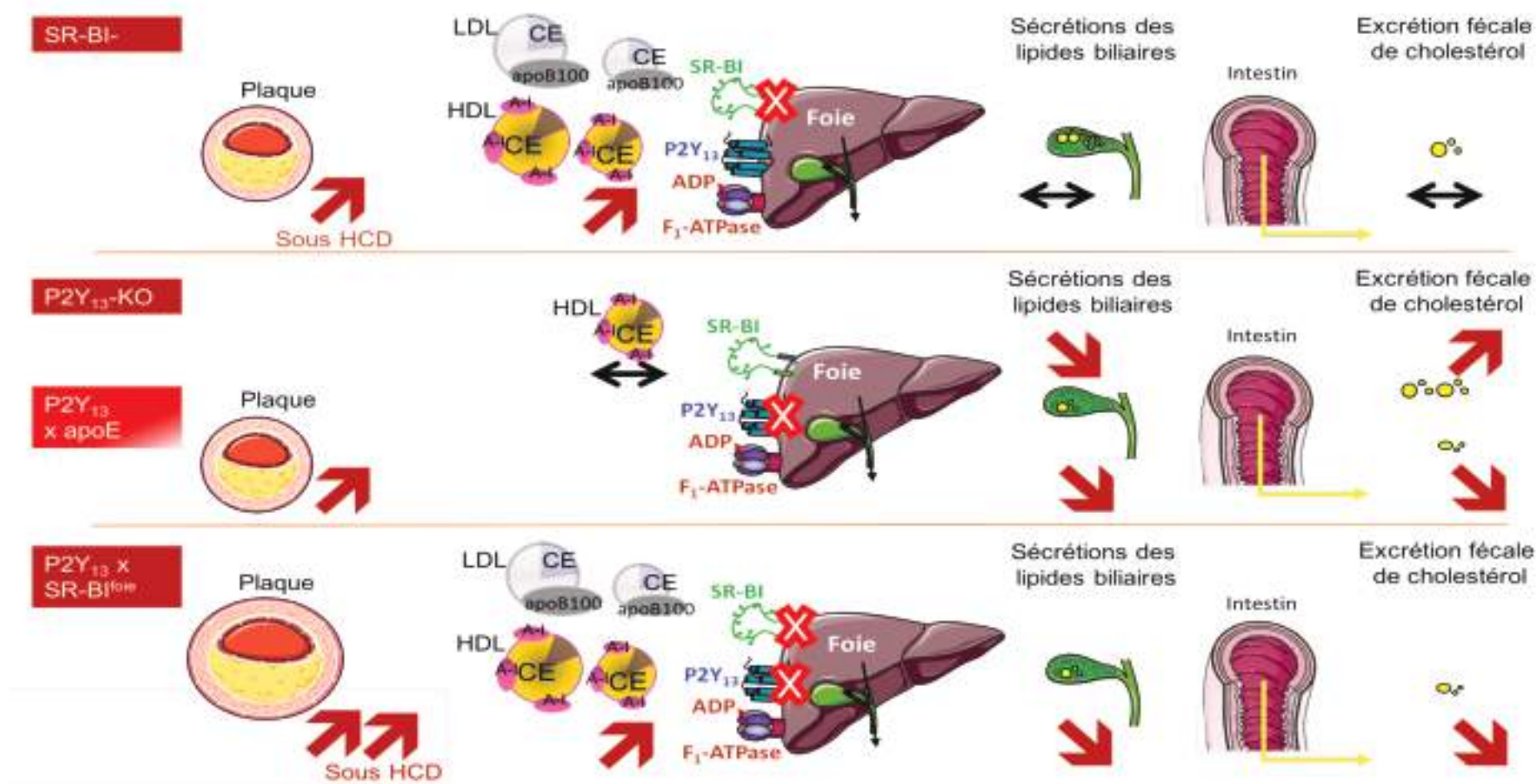
En conclusion, l'ensemble des résultats de mon projet de thèse montre que la délétion hépatique de SR-BI contribue essentiellement à une augmentation des taux plasmatiques de cholestérol, et plus particulièrement HDL-C. La délétion de P2Y<sub>13</sub>, quant à elle, n'induit aucune variation des taux plasmatiques de lipoprotéines mais contribue principalement à une diminution des sécrétions de lipides biliaires qui participe au développement de l'athérosclérose chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique. Ces résultats soutiennent le concept selon lequel le flux de cholestérol transporté par les HDL des tissus périphériques vers le foie et les voies de sécrétions

biliaires est plus important dans l'athéroprotection que la concentration plasmatique en HDL-C. L'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> constitue une approche thérapeutique intéressante pour cibler les HDL contre le développement de l'athérosclérose.

	P2Y <sub>13</sub> -KO	SR-BI-Ko <sup>foie</sup>	P2Y <sub>13</sub> x SR-BI <sup>foie</sup> dKO
Régime	CD/HCD <sup>1</sup>	CD/HCD	CD/HCD <sup>2</sup>
HDL-C, LDL-C	↔	↑	↑
Lipides Biliaires	↓	↔	↓
Plaque d'athérome (sous HCD)	↔ et ↑ (fond apoE-KO) <sup>2</sup>	↑	↑↑

**Tableau 5** : Tableau récapitulatif basé sur les résultats obtenus dans ces travaux de thèse : Contribution respective des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique sur les taux plasmatiques de HDL-C et LDL-C, les sécrétions biliaires, et le développement de l'athérosclérose. La délétion hépatique de SR-BI contribue essentiellement à une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol, et plus particulièrement du HDL-C. La délétion de P2Y<sub>13</sub>, quant à elle, n'induit aucune variation des taux plasmatiques de lipoprotéines mais contribue principalement à une diminution des sécrétions de lipides biliaires qui contribue au développement de l'athérosclérose chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique. <sup>1</sup>Souris P2Y<sub>13</sub>-KO caractérisées sous HCD (Lichtenstein et al., 2013) ; <sup>2</sup>Souris P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO vs. apoE-KO (Lichtenstein et al., 2015) ; <sup>3</sup>Phénotype des souris dKO sous HCD analysé en comparaison avec les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>.

CD : Chow Diet (régime normolipidique), HCD : High Cholesterol Diet (1,25% cholestérol).



**Figure 17 : Contributions respectives des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse. Les flèches rouges indiquent une augmentation ou une diminution. Les flèches noires indiquent l'absence de variation. Plaque : lésion d'athérosclérose. Développement de la lésion d'athérosclérose chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO sous HCD analysé en comparaison avec les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>.

#### 4. Conclusion générale.

Dans l'Article 1, nous avons montré que l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> dans le modèle murin pro-athérogène apoE-KO induit une augmentation du développement d'athérosclérose associée à une diminution des sécrétions de lipides biliaires et du RCT des macrophages vers les fèces. L'étude correspondant à l'Article 2 a permis d'évaluer la contribution respective de récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose *via* un modèle de souris doublement invalidées pour le récepteur P2Y<sub>13</sub> et le récepteur SR-BI au niveau hépatique. Par rapport aux souris sauvages, les souris dKO sous régime normolipidique, montrent une augmentation du cholestérol plasmatique similaire à celle observée chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, principalement imputable à une augmentation du HDL-C et du LDL-C. Les souris dKO, mais pas les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, présentent une diminution des sécrétions de lipides biliaires comparable à celle observée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO. Ce phénotype métabolique observé chez les souris dKO est accentué sous régime hypercholestérolémique et est associé à une augmentation des plaques d'athérosclérose par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, confirmant le rôle protecteur du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans le développement de l'athérosclérose, démontré dans le modèle murin pro-athérogène apoE-KO (Article 1). Ces travaux montrent donc que la délétion hépatique de SR-BI contribue essentiellement à une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol (HDL-C et LDL-C). La délétion de P2Y<sub>13</sub>, quant à elle, n'induit aucune variation des taux plasmatiques de lipoprotéines mais contribue principalement à une diminution des sécrétions de lipides biliaires qui participe au développement de l'athérosclérose chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique. Ces résultats soutiennent le concept selon lequel le flux de cholestérol transporté par les HDL des tissus périphériques vers le foie et les voies de sécrétions biliaires est plus important dans l'athéroprotection que la concentration statique en HDL-C.

## 5. Perspectives.

### 5.1. Finalisation de la mise en évidence des contributions respectives de P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose.

Différentes expériences peuvent être envisagées afin de mieux comprendre la contribution respective des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI hépatique dans le métabolisme des HDL, du cholestérol et dans le développement des lésions d'athérome.

#### 5.1.1. Analyse de l'expression génique hépatique et intestinale.

Une analyse du transcriptome hépatique et intestinal ciblant un grand nombre de gènes clés pouvant expliquer les phénotypes caractérisés pourrait être effectuée dans les 4 groupes de souris. L'analyse du transcriptome hépatique détaillera les voies de synthèse de cholestérol (SREPB2, HMG-CoA reductase, HMG-CoA synthase), de synthèse d'acides biliaires (cyp7a1, cyp27a1 et cyp8b1,...), de transport de lipides biliaires (ABCB4, ABCG5/8, ABCB11), de la circulation entéro-hépatique des acides biliaires (OATPs, NTCP), de la synthèse de HDL (apoA-I, ABCG1, ABCA1) ; cette analyse permettra d'expliquer et interpréter les différents paramètres lipidiques observés. L'analyse du transcriptome intestinal, détaillera les voies d'absorption intestinale (NPC1L1, ABCA1, ABCG5/8), et donnera accès à l'étude des gènes ayant été associés au TICE (LDLR, PCSK9, ABCG5/8, ABCB1a/b) et la circulation entéro-hépatique des acides biliaires (ASBT, IBABP, Ost $\alpha$ -Ost $\beta$ ). Cette analyse de l'expression génique dans ces tissus nous permettra également de mieux comprendre l'augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol observée chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO et d'évaluer l'hypothèse que le TICE soit impliqué dans ce mécanisme de compensation (comme cela est suggéré par la baisse hépatique d'ACAT2 observée chez ces souris par rapport aux souris sauvages).

De plus, ces analyses nous permettront de savoir si chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup>, le récepteur P2Y<sub>13</sub> est surexprimé au niveau du foie et contribue à l'absence d'altération des sécrétions biliaires et d'excrétion de cholestérol, ce qui induirait un développement d'athérosclérose moins important que celui observé chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO. Cette hypothèse est soutenue par le concept suggéré par certaines études, d'un possible mécanisme de compensation qui pourrait exister entre les récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI. En effet, dans l'Article 1 (Lichtenstein et al., 2015), nous avons vu que chez les souris P2Y<sub>13</sub> x apoE dKO, l'expression hépatique transcriptionnelle et protéique de SR-BI était fortement augmentée par rapport aux souris apoE-KO, et que cette surexpression permettait une compensation partielle responsable de la baisse de HDL-C chez ces souris doublement invalidées, mais insuffisante pour contrer l'effet de l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> sur le développement de

l'athérosclérose. Une autre étude a démontré que des souris doublement invalidées pour SR-BI et ABCA1, qui est le transporteur impliqué dans l'efflux du cholestérol des tissus périphériques et dans la production hépatique des HDL, ne développent pas d'athérosclérose. Ces souris SR-BI x ABCA1 dKO ont une expression hépatique du récepteur P2Y<sub>13</sub> augmentée au niveau protéique (Zhao et al., 2011).

### 5.1.2. Evaluation du RCT hépato-biliaire, du TICE et de l'absorption intestinale.

Les souris P2Y<sub>13</sub>-KO présentent une diminution du RCT des macrophages vers les fèces, sous régime normolipidique (Fabre et al., 2010), ainsi que sous régime hypercholestérolémique (1,25% de cholestérol) (Lichtenstein et al., 2013). Les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> présentent également une diminution du RCT des macrophages vers les fèces sous régime normolipidique (El Bouhassani et al., 2011). Cependant, dans notre étude, nous avons observé que ces souris ne présentent pas de variations des sécrétions de lipides biliaires, mais présentent une augmentation de l'excrétion fécale des acides biliaires. Il serait intéressant d'évaluer le RCT des macrophages vers les fèces chez ces souris en utilisant des macrophages chargés en cholestérol radiomarqué, issus de souris C57BL/6, et récupérés au niveau du péritoine après administration de thioglycolate (Lichtenstein et al., 2013), et non pas des macrophages issus de la moelle osseuse (El Bouhassani et al., 2011), afin de mieux mimer les conditions d'inflammation dans les conditions de dyslipidémie et l'athérosclérose. Le RCT des macrophages vers les fèces chez les souris P2Y<sub>13</sub> x SR-BI<sup>foie</sup> dKO sera également mesuré. En considérant le phénotype métabolique et cardiovasculaire de ces souris dKO, (i.e. une athérosclérose accrue par rapport aux souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> associée à une altération des sécrétions de lipides biliaires et de l'excrétion fécale de cholestérol), le RCT des macrophages vers les fèces, devrait être diminué chez ces souris.

De façon intéressante, nous avons rapporté dans l'Article 2 que les souris invalidées pour P2Y<sub>13</sub> présentent une augmentation de l'excrétion fécale en cholestérol, malgré une diminution des sécrétions de lipides biliaires (Fabre et al., 2010) (Lichtenstein et al., 2013). Ces résultats, déjà discutés dans l'article, suggèrent qu'il existe, chez ces souris un mécanisme de compensation qui contrebalancerait la baisse de la sécrétion biliaire en cholestérol, et qui pourrait dépendre de l'activité hépatique de SR-BI. L'augmentation de l'excrétion trans-intestinale de cholestérol, TICE, ou la diminution de l'absorption intestinale de cholestérol sont deux processus qui pourraient être impliqués dans cette compensation.

Ainsi, le TICE mais également l'absorption intestinale du cholestérol pourraient être mesurés chez les souris P2Y<sub>13</sub>-KO afin d'étudier ces deux hypothèses.

La mesure de l'absorption intestinale du cholestérol pourra être faite par la « fecal dual-isotope method », méthode qui est basée sur l'administration d'une dose orale unique de cholestérol radiomarqué et d'un phytostérol radiomarqué à l'aide d'un isotope différent, non absorbé, tel que le  $\beta$ -sitostérol (Borgström, 1968) (Wang & Carey, 2003).

La mesure du TICE pourra être faite selon l'une des deux méthodes décrites ci-dessous.

La première méthode consiste à injecter en intraveineux *via* la veine caudale du cholestérol radiomarqué ( $4\text{-}^{14}\text{C}$ ) dilué dans de l'Intralipide, et 30 minutes après, à faire une perfusion de l'intestin grêle au niveau proximal, médial et distal avec une solution de Krebs contenant des accepteurs du cholestérol tels que des phospholipides (le TICE ayant une dépendance aux phospholipides similaire à celle de la sécrétion de cholestérol dans la bile (Temel & Brown, 2012)). La perfusion de l'intestin est faite en plaçant un cathéter au début de la section à étudier de l'intestin pour injecter la solution et un cathéter à la fin de la section pour la collecte de l'échantillon à analyser. En parallèle à cette perfusion intestinale, une canulation de la vésicule biliaire est pratiquée, en ligaturant le canal cholédoque pour court-circuiter la sécrétion du cholestérol biliaire dans la lumière intestinale. La mesure du cholestérol contenu dans les échantillons de perfusats intestinaux rend compte du TICE (van der Velde et al., 2007).

La deuxième méthode qui pourrait être utilisée pour la mesure du TICE consiste en une technique élégante qui permet d'avoir accès à la détermination des différentes sources des stérols neutres fécaux (van der Veen et al., 2009). Dans cette technique, deux types de cholestérol marqués par 2 isotopes stables sont administrés en aigu :

- une dose de cholestérol-D5 (chol-D5) dissout dans un milieu huileux contenant des triglycérides, administrée par voie orale,
- une dose de cholestérol-D7 (chol-D7) dissout dans des intralipides, adressée par voie intraveineuse et du  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ acetate administrée en chronique (pendant 6h) pour calculer la synthèse de cholestérol.

Des prises de sang et des collectes de fèces sont ensuite réalisées chaque 24h pendant une durée de 8 jours. Ainsi, il est possible d'accéder aux paramètres suivants :

i) l'absorption intestinale de cholestérol alimentaire (*via* la mesure à 72h du début de l'expérience, dans le sang, du ratio entre chol-D5 administré par voie orale et chol-D7 administré en intraveineux) ;

ii) l'excrétion fécale de cholestérol dérivé du sang (*via* la mesure du 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> jour de l'expérience, du chol-D7 administré en intraveineux, normalisée par rapport à la concentration de chol-D7 dans le sang) ;

iii) la sécrétion de cholestérol biliaire dérivé du sang (canulation et collecte de bile pendant 1h à 24h du début de l'expérience suivie de la mesure de chol-D7 dans la bile et dans le sang, le cholestérol biliaire non radiomarqué correspondant au cholestérol biliaire non issu du sang) ;

La mesure de ces paramètres permet d'accéder aux différentes sources des stérols neutres fécaux, à savoir :

- i) cholestérol excrété par l'intestin issu du sang = TICE
- ii) cholestérol nouvellement synthétisé et excrété par l'intestin
- iii) cholestérol sécrété par les voies biliaires (issu du sang ou nouvellement synthétisé)
- iv) cholestérol d'origine alimentaire non absorbé par l'intestin
- v) cholestérol excrété dans les fèces de provenance non identifiée (« shedding »).

## **5.2. Récepteurs SR-BI et P2Y<sub>13</sub> comme cibles potentielles pour lutter contre l'athérosclérose.**

Nos résultats mettent en évidence la contribution des 2 récepteurs SR-BI hépatique et P2Y<sub>13</sub>, dans le développement de l'athérosclérose chez la souris. La délétion hépatique de SR-BI contribue essentiellement à une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol et notamment en HDL-C et LDL-C mais n'entraîne pas d'altération des sécrétions de lipides biliaires sous régime normolipidique. Nous pouvons suggérer comme hypothèse que le développement d'athérosclérose chez les souris SR-BI-KO<sup>foie</sup> est attribuable à l'augmentation de cholestérol plasmatique. L'activation de la voie SR-BI, par exemple par des agents pharmacologiques qui permettraient de réguler positivement la protéine adaptatrice de SR-BI, PDZK-1, pourrait permettre de diminuer l'hypercholestérolémie et contribuer ainsi à une diminution du risque cardiovasculaire.

Mes travaux de thèse ont également mis en évidence que la délétion de P2Y<sub>13</sub>, n'induit aucune variation des taux plasmatiques de lipoprotéines mais contribue majoritairement à une diminution des sécrétions de lipides biliaires qui participe au développement de l'athérosclérose chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique. En accord avec ces résultats, dans des modèles précliniques, l'activation du récepteur P2Y<sub>13</sub> induit une augmentation des sécrétions de lipides biliaires associée à une diminution du développement de l'athérosclérose. En effet, l'activation pharmacologique du récepteur P2Y<sub>13</sub> a été évaluée dans des modèles animaux, *via* l'administration de 2 molécules, le cangrelor et l'agoniste spécifique du récepteur P2Y<sub>13</sub>, CT1007900 (Cerenis Therapeutics). L'administration de ces molécules chez la souris sauvage C57BL/6 a induit une augmentation significative des sécrétions de lipides biliaires (Serhan et al., 2013) (Goffinet et al., 2014). Le cangrelor étant également un inhibiteur du récepteur P2Y<sub>12</sub> actuellement utilisé en clinique comme anti-thrombotique (Gachet, 2008), son utilisation n'est pas envisageable dans le cadre d'une



stimulation du RCT en thérapeutique. Le CT1007900, quant à lui, pourrait être envisagé pour cibler le récepteur P2Y<sub>13</sub> chez l'homme. L'administration de cet agoniste a induit une diminution de la taille des plaques d'athérome dans des modèles murins pro-athérogènes, les souris apoE-KO (Goffinet et al., 2014). Chez le lapin, le CT1007900 a induit des effets sur le métabolisme des HDL similaires à ceux observés chez la souris et une diminution de l'épaisseur de la plaque d'athérome de 30% (Barbaras et al., 2012). L'agoniste du récepteur P2Y<sub>13</sub>, CT1007900, montre des résultats prometteurs dans ces premières études précliniques. Le récepteur P2Y<sub>13</sub> pourrait donc être une nouvelle cible thérapeutique prometteuse pour promouvoir le RCT hépato-biliaire dans le cadre d'une prévention de l'athérosclérose.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Acton, S., Osgood, D., Donoghue, M., Corella, D., Pocovi, M., Cenarro, A., ... Ordovas, J. M. (1999). Association of Polymorphisms at the SR-BI Gene Locus With Plasma Lipid Levels and Body Mass Index in a White Population. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(7), 1734–1743.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., & Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5248), 518–520.
- Aiello, R. J., Brees, D., Bourassa, P. A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., ... Francone, O. L. (2002). Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(4), 630–637.
- Akpovi, C. D. (2006). The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels not apoptosis in mink testis. *The Journal of Lipid Research*, 47(10), 2233–2247.
- Alrefai, W. A., & Gill, R. K. (2007). Bile acid transporters: Structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharmaceutical Research*, 24(10), 1803–1823.
- Altmann, S. W., Jr, H. R. D., Zhu, L., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., ... Graziano, M. P. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science*, 303(February), 1201–1205.
- Angeloni, E., Paneni, F., Landmesser, U., Benedetto, U., Melina, G., Lüscher, T. F., ... Cosentino, F. (2013). Lack of protective role of HDL-C in patients with coronary artery disease undergoing elective coronary artery bypass grafting. *European Heart Journal*, 34(46), 3557–3562.
- Annema, W., & Tietge, U. J. F. (2011). Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Current Atherosclerosis Reports*, 13(3), 257–265.
- Ara, R., Tumor, I., Pandor, A., Duenas, A., Williams, R., Wilkinson, A., ... Chilcott, J. (2008). Ezetimibe for the treatment of hypercholesterolaemia. *Health Technology Assessment*, 12(21).
- Arai, T. (1999). Decreased Atherosclerosis in Heterozygous Low Density Lipoprotein Receptor-deficient Mice Expressing the Scavenger Receptor BI Transgene. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2366–2371.
- Arai, T., Rinninger, F., Varban, L., Fairchild-Huntress, V., Liang, C. P., Chen, W., ... Tall, a R. (1999). Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 12050–5.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., ... Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003–8.
- Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*,

57(13–14), 1825–1835.

- Ashby, D. T., Rye, K. a, Clay, M. a, Vadas, M. a, Gamble, J. R., & Barter, P. J. (1998). Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(9), 1450–1455.
- Assanasen, C., Mineo, C., Seetharam, D., Yuhanna, I. S., Marcel, Y. L., Connelly, M. A., ... Silver, D. L. (2005). Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 115(4), 969–977.
- Assmann, G., Schulte, H., Von Eckardstein, A., & Huang, Y. (1996). High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. In *Atherosclerosis* (Vol. 124, pp. S11-20).
- Aulchenko, Y. S., Ripatti, S., Lindqvist, I., Boomsma, D., Heid, I. M., Pramstaller, P. P., ... Peltonen, L. (2009). Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nature Genetics*, 41(1), 47–55.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G. W., Xu, S., & Krieger, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13242–13249.
- Badrnya, S., Assinger, A., & Volf, I. (2013). Native high density lipoproteins (HDL) interfere with platelet activation induced by oxidized low density lipoproteins (OxLDL). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10107–10121.
- Baker, P. W., Rye, K. a, Gamble, J. R., Vadas, M. a, & Barter, P. J. (2000). Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of Lipid Research*, 41(8), 1261–1267.
- Baker, P. W., Rye, K., Gamble, J. R., Vadas, M. A., Barter, P. J., Hospital, R. A., & Centre, H. (1999). Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Lipid Research*, 40, 345–353.
- Banka, C. L., Yuan, T., Beer, M. C. De, Kindy, M., Curtiss, L. K., & Beerf, F. C. De. (1995). Serum amyloid A ( SAA ): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux, 36, 1058–1065.
- Baranova, I. N., Souza, A. C. P., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Hu, X., Vaisman, B. L., ... Eggerman, T. L. (2016). Human SR-BI and SR-BII Potentiate Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Acute Liver and Kidney Injury in Mice. *Journal of Immunology*, 196(7), 3135–47.
- Barbaras, R., Baron, R., Goffinet, M., Tardy, C., Boubekeur, N., Cholez, G., ... Dasseux, J.-L. H. (2012). Abstract 493: Antiatherosclerotic Activity of a New P2y13 Receptor Agonist (ct1007900) in Animal Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32:A493.
- Barbaras, R., Collet, X., Chap, H., & Perret, B. (1994). Specific binding of free apolipoprotein A-I to a high-affinity binding site on HepG2 cells: characterization of two high-density

- lipoprotein sites. *Biochemistry*, 33(8), 2335–40.
- Barrans, a, Collet, X., Barbaras, R., Jaspard, B., Manent, J., Vieu, C., ... Perret, B. (1994). Hepatic lipase induces the formation of pre- $\beta$ 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J. Biol. Chem.*, 269, 11572–11577.
- Barter, P. J., Brewer, H. B., Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J., & Tall, A. R. (2003). Cholesteryl ester transfer protein: A novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 160–167.
- Béaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., & Carrière, V. (2009). Sensing of dietary lipids by enterocytes: A new role for SR-BI/CLA-1. *PLoS ONE*, 4(1), 1–11.
- Bell, T. A., Brown, J. M., Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Crooke, R. M., & Rudel, L. L. (2006). Liver-specific inhibition of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 with antisense oligonucleotides limits atherosclerosis development in apolipoprotein B100-only low-density lipoprotein receptor-/- mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(8), 1814–1820.
- Bielicki, J. K., & Oda, M. N. (2002). Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, 41(6), 2089–96.
- Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Coméra, C., ... Collet, X. (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7214–7219.
- Biver, G., Wang, N., Gartland, A., Orriss, I., Arnett, T. R., Boeynaems, J. M., & Robaye, B. (2013). Role of the P2Y receptor in the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts and adipocytes. *Stem Cells*, 2747–2758.
- Blom, D., Yamin, T.-T., Champy, M.-F., Selloum, M., Bedu, E., Carballo-Jane, E., ... Puig, O. (2010). Altered lipoprotein metabolism in P2Y(13) knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(12), 1349–60.
- Borgström, B. (1968). Quantitative aspects of the intestinal absorption and metabolism of cholesterol and beta-sitosterol in the rat. *Journal of Lipid Research*, 9(4), 473–81.
- Botham, K., & Bravo, E. (1995). The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Prog. Lipid. Res.*, 71–97.
- Bowry, V. W., Stanley, K. K., & Stocker, R. (1992). High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(November), 10316–10320.
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 717–49.
- Braun, A., Trigatti, B. L., Post, M. J., Sato, K., Simons, M., Edelberg, J. M., ... Krieger, M. (2002). Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation Research*, 90(3), 270–276.

- Braun, A., Zhang, S., Miettinen, H. E., Ebrahim, S., Holm, T. M., Vasile, E., ... Krieger, M. (2003). Probucol prevents early coronary heart disease and death in the high-density lipoprotein receptor SR-BI/apolipoprotein E double knockout mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(12), 7283–8.
- Briand, O., Touche, V., Colin, S., Brufau, G., Davalos, A., Schonewille, M., ... Lestavel, S. (2016). Liver X Receptor Regulates Triglyceride Absorption Through Intestinal Down-regulation of Scavenger Receptor Class B, Type 1. *Gastroenterology*, *150*(3), 650–658.
- Brites, D., Rodrigues, C. M., Oliveira, N., Cardoso, M., & Graça, L. M. (1998). Correction of maternal serum bile acid profile during ursodeoxycholic acid therapy in cholestasis of pregnancy. *Journal of Hepatology*, *28*(1), 91–8.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., ... Hayden, M. R. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genetics*, *22*(4), 336–45.
- Brown, J. M., Bell, T. A., Alger, H. M., Sawyer, J. K., Smith, T. L., Kelley, K., ... Rudel, L. L. (2008). Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(16), 10522–10534.
- Bruckert, E. (2006). Epidemiology of low HDL-cholesterol: Results of studies and surveys. *European Heart Journal, Supplement*, *8*(F), 17–22.
- Brufau, G., Groen, A. K., & Kuipers, F. (2011). Reverse cholesterol transport revisited: Contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(8), 1726–1733.
- Brufau, G., Kuipers, F., Lin, Y., Trautwein, E. A., & Groen, A. K. (2011). A Reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS ONE*, *6*(6), 1–7.
- Brundert, M., Ewert, A., Heeren, J., Behrendt, B., Ramakrishnan, R., Greten, H., ... Rinninger, F. (2005). Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(1), 143–8.
- Brunham, L., Kang, M., Karnebeek, V., Sadananda, S., Collins, J., LH, Z., ... Hayden, M. (2015). Clinical, Biochemical, and Molecular Characterization of Novel Mutations in ABCA1 in Families with Tangier Disease. *Jimd Reports*, *18*, 51–62.
- Brunham, L. R., & Roshni R. Singaraja, M. R. H. (2006). Variations on a Gene: Rare and Common Variants in ABCA1 and Their Impact on HDL Cholesterol Levels and Atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, *26*, 105–129.
- Brunham, L. R., Tietjen, I., Bochem, A. E., Singaraja, R. R., Franchini, P. L., Radomski, C., ... Hayden, M. R. (2011). Novel mutations in scavenger receptor BI associated with high HDL cholesterol in humans. *Clinical Genetics*, *79*(6), 575–581.
- Bura, K. S., Lord, C., Marshall, S., McDaniel, A., Thomas, G., Warriar, M., ... Brown, J. M. (2013). Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice. *Journal of Lipid Research*, *54*(6), 1567–77.
- Calkin, A. C., Drew, B. G., Ono, A., Duffy, S. J., Gordon, M. V., Schoenwaelder, S. M., ... Jackson, S. P. (2009). Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet

- function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation*, 120(21), 2095–2104.
- Calkin, A. C., & Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 213–224.
- Camont, L., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2011). Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(10), 594–603.
- Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M. R., Abramov, A. Y., ... Duchen, M. R. (2008). Regulation of Mitochondrial Structure and Function by the F1Fo-ATPase Inhibitor Protein, IF1. *Cell Metabolism*, 8(1), 13–25.
- Cao, G., Garcia, C. K., Wyne, K. L., Wyne, L., Schultz, R. a, Parker, K. L., & Hobbs, H. H. (1997). Structure and Localization of the Human Gene encoding SR-B1/CLA-1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 33068–76.
- Carey, M. C. (1997). Homing-in on the origin of biliary steroids. *Gut*, 721–722.
- Castelli, W. P., Doyle, J. T., Gordon, T., Hames, C. G., Hjortland, M. C., Hulley, S. B., ... Zukel, W. J. (1977). HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation*, 55(5), 767–772.
- Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., & von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761(7), 655–66.
- Cavelier, C., Ohnsorg, P. M., Rohrer, L., & Von Eckardstein, A. (2012). The  $\beta$ -chain of cell surface FOF1 ATPase modulates ApoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(1), 131–139.
- Cavelier, C., Rohrer, L., & Von Eckardstein, A. (2006). ATP-binding cassette transporter A1 modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells. *Circulation Research*, 99(10), 1060–1066.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology*, 22(3), 125–132.
- Cheng, S., & Stanley, M. . (1959). Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 101(2), 223–5.
- Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955–1966.
- Chiba-Falek, O., Nichols, M., Suchindran, S., Guyton, J., Ginsburg, G. S., Barrett-Connor, E., & McCarthy, J. J. (2010). Impact of gene variants on sex-specific regulation of human Scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) expression in liver and association with lipid levels in a population-based study. *BMC Medical Genetics*, 11(1), 9.
- Christison, J., Rye, K. a, & Stocker, R. (1995). Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *Journal of Lipid Research*, 36(9), 2017–2026.
- Chu, B. B., Liao, Y. C., Qi, W., Xie, C., Du, X., Wang, J., ... Song, B. L. (2015). Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell*, 161(2), 291–306.
- Cockerill, G. W., Rye, K. A., Gamble, J. R., Vadas, M. A., & Barter, P. J. (1995). High-density

- lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(11), 1987–94.
- Cohen, D. E. (1999). Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids. *Current Opinion in Lipidology*, 10(4), 295–302.
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brézillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41479–85.
- Conlan, M. G., Folsom, A. R., Finch, A., Davis, C. E., Sorlie, P., Marcucci, G., & Wu, K. K. (1993). Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost*, 70(3), 380–385.
- Contessi, S., Comelli, M., Cmet, S., Lippe, G., & Mavelli, I. (2007). IF(1) distribution in HepG2 cells in relation to ecto-F(0)F (1)ATP synthase and calmodulin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(4), 291–300.
- Contreras, A. V., Torres, N., & Tovar, A. R. (2013). PPAR- $\alpha$  as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. *Advances in Nutrition*, 4(4), 439–452.
- Cooke, J. P. (2003). NO and angiogenesis. *Atherosclerosis Supplements*.
- Cortés-Hernández, P., Domínguez-Ramírez, L., Estrada-Bernal, A., Montes-Sánchez, D. G., Zentella-Dehesa, A., De Gómez-Puyou, M. T., ... García, J. J. (2005). The inhibitor protein of the F1F0-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3), 844–849.
- Couvert, P., & Carrié, A. (2011). Génétique et HDL : anomalies rares héréditaires. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 3(4), 254–257.
- Covey, S. D., Krieger, M., Wang, W., Penman, M., & Trigatti, B. L. (2003). Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(9), 1589–94.
- Daniil, G., Phedonos, A. A. P., Holleboom, A. G., Motazacker, M. M., Argyri, L., Kuivenhoven, J. A., & Chroni, A. (2011). Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apoA-I-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders. *Clinica Chimica Acta*, 412(13–14), 1213–1220.
- Dawson, P. A., Haywood, J., Craddock, A. L., Wilson, M., Tietjen, M., Kluckman, K., ... Parks, J. S. (2003). Targeted Deletion of the Ileal Bile Acid Transporter Eliminates Enterohepatic Cycling of Bile Acids in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 33920–33927.
- Dawson, P. A., Hubbert, M., Haywood, J., Craddock, A. L., Christian, W. V., & Ballatori, N. (2005). The Heteromeric Organic Solute Transporter  $\alpha$ - $\beta$ , Ost $\alpha$ -Ost $\beta$ , Is an Ileal Basolateral Bile Acid Transporter. *J Biol Chem*, 280(8), 6960–6968.
- de la Llera-Moya, M., Rothblat, G. H., Connelly, M. a, Kellner-Weibel, G., Sakr, S. W., Phillips, M. C., & Williams, D. L. (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *Journal of Lipid Research*, 40(3), 575–580.
- de Souza, J. A., Vindis, C., Nègre-Salvayre, A., Rye, K. A., Couturier, M., Therond, P., ... Kontush, A. (2010). Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial



- cells: Pivotal role of apolipoprotein A-I. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 608–620.
- Deckelbaum, R. J., Lees, R. S., Small, D. M., Hedberg, S. E., & Grundy, S. M. (1977). Failure of complete bile diversion and oral bile acid therapy in the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia. *The New England Journal of Medicine*, 296(9), 465–470.
- Deguchi, H., Fernández, J. A., & Griffin, J. H. (2002). Neutral glycosphingolipid-dependent inactivation of coagulation factor Va by activated protein C and protein S. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 8861–8865.
- Deguchi, H., Fernández, J. A., Pabinger, I., Heit, J. A., & Griffin, J. H. (2001). Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway. *Blood*, 97(7), 1907–1914.
- Deguchi, H., Pecheniuk, N. M., Elias, D. J., Averell, P. M., & Griffin, J. H. (2005). High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation*, 112(6), 893–899.
- Deguchi, H., Yegneswaran, S., & Griffin, J. H. (2004). Sphingolipids as Bioactive Regulators of Thrombin Generation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12036–12042.
- del Puerto, A., Díaz-Hernández, J.-I., Tapia, M., Gomez-Villafuertes, R., Benitez, M. J., Zhang, J., ... Garrido, J. J. (2012). Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 1), 176–88.
- Dijkers, A., Annema, W., de Boer, J. F., Iqbal, J., Hussain, M. M., & Tietge, U. J. F. (2014). Differential impact of hepatic deficiency and total body inhibition of MTP on cholesterol metabolism and RCT in mice. *Journal of Lipid Research*, 55(5), 816–25.
- Dijkers, A., & Tietge, U. J. F. (2010). Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World Journal of Gastroenterology*, 16(47), 5936–5945.
- Doggen, C. J. M., Smith, N. L., Lemaitre, R. N., Heckbert, S. R., Rosendaal, F. R., & Psaty, B. M. (2004). Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(10), 1970–1975.
- Duell, P., & Malinow, M. (1997). Homocyst(e)ine: an important risk factor for atherosclerotic vascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 8(1), 28–34.
- El Bouhassani, M., Gilibert, S., Moreau, M., Saint-Charles, F., Tréguier, M., Poti, F., ... Huby, T. (2011). Cholesteryl ester transfer protein expression partially attenuates the adverse effects of SR-BI receptor deficiency on cholesterol metabolism and atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17227–38.
- El Harchaoui, K., Arsenault, B. J., Franssen, R., Després, J.-P., Hovingh, G. K., Stroes, E. S. G., ... Boekholdt, S. M. (2009). High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Annals of Internal Medicine*, 150(2), 84–93.
- Elferink, R. P. J. O., Ottenhoff, R., Wijland, M. Van, Frijters, C. M. G., Nieuwkerk, C. Van, & Groen, A. K. (1996). Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdr2 P-glycoprotein. *J. Lipid Res.*, 37, 1065–1075.
- Empen, K., Lange, K., Stange, E. F., & Scheibner, J. (1997). Newly synthesized cholesterol in human bile and plasma: quantitation by mass isotopomer distribution analysis. *The American Journal of Physiology*, 272(2 Pt 1), G367-73.

- Espada, S., Ortega, F., Molina-Jijón, E., Rojo, A. I., Pérez-Sen, R., Pedraza-Chaverri, J., ... Cuadrado, A. (2010). The purinergic P2Y<sub>13</sub> receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(3), 416–426.
- Evans, R. W., Shaten, B. J., Hempel, J. D., Cutler, J. A., & Kuller, L. H. (1997). Homocyst(e)ine and Risk of Cardiovascular Disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(10), 1947–1953.
- Fabre, A. C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., ... Martinez, L. O. (2010). P2Y<sub>13</sub> receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(4), 1477–83.
- Faccenda, D., & Campanella, M. (2012). Molecular Regulation of the Mitochondrial F(1)F(o)-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF(1)). *International Journal of Cell Biology*, 2012, 367934.
- Fan, S.-L., Li, X., Chen, S.-J., & Qi, G.-X. (2014). ABCA1 rs4149313 Polymorphism and Susceptibility to Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. *Annals of Human Genetics*, 78(4), 264–76.
- Farnier, M., Bonnet, F., Bruckert, E., Ferrières, J., & Paillard, F. (2006). Quand proposer une association d'hypolipémiants chez un patient non à l'objectif thérapeutique sous monothérapie ?
- Favari, E., Gomaschi, M., Zanotti, I., Bernini, F., Lee-Rueckert, M., Kovanen, P. T., ... Calabresi, L. (2007). A unique protease-sensitive high density lipoprotein particle containing the apolipoprotein A-I(Milano) dimer effectively promotes ATP-binding Cassette A1-mediated cell cholesterol efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5125–32.
- Feng, Y., Eck, M. Van, Craeyveld, E. Van, Jacobs, F., Carlier, V., Linthout, S. Van, ... Elisa, H. A. (2009). Critical role of scavenger receptor-BI – expressing bone marrow – derived endothelial progenitor cells in the attenuation of allograft vasculopathy after human apo A-I transfer. *113(3)*, 755–764.
- Fielding, C. J., Shore, V. G., & Fielding, P. E. (1972). A protein cofactor of lecithin:Cholesterol acyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(4), 1493–1498.
- Fleisher, L. N., Tall, A. R., Witte, L. D., Miller, R. W., And, & Cannon, P. J. (1982). Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high- density lipoproteins. *J Biol Chem*, 257, 6653–6655.
- Fotakis, P., Kuivenhoven, J. A., Dafnis, E., Kardassis, D., & Zannis, V. I. (2015). The effect of natural LCAT mutations on the biogenesis of HDL. *Biochemistry*, 54(21), 3348–3359.
- Fox, C. S., Cupples, L. A., Chazaro, I., Polak, J. F., Wolf, P. a, D'Agostino, R. B., ... O'Donnell, C. J. (2004). Genomewide linkage analysis for internal carotid artery intimal medial thickness: evidence for linkage to chromosome 12. *American Journal of Human Genetics*, 74(2), 253–261.
- Franceschini, G., Calabresi, L., Chiesa, G., Parolini, C., Sirtori, C. R., Canavesi, M., & Bernini, F. (1999). Increased Cholesterol Efflux Potential of Sera From ApoA-I Milano Carriers and Transgenic Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(5), 1257–1262.

- Franceschini, G., Sirtori, C. R., Bosisio, E., Orsini, G. B., Mogavero, A. M., & Capurso, A. (1985). Relationship of the Phenotypic Expression of the Apoprotein with Plasma Lipid and A-I Milano Lipoprotein Patterns. *Atherosclerosis*, *58*, 159–174.
- Francis, G. a. (2010). The complexity of HDL. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1801*(12), 1286–93.
- Frikke-Schmidt, R. (2010). Genetic variation in the ABCA1 gene, HDL cholesterol, and risk of ischemic heart disease in the general population. *Atherosclerosis*.
- Fruchart, J.-C. (2013). Selective peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$  modulators (SPPARM $\alpha$ ): The next generation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -agonists. *Cardiovascular Diabetology*, *12*(1), 2–8.
- Ganesan, L. P., Mates, J. M., Cheplowitz, A. M., Avila, C. L., Zimmerer, J. M., Yao, Z., ... Anderson, C. L. (2016). Scavenger receptor B1, the HDL receptor, is expressed abundantly in liver sinusoidal endothelial cells. *Scientific Reports*, *6*(February), 20646.
- García-Miranda, P., Peral, M. J., & Ilundain, a a. (2010). Rat small intestine expresses the reelin-Disabled-1 signalling pathway. *Experimental Physiology*, *95*, 498–507.
- Garcia, A., Barbaras, R., Collet, X., Bogyo, A., Chap, H., & Perret, B. (1996). High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry*, *35*(40), 13064–13071.
- Garner, B., Waldeck, A. R., Witting, P. K., Rye, K., Stocker, R., & Biol, F. R. (1998). Oxidation of High Density Lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII, *273*(11), 6088–6095.
- Gautier, T., Masson, D., & Lagrost, L. (2016). The potential of cholesteryl ester transfer protein as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *20*(1), 47–59.
- Gebhard, C., Rhains, D., & Tardif, J. C. (2015). HDL and cardiovascular risk: Is cholesterol in particle subclasses relevant? *European Heart Journal*.
- Genoux, A., Lichtenstein, L., Ferrières, J., Duparc, T., Bongard, V., Vervueren, P.-L., ... Martinez, L. O. (2016). Serum levels of mitochondrial inhibitory factor 1 are independently associated with long-term prognosis in coronary artery disease: the GENES Study. *BMC Medicine*, *14*(1), 125.
- Genoux, A., Pons, V., Radojkovic, C., Roux-Dalvai, F., Combes, G., Rolland, C., ... Martinez, L. O. (2011). Mitochondrial inhibitory factor 1 (IF1) is present in human serum and is positively correlated with HDL-cholesterol. *PloS One*, *6*(9), e23949.
- Genoux, A., Ruidavets, J.-B., Ferrières, J., Combes, G., Lichtenstein, L., Pons, V., ... Martinez, L. O. (2013). Serum IF1 concentration is independently associated to HDL levels and to coronary heart disease: the GENES study. *Journal of Lipid Research*, *54*(9), 2250–2258.
- Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J. L., Steinberg, D., & Quehenberger, O. (2001). Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, *42*(9), 1474–1482.
- Ginsberg, H. N. (2011). The ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) Lipid trial: what we learn from subgroup analyses. *Diabetes Care*, *34 Suppl 2*, S107-8.
- Giorgio, V., Bisetto, E., Franca, R., Harris, D. A., Passamonti, S., & Lippe, G. (2010). The ectopic FOF1 ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor

- protein IF1. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 42(2), 117–123.
- Girotti, A. W. (2009). Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action., 44(6), 956–968.
- Goffinet, M., Tardy, C., Boubekeur, N., Cholez, G., Bluteau, A., Oniciu, D. C., ... Baron, R. (2014). P2Y13 receptor regulates HDL metabolism and atherosclerosis in vivo. *PLoS ONE*, 9(4).
- Goldberg, D. I., Beltz, W. F., & Pittman, R. C. (1991). Evaluation of pathways for the cellular uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in rabbits. *Journal of Clinical Investigation*, 87(1), 331–346.
- Goldfine, A. B., Sanjay, K., & Hiatt, W. R. (2011). Fibrates in the Treatment of Dyslipidemias-Time for a Reassessment. *The New England Journal of Medicine*, 481–484.
- Gonzalez, C. R., Vallcaneras, S. S., Calandra, R. S., & Gonzalez Calvar, S. I. (2013). Involvement of KLF14 and egr-1 in the TGF-beta1 action on Leydig cell proliferation. *Cytokine*, 61(2), 670–675.
- Goyal, J., Wang, K., Liu, M., & Subbaiah, P. V. (1997). Novel Function of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation, 272(26), 16231–16239.
- Green, D. W., & Grover, G. J. (2000). The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1458(2–3), 343–55.
- Griffin, J. H., Kojima, K., Banka, C. L., Curtiss, L. K., & Fernández, J. A. (1999). High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 219–227.
- Grundy, S. M. (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Ann. Rev. Nutr*, 3, 71–96.
- Guendouzi, K., Collet, X., Perret, B., Chap, H., & Barbaras, R. (1998). Remnant high density lipoprotein particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG2). *Biochemistry*, 37, 14974–14980.
- Haase, C. L., Tybjærg-Hansen, A., Qayyum, A. A., Schou, J., Nordestgaard, B. G., & Frikke-Schmidt, R. (2012). LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(2), E248-56.
- Hafiane, A., & Genest, J. (2015). High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clinical*, 3, 175–188.
- Hansson, G. K., Robertson, A.-K. L., & Söderberg-Nauclér, C. (2006). Inflammation and Atherosclerosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), 297–329.
- Harrison, S. C., Holmes, M. V., & Humphries, S. E. (2012). Mendelian randomisation, lipids, and cardiovascular disease. *Lancet*, 380(9841), 543–5.
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2008). Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart*, 94(997), 704–14.
- Heid, I. M., Boes, E., Müller, M., Kollerits, B., Lamina, C., Coassin, S., ... Kronenberg, F. (2008). Genome-wide association analysis of high-density lipoprotein cholesterol in the

- population-based KORA study sheds new light on intergenic regions. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 1(1), 10–20.
- Hellman, B. L., Rosenfeld, R. S., Eidinoff, M. L., Fukushima, D. K., Gallagher, T. F., Wang, C., & Adlersberg, D. (1955). Isotopic studies of plasma cholesterol of endogenous and exogenous origins. *J.Clin.Invest*, 34(7), 48–60.
- Henkel, A. S., Kavesh, M. H., Kriss, M. S., Dewey, A. M., Rinella, M. E., & Green, R. M. (2011). Hepatic overexpression of abcb11 promotes hypercholesterolemia and obesity in mice. *Gastroenterology*, 141(4), 1404–1411.e2.
- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., & Stanley, K. K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *The EMBO Journal*, 7(13), 4119–4127.
- Hobbs, H. H., & Rader, D. J. (1999). ABC1: Connecting yellow tonsils, neuropathy, and very low HDL. *Journal of Clinical Investigation*, 104(8), 1015–1017.
- Hoekstra, M., van Berkel, T. J. C., & van Eck, M. (2010). Scavenger receptor BI: A multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World Journal of Gastroenterology*.
- Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., Bogaerts, K., Beyens, G., Verhaeghe, R., ... Werf, F. Van De. (2001). Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease, (Ldl), 844–848.
- Hong, S. H., Kim, Y.-R., Yoon, Y. M., Min, W. K., Chun, S. Il, & Kim, J. Q. (2002). Association between Haelll polymorphism of scavenger receptor class B type I gene and plasma HDL-cholesterol concentration. *Annals of Clinical Biochemistry*, 39(Pt 5), 478–481.
- Hopkins, G. J., & Barter, P. J. (1980). Transfers of esterified cholesterol and triglyceride between high density and very low density lipoproteins: In vitro studies of rabbits and humans. *Metabolism*, 29(6), 546–550.
- Hu, Z., Shen, W.-J., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2012). MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class B type I in steroidogenic cells. *Molecular and Cellular Biology*, 32(24), 5035–45.
- Huang, C., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, J., & Bao, J. (2013). MCP-1 impacts RCT by repressing ABCA1, ABCG1, and SR-BI through PI3K/Akt posttranslational regulation in HepG2 cells. *Journal of Lipid Research*, 54, 1231–1240.
- Huang, W. M., Gowda, M., & Donnelly, J. G. (2009). Bile acid ratio in diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *American Journal of Perinatology*, 26(4), 291–294.
- Huang, W., Sasaki, J., Matsunaga, A., Nanimatsu, H., Moriyama, K., Han, H., ... Arakawa, K. (1998). A Novel Homozygous Missense Mutation in the Apo A-I Gene With Apo A-I Deficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(3), 389–396.
- Huby, T., Doucet, C., Dachet, C., Ouzilleau, B., Ueda, Y., Afzal, V., ... Lesnik, P. (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues, 116(10), 2767–2776.
- Huuskonen, J., Olkkonen, V. M., Jauhiainen, M., & Ehnholm, C. (2001). The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 155(2), 269–81.

- Igarashi, J., & Michel, T. (2008). S1P and eNOS regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., ... Inoue, K. (2000). Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(12), 6538–6543.
- Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J., Takata, K., ... Tall, A. R. (1990). Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *The New England Journal of Medicine*, *323*(18), 1234–8.
- Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P. K., Herz, J., & Russell, D. W. (1996). Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(30), 18017–23.
- Ishikawa, T., Fidge, N., Thelle, D. S., Førde, O. H., & Miller, N. E. (1978). The Tromsø Heart Study: serum apolipoprotein AI concentration in relation to future coronary heart disease. *European Journal of Clinical Investigation*, *8*(3), 179–182.
- Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L. O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., ... Barbaras, R. (2005). The nucleotide receptor P2Y<sub>13</sub> is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *62*(21), 2508–2515.
- Jakulj, L., Vissers, M. N., van Roomen, C. P., van der Veen, J. N., Vrans, C. L. J., Kunne, C., ... Groen, A. K. (2010). Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Letters*, *584*(16), 3625–3628.
- Jeyarajah, E. J., Cromwell, W. C., & Otvos, J. D. (2006). Lipoprotein Particle Analysis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Clinics in Laboratory Medicine*.
- Ji, A., Meyer, J. M., Cai, L., Akinmusire, A., de Beer, M. C., Webb, N. R., & van der Westhuyzen, D. R. (2011). Scavenger receptor SR-BI in macrophage lipid metabolism. *Atherosclerosis*, *217*(1), 106–12.
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., De, M., Moya, L., ... Tall, A. R. (1997). Scavenger Receptor B1 Promotes High Density Lipoprotein-mediated Cholesterol Efflux. *Biochemistry*, *(10)*, 20982–20985.
- Ji, Y., Wang, N., Ramakrishnan, R., Sehayek, E., Huszar, D., Breslow, J. L., & Tall, a R. (1999). Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(47), 33398–402.
- Jian, B., de la Llera-Moya, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M. C., Swaney, J. B., ... Rothblat, G. H. (1998). Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J. Biol. Chem.*, *273*(10), 5599–5606.
- Johannsen, T. H., Frikke-Schmidt, R., Schou, J., Nordestgaard, B. G., & Tybjaerg-Hansen, A. (2012). Genetic inhibition of CETP, ischemic vascular disease and mortality, and possible adverse effects. *Journal of the American College of Cardiology*, *60*(20), 2041–2048.
- Johnson, M. S. C., Johansson, J. M., Svensson, P. A., Åberg, M. A. I., Eriksson, P. S., Carlsson, L. M. S., & Carlsson, B. (2003). Interaction of scavenger receptor class B type I with peroxisomal targeting receptor Pex5p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *312*(4), 1325–1334.
- Johnson, M. S., Svensson, P. a, Helou, K., Billig, H., Levan, G., Carlsson, L. M., & Carlsson, B.

- (1998). Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinology*, *139*(1), 72–80.
- Jun, M., Foote, C., Lv, J., Neal, B., Patel, A., Nicholls, S. J., ... Perkovic, V. (2010). Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, *375*(9729), 1875–1884.
- Karackattu, S. L., Trigatti, B., & Krieger, M. (2006). Hepatic lipase deficiency delays atherosclerosis, myocardial infarction, and cardiac dysfunction and extends lifespan in SR-BI/apolipoprotein E double knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(3), 548–554.
- Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burt, N. P., Rieder, M. J., ... Orholm, M. (2008). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nature Genetics*, *40*(2), 189–97.
- Kathiresan, S., Voight, B. F., Purcell, S., Musunuru, K., Ardissino, D., Mannucci, P. M., ... Siscovick, D. (2009). Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature Genetics*, *41*(3), 334–41.
- Keech, A., Simes, R., Barter, P., Best, J., Scott, R., Taskiran, M., ... FIELD study investigators. (2005). Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *The Lancet*, *366*(9500), 1849–1861.
- Khera, A. V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M. F., Jafri, K., ... Daniel J. Rader, M. (2011). Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, *364*(2), 127–135.
- Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., ... Okajima, F. (2003). High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *23*(7), 1283–1288.
- Kimura, T., Tomura, H., Mogi, C., Kuwabara, A., Damirin, A., Ishizuka, T., ... Okajima, F. (2006). Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37457–37467.
- Kimura, T., Tomura, H., Sato, K., Ito, M., Matsuoka, I., Im, D. S., ... Okajima, F. (2010). Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(7), 4387–4397.
- Kirchgesner, T. G., Sleph, P., Ostrowski, J., Kick, E., Lee, J., Frost, R. J. A., ... Kick, E. (2016). Clinical and Translational Report Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils Clinical and Translational Report Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and. *Cell Metabolism*, *24*(2), 223–233.
- Kitahara, M., Takamine, F., Imamura, T., & Benno, Y. (2001). *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylating activity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(1), 39–44.

- Kobayashi, K., Yamanaka, H., Yanamoto, F., Okubo, M., & Noguchi, K. (2012). Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*, *60*(10), 1529–39.
- Kocher, O., & Krieger, M. (2009). Role of the adaptor protein PDZK1 in controlling the HDL receptor SR-BI. *Current Opinion in Lipidology*, *20*(3), 236–241.
- Kocher, O., Yesilaltay, A., Cirovic, C., Pal, R., Rigotti, A., & Krieger, M. (2003). Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(52), 52820–52825.
- Kontush, A., & Chapman, M. J. (2006). Functionally defective high-density lipoprotein : a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia , inflammation , and atherosclerosis. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 342–374.
- Kontush, A., & Chapman, M. J. (2011). *High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function, and Therapeutics*. *High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function, and Therapeutics*. John Wiley & Sons.
- Kontush, A., Lhomme, M., & Chapman, M. J. (2013). Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *Journal of Lipid Research*, *54*(11), 2950–63.
- Kotosai, M., Shimada, S., Kanda, M., Matsuda, N., Sekido, K., Shimizu, Y., ... Terao, J. (2013). Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: A mechanism for its antioxidant ability. *Lipids*, *48*(6), 569–578.
- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R., & Krieger, M. (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*.
- Kral, B. G., & Becker, D. M. (2007). Familial occurrence of abnormalities of high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Lipidol*, *1*(1), 31–40.
- Krieger, M. (1999). Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annual Review of Biochemistry*, 523–558.
- Krieger, M. (2001). Scavenger receptor class b type I is a multiligand hdl receptor that influences diverse physiologic systems. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(6), 793–797.
- Kruit, J. K., Plösch, T., Havinga, R., Boverhof, R., Groot, P. H. E., Groen, A. K., & Kuipers, F. (2005). Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology*, *128*(1), 147–156.
- Kunnen, S., & Van Eck, M. (2012). Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *The Journal of Lipid Research*, *53*(9), 1783–1799.
- Lam, P., Wang, R., & Ling, V. (2005). Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry*, *44*(37), 12598–12605.
- Larrede, S., Quinn, C. M., Jessup, W., Frisdal, E., Olivier, M., Hsieh, V., ... Le Goff, W. (2009). Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(11), 1930–1936.



- Lavigne, P. M., & Karas, R. H. (2013). The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: A systematic review and meta-regression. *Journal of the American College of Cardiology*.
- Le May, C., Berger, J. M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., ... Costet, P. (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *33*(7), 1484–1493.
- Lee, J.-Y., & Parks, J. S. (2005). ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Current Opinion in Lipidology*.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., & Staels, B. (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological Reviews*, *89*(1), 147–191.
- Lehrke, M., Leberherz, C., Millington, S. C., Guan, H. P., Millar, J., Rader, D. J., ... Lazar, M. A. (2005). Diet-dependent cardiovascular lipid metabolism controlled by hepatic LXRA. *Cell Metabolism*, *1*(5), 297–308.
- Leiva, A., Verdejo, H., Benítez, M. L., Martínez, A., Busso, D., & Rigotti, A. (2011). Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis*.
- Levitan, I., Volkov, S., & Subbaiah, P. V. (2010). Oxidized LDL : Diversity, patterns of recognition and pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, *13*(1), 39–75.
- Lewis, G. F., & Rader, D. J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research*, *96*(12), 1221–1232.
- Liang, H. Q., Rye, K. A., & Barter, P. J. (1994). Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, *35*(7), 1187–99.
- Libby, P. (2008). The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, *263*(5), 517–527.
- Lichtenstein, L., Serhan, N., Annema, W., Combes, G., Robaye, B., Boeynaems, J.-M., ... Martinez, L. O. (2013). Lack of P2Y13 in mice fed a high cholesterol diet results in decreased hepatic cholesterol content, biliary lipid secretion and reverse cholesterol transport. *Nutrition & Metabolism*, *10*(1), 67.
- Lichtenstein, L., Serhan, N., Espinosa-Delgado, S., Fabre, A., Annema, W., Tietge, U. J. F., ... Martinez, L. O. (2015). Increased atherosclerosis in P2Y13/apolipoprotein E double-knockout mice: contribution of P2Y13 to reverse cholesterol transport. *Cardiovascular Research*, *106*(2), 314–323.
- Lim, H. Y., Thiam, C. H., Yeo, K. P., Bisoendial, R., Hii, C. S., McGrath, K. C. Y., ... Angeli, V. (2013). Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-Mediated transport of HDL. *Cell Metabolism*, *17*(5), 671–684.
- Linsel-Nitschke, P., & Tall, A. R. (2005). HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *4*(3), 193–205.
- Lopez, D., & McLean, M. P. (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology*, *140*(12), 5669–5681.
- Lopez, D., & McLean, M. P. (2006). Estrogen regulation of the scavenger receptor class B

- gene: Anti-atherogenic or steroidogenic, is there a priority? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 247(1–2), 22–33.
- Lopez, D., Sandhoff, T. W., & McLean, M. P. (1999). Steroidogenic factor-1 mediates cyclic 3',5'-adenosine monophosphate regulation of the high density lipoprotein receptor. *Endocrinology*, 140(7), 3034–3044.
- Lopez, D., Shea-Eaton, W., Sanchez, M. D., & Mclean, M. P. (2001). DAX-1 represses the high-density lipoprotein receptor through interaction with positive regulators sterol regulatory element-binding protein-1a and steroidogenic factor-1. *Endocrinology*, 142(12), 5097–5106.
- Mackness, M. I., Arrol, S., & Durrington, P. N. (1991). Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein, 286(1), 2–4.
- Malaval, C., Laffargue, M., Barbaras, R., Rolland, C., Peres, C., Champagne, E., ... Martinez, L. O. (2009). RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cellular Signalling*, 21(1), 120–7.
- Malerod, L., Juvet, L., Hanssen-Bauer, A., Eskild, W., & Berg, T. (2002). Oxysterol-activated LXRA/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(5), 916–23.
- Malerod, L., Sporstol, M., Juvet, L. K., Mousavi, A., Gjoen, T., & Berg, T. (2003). Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 305(3), 557–565.
- Malle, E., Steinmetz, A., & Raynes, J. G. (1993). Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis*, 102(2), 131–146.
- Mani, P., & Rohatgi, A. (2015). Niacin Therapy, HDL Cholesterol, and Cardiovascular Disease: Is the HDL Hypothesis Defunct? *Curr.Atheroscler.Rep.*, 17(1534–6242 (Electronic)), 521.
- Manichaikul, A., Naj, A., Herrington, D., Post, W., Rich, S., & Rodriguez, A. (2012). Association of SCARB1 variants with subclinical atherosclerosis and incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 32(8), 1991–9.
- Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., ... Rigotti, a. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 42(2), 170–80.
- Marquart, T. J., Wu, J., Lusic, A. J., & Baldán, Á. (2013). Anti-miR-33 therapy does not alter the progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(3), 455–458.
- Marshall, S. M., Gromovsky, A. D., Kelley, K. L., Davis, M. A., Wilson, M. D., Lee, R. G., ... Temel, R. E. (2014). Acute sterol O-acyltransferase 2 (SOAT2) knockdown rapidly mobilizes hepatic cholesterol for fecal excretion. *PLoS ONE*, 9(6), 1–10.
- Marshall, S. M., Kelley, K. L., Davis, M. A., Wilson, M. D., McDaniel, A. L., Lee, R. G., ... Temel, R. E. (2014). Reduction of VLDL secretion decreases cholesterol excretion in niemann-pick C1-like 1 hepatic transgenic mice. *PLoS ONE*, 9(1), 1–9.
- Martinez, L. O., Esteve, J., Champagne, E., Pineau, T., Rolland, C., Cabezo, E., ... Barbaras, R. (2003). Ectopic b-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL

endocytosis, *1*, 75–79.

- Martinez, L. O., Georgeaud, V., Rolland, C., Collet, X., Tercé, F., Perret, B., & Barbaras, R. (2000). Characterization of two high-density lipoprotein binding sites on porcine hepatocyte plasma membranes: Contribution of scavenger receptor class B type I (SR-BI) to the low-affinity component. *Biochemistry*, *39*(5), 1076–1082.
- Masson, D., Koseki, M., Ishibashi, M., Larson, C. J., Miller, S. G., King, B. D., & Tall, A. R. (2009). Increased HDL cholesterol and ApoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(12), 2054–2060.
- Matsuo, Y., Miura, S. ichiro, Kawamura, A., Uehara, Y., Rye, K. A., & Saku, K. (2007). Newly developed reconstituted high-density lipoprotein containing sphingosine-1-phosphate induces endothelial tube formation. *Atherosclerosis*, *194*(1), 159–168.
- Maugeais, C., Tietge, U. J. F., Broedl, U. C., Marchadier, D., Cain, W., McCoy, M. G., ... Rader, D. J. (2003). Dose-Dependent Acceleration of High-Density Lipoprotein Catabolism by Endothelial Lipase. *Circulation*, *108*(17), 2121–2126.
- Mazer, N. A., & Martin, C. (1984). Mathematical model of biliary lipid secretion : a quantitative analysis of physiological and biochemical data from man and other species. *J. Lipid Res.*, *25*, 932–953.
- McCarthy, J. J., Lehner, T., Reeves, C., Moliterno, D. J., Newby, L. K., Rogers, W. J., & Topol, E. J. (2003). Association of genetic variants in the HDL receptor, SR-B1, with abnormal lipids in women with coronary artery disease. *Journal of Medical Genetics*, *40*(6), 453–458.
- McNeish, J., Aiello, R. J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., ... Francone, O. L. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(8), 4245–50.
- McQueen, M. J., Hawken, S., Wang, X., Ounpuu, S., Sniderman, A., Probstfield, J., ... Yusuf, S. (2008). Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *The Lancet*, *372*(9634), 224–233.
- Meisinger, C., Baumert, J., Khuseyinova, N., Loewel, H., & Koenig, W. (2005). Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation*, *112*(5), 651–657.
- Mendoza, G. V, Siewert, S., González, I., Vedova, M. C. Della, Fernandez, G., & Ojeda, M. S. (2013). Hyperglycemia promotes overexpression of SR-BII isoform of the scavenger receptor class B type I in type 2 diabetes mellitus : A study in Juana Koslay City, San Luis Argentina. *Journal of Diabetes Mellitus*, *3*(4), 172–183.
- Miller, N. E., Thelle, D. S., Forde, O. H., & Mjos, O. D. (1977). The Tromsø heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet*, *1*(8019), 965–8.
- Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., & Shaul, P. W. (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation Research*, *98*(11), 1352–64.
- Mineo, C., & Shaul, P. W. (2012). Novel biological functions of high-density lipoprotein

- cholesterol. *Circulation Research*, 111(8), 1079–1090.
- Mineo, C., Yuhanna, I. S., Quon, M. J., & Shaul, P. W. (2003). High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9142–9149.
- Mora, S., Otvos, J. D., Rifai, N., Rosenson, R. S., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2009). Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation*, 119(7), 931–939.
- Moriyama, Y., Okamura, T., Inazu, A., Doi, M., Iso, H., Mouri, Y., ... Komachi, Y. (1998). A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Preventive Medicine*, 27(5 Pt 1), 659–667.
- Morrison, J. R., McPherson, G. a, & Fidge, N. H. (1992). Evidence for two sites on rat liver plasma membranes which interact with high density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19), 13205–9.
- Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Højrup, P., Everitt, L., ... Pizzo, S. V. (1999). Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2811–2816.
- Mott, S., Yu, L., Marcil, M., Boucher, B., Rondeau, C., & Genest, J. (2000). Decreased cellular cholesterol efflux is a common cause of familial hypoalphalipoproteinemia: Role of the ABCA1 gene mutations. *Atherosclerosis*, 152(2), 457–468.
- Murphy, A. J., Bijl, N., Yvan-Charvet, L., Welch, C. B., Bhagwat, N., Rehemian, A., ... Wang, N. (2013). Cholesterol efflux in megakaryocyte progenitors suppresses platelet production and thrombocytosis. *Nature Medicine*, 19(5), 586–594.
- Murphy, A. J., Woollard, K. J., Hoang, A., Mukhamedova, N., Stirzaker, R. A., McCormick, S. P. A., ... Chin-Dusting, J. (2008). High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), 2071–2077.
- Murphy, A. J., Woollard, K. J., Suhartoyo, A., Stirzaker, R. A., Shaw, J., Sviridov, D., & Chin-Dusting, J. P. F. (2011). Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(6), 1333–1341.
- Naik, S. U., Wang, X., Da Silva, J. S., Jaye, M., Macphee, C. H., Reilly, M. P., ... Rader, D. J. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*, 113(1), 90–97.
- Naj, A. C., West, M., Rich, S. S., Post, W., Kao, W. H., Wasserman, B. A., ... Rodriguez, A. (2010). Association of scavenger receptor class B type I polymorphisms with subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet*, 3(1), 47–52.
- Navab, M., Ananthramaiah, G. M., Reddy, S. T., Lenten, B. J. Van, Ansell, B. J., Fonarow, G. C., ... Fogelman, A. M. (2004). Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of Lipid Research*, 45(6), 993–1007.

- Navab, M., Hama, S. Y., Anantharamaiah, G. M., Hassan, K., Hough, G. P., Watson, a D., ... Fogelman, a M. (2000a). Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of Lipid Research*, 41(9), 1495–1508.
- Navab, M., Hama, S. Y., Anantharamaiah, G. M., Hassan, K., Hough, G. P., Watson, a D., ... Fogelman, a M. (2000b). Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *Journal of Lipid Research*, 41(9), 1495–1508.
- Nguyen, T. M., Sawyer, J. K., Kelley, K. L., Davis, M. a, Kent, C. R., & Rudel, L. L. (2012). Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *Journal of Lipid Research*, 53(8), 95–104.
- Nicholls, S. J. (2012). Is niacin ineffective? Or did AIM-HIGH miss its target? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 79(1), 38–43.
- Niemeier, A., Kovacs, W. J., Strobl, W., & Stangl, H. (2009). Atherogenic diet leads to posttranslational down-regulation of murine hepatocyte SR-BI expression. *Atherosclerosis*, 202(1), 169–175.
- Nijstad, N., Gautier, T., Briand, F., Rader, D. J., & Tietge, U. J. F. (2011). Biliary sterol secretion is required for functional in vivo reverse cholesterol transport in mice. *Gastroenterology*, 140(3), 1043–1051.
- Nock, N. L., & Chandran Pillai, A. L. P. (2009). *Dyslipidemia : genetics and role in the metabolic syndrome*.
- Nofer, J. R., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., Von Eckardstein, A., ... Assmann, G. (2001). Suppression of Endothelial Cell Apoptosis by High Density Lipoproteins (HDL) and HDL-associated Lysosphingolipids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34480–34485.
- Nofer, J. R., Van Der Giet, M., Tölle, M., Wolinska, I., Von Wnuck Lipinski, K., Baba, H. A., ... Levkau, B. (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 569–581.
- Nofer, J., Walter, M., Kehrel, B., Wierwille, S., & Tepel, M. (1998). HDL3 -Mediated Inhibition of Thrombin-Induced Platelet Aggregation and Fibrinogen Binding Occurs via Decreased Production of Phosphoinositide-Derived Second Messengers 1,2-Diacylglycerol and Inositol 1,4,5-tris-Phosphate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 861–869.
- O’Connell, B. J., & Genest, J. (2001). High-Density Lipoproteins and Endothelial Function. *Circulation*, 104(16), 1978–1983.
- Okajima, F., Sato, K., & Kimura, T. (2009). Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I. *Endocrine Journal*, 56(3), 317–34.
- Oram, J. F., & Vaughan, A. M. (2006). ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 99(10), 1031–1043.
- Orriss, I., Syberg, S., Wang, N., Robaye, B., Gartland, A., Jorgensen, N., ... Boeynaems, J. M. (2011). Bone phenotypes of P2 receptor knockout mice. *Frontiers in Bioscience (Scholar*

- Edition*), 3(October 2015), 1038–1046.
- Orsó, E., Broccardo, C., Kaminski, W. E., Böttcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., ... Schmitz, G. (2000). Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nature Genetics*, 24(february), 192–196.
- Otvos, J. D., Collins, D., Freedman, D. S., Shalurova, I., Schaefer, E. J., McNamara, J. R., ... Robins, S. J. (2006). Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the veterans affairs high-density lipoprotein intervention trial. *Circulation*, 113(12), 1556–1563.
- Out, R., Hoekstra, M., de Jager, S. C. a, de Vos, P., van der Westhuyzen, D. R., Webb, N. R., ... Van Berkel, T. J. C. (2005). Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice. *Journal of Lipid Research*, 46(6), 1172–81.
- Panzenböck, U., & Stocker, R. (2005). Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1703(2), 171–181.
- Pearson, T. a, & Manolio, T. a. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 299(11), 1335–44.
- Pons, V., Serhan, N., Gayral, S., Malaval, C., Nauze, M., Malet, N., ... Martinez, L. O. (2014). Role of the ubiquitin-proteasome system in the regulation of P2Y 13 receptor expression: Impact on hepatic HDL uptake. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(9), 1775–1788.
- Pramfalk, C., Angelin, B., Eriksson, M., & Parini, P. (2007). Cholesterol regulates ACAT2 gene expression and enzyme activity in human hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(2), 402–409.
- Pullman, M. E., & Monroy, G. C. (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 238(11), 3762–3769.
- Qi, Y., Fan, J., Liu, J., Wang, W., Wang, M., Sun, J., ... Zhao, D. (2015). Cholesterol-overloaded HDL particles are independently associated with progression of carotid atherosclerosis in a cardiovascular disease-free population: A community-based cohort study. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(4), 355–363.
- Qian, Z., Gelzer-Bell, R., Yang Sx, S. X., Cao, W., Ohnishi, T., Wasowska, B. a, ... Lowenstein, C. J. (2001). Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection. *Circulation*, 104(19), 2369–2375.
- Rader, D. J. (2016). New therapeutic approaches to the treatment of dyslipidemia. *Cell Metabolism*, 23(3), 405–412.
- Rader, D. J., & DeGoma, E. M. (2014). Future of cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Annual Review of Medicine*, 65, 385–403.
- Radojkovic, C., Genoux, A., Pons, V., Combes, G., De Jonge, H., Champagne, E., ... Martinez, L. O. (2009). Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(7), 1125–1130.
- Rajaram OV, B. P. (1986). Increases in the particle size of high-density lipoproteins induced

- by purified lecithin: cholesterol acyltransferase: effect of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.*, 877(3), 406–414.
- Rämet, M. E., Rämet, M., Lu, Q., Nickerson, M., Savolainen, M. J., Malzone, A., & Karas, R. H. (2003). High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(12), 2288–2297.
- Rayner, K. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., McDaniel, A. L., Marshall, S. M., van Gils, J. M., ... Moore, K. J. (2011). Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*, 478(7369), 404–7.
- Rayner, K. J., Sheedy, F. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., Temel, R. E., Parathath, S., ... Moore, K. J. (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2921–2931.
- Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Michael, L., Tamehiro, N., ... Moore, K. J. (2010). MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Science*, 328(5985), 1570–1573.
- Remaley, A. T., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2014). Novel concepts in HDL pharmacology. *Cardiovascular Research*.
- Ridker, P. M., Paré, G., Parker, A. N., Zee, R. Y. L., Miletich, J. P., & Chasman, D. I. (2009). Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction genome-wide analysis among 18 245 initially healthy women from the women's genome health study. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(1), 26–33.
- Rigotti, a, Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., & 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12610–5.
- Ritsch, A., Sonderegger, G., Sonderegger, G., Sandhofer, A., Stanzl, U., Stanzl, U., ... Patsch, J. R. (2007). Scavenger receptor class B type I polymorphisms and peripheral arterial disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 56(8), 1135–41.
- Robins, S. J., & Armstrong, M. J. (1976). Biliary lecithin secretion. II. Effects of dietary choline and biliary lecithin synthesis. *Gastroenterology*, 70(3), 397–402.
- Robins, S. J., & Fasulo, J. M. (1997). High density lipoproteins, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *Journal of Clinical Investigation*, 99(3), 380–384.
- Rodriguez-Esparragon, F., Rodriguez-Perez, J. C., Hernandez-Trujillo, Y., Macias-Reyes, A., Medina, A., Caballero, A., & Ferrario, C. M. (2005). Allelic variants of the human scavenger receptor class B type 1 and paraoxonase 1 on coronary heart disease: genotype-phenotype correlations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(4), 854–860.
- Rodrigueza, W. V., Thuahnai, S. T., Temel, R. E., Lund-katz, S., Michael, C., Williams, D. L., & Phillips, M. C. (1999). Mechanism of Scavenger Receptor Class B Type I-mediated Selective Uptake of Cholesteryl Esters from High Density Lipoprotein to Adrenal Cells, 274(29), 20344–20350.
- Rohrer, L., Cavelier, C., Fuchs, S., Schlüter, M. A., Völker, W., & von Eckardstein, A. (2006). Binding, internalization and transport of apolipoprotein A-I by vascular endothelial cells.

*Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(2), 186–194.

- Rohrer, L., Ohnsorg, P. M., Lehner, M., Landolt, F., Rinninger, F., & Von Eckardstein, A. (2009). High-density lipoprotein transport through aortic endothelial cells involves scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter G1. *Circulation Research*, 104(10), 1142–1150.
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Chapman, M. J., Fazio, S., Hussain, M. M., Kontush, A., ... Schaefer, E. J. (2011). HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clinical Chemistry*, 57(3), 392–410.
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Davidson, W. S., Fayad, Z. A., Fuster, V., Goldstein, J., ... Yvan-Charvet, L. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, 125(15), 1905–1919.
- Rosenson, R. S., Otvos, J. D., & Freedman, D. S. (2002). Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC-I) trial. *American Journal of Cardiology*, 90(2), 89–94.
- Rottiers, V., Obad, S., Petri, A., Mcgarrah, R., Marie, W., Black, J. C., ... Näär, A. M. (2013). Pharmacological inhibition of a microRNA family in non-human primates by a seed-targeting 8-mer antimiR. *Sci Transl Med*, 5(212), ra162.
- Sabatti, C., Service, S. K., Hartikainen, A.-L., Pouta, A., Ripatti, S., Brodsky, J., ... Peltonen, L. (2009). Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nature Genetics*, 41(1), 35–46.
- Sahebkar, A., Chew, G. T., & Watts, G. F. (2014). New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15(4), 493–503.
- Saleheen, D., Scott, R., Javad, S., Zhao, W., Rodrigues, A., Picataggi, A., ... Rader, D. J. (2015). Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 3, 507–513.
- Santamarina-Fojo, S., González-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., & Nong, Z. (2004). Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(10), 1750–1754.
- Savel, J., Lafitte, M., Pucheu, Y., Pradeau, V., Tabarin, A., & Couffignal, T. (2012). Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship--a review of LCAT deficiency. *Vascular Health and Risk Management*, 8, 357–61.
- Schaefer, E. J., Zech, L. A., Schwartz, D. E., & Brewer, H. B. (1980). Coronary heart disease prevalence and other clinical features in familial high-density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Annals of Internal Medicine*, 93(2), 261–266.
- Schoonjans, K., Annicotte, J. S., Huby, T., Botrugno, O. A., Fayard, E., Ueda, Y., ... Auwerx, J. (2002). Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO Reports*.
- Schulte, C., Molz, S., Appelbaum, S., Karakas, M., Ojeda, F., Lau, D. M., ... Zeller, T. (2015). miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with



- Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS ONE*, 10(12), e0145930.
- Schwartz, C. C., Berman, M., Vlahcevic, Z. R., Halloran, L. G., Gregory, D. H., & Swell, L. (1978). Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man. Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursor sites. *Journal of Clinical Investigation*, 61(2), 408–423.
- Schwartz, C. C., Halloran, L. G., Vlahcevic, Z. R., Gregory, D. H., & Swell, L. (1978). Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science (New York, N.Y.)*, 200(4337), 62–4.
- Schwarz, M., Russell, D. W., Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (1998). Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, 39, 1833–1843.
- Schwedhelm, E., Bartling, A., Lenzen, H., Tsikas, D., Maas, R., Brümmer, J., ... Böger, R. H. (2004). Urinary 8-iso-Prostaglandin F $_{2\alpha}$  as a Risk Marker in Patients with Coronary Heart Disease: A Matched Case-Control Study. *Circulation*, 109(7), 843–848.
- Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A. K., Gibson, L. L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K. L., ... Shaul, P. W. (2006). High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circulation Research*, 98(1), 63–72.
- Sehayek, E., Ono, J. G., Shefer, S., Nguyen, L. B., Wang, N., Batta, a K., ... Breslow, J. L. (1998). Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 10194–9.
- Serfaty-Lacrosniere, C., Civeira, F., Lanzberg, A., Isaia, P., Berg, J., Janus, E. D., ... Schaefer, E. J. (1994). Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 107(1), 85–98.
- Serhan, N., Cabou, C., Verdier, C., Lichtenstein, L., Malet, N., Perret, B., ... Martinez, L. O. (2013). Chronic pharmacological activation of P2Y $_{13}$  receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(4), 719–25.
- Shea-Eaton, W., Lopez, D., & McLean, M. P. (2001). Yin yang 1 protein negatively regulates high-density lipoprotein receptor gene transcription by disrupting binding of sterol regulatory element binding protein to the sterol regulatory element. *Endocrinology*, 142(1), 49–58.
- Shetty, S., Eckhardt, E. R. M., Post, S. R., & Van Der Westhuyzen, D. R. (2006). Phosphatidylinositol-3-kinase regulates scavenger receptor Class B type I subcellular localization and selective lipid uptake in hepatocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(9), 2125–2131.
- Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., ... Lusis, a J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394(July), 284–287.
- Silbernagel, G., Schöttker, B., Appelbaum, S., Scharnagl, H., Kleber, M. E., Grammer, T. B., ... März, W. (2013). High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality. *European Heart Journal*, 34(46), 3563–3571.

- Silva, R. a G. D., Huang, R., Morris, J., Fang, J., Gracheva, E. O., Ren, G., ... Davidson, W. S. (2008). Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(34), 12176–81.
- Simmonds, W. J., Hofmann, A. F., & Theodor, E. (1967). Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *Journal of Clinical Investigation*, *46*(5), 874–890.
- Singaraja, R. R., Brunham, L. R., Visscher, H., Kastelein, J. J. P., & Hayden, M. R. (2003). Efflux and atherosclerosis: The clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *23*(8), 1322–1332.
- Spieker, L. E., Sudano, I., Hürlimann, D., Lerch, P. G., Lang, M. G., Binggeli, C., ... Noll, G. (2002). High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation*, *105*(12), 1399–1402.
- Staels, B. (2010). Fibrates in CVD: a step towards personalised medicine. *The Lancet*, *375*(9729), 1847–1848.
- Stangl, H., Hyatt, M., & Hobbs, H. H. (1999). Transport of lipids from high and low density lipoproteins via scavenger receptor-BI. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(46), 32692–32698.
- Stanislovaitiene, D., Lesauskaite, V., Zaliuniene, D., Smalinskiene, A., Gustiene, O., Zaliaduonyte-Peksiene, D., ... Zaliunas, R. (2013). SCARB1 single nucleotide polymorphism (rs5888) is associated with serum lipid profile and myocardial infarction in an age- and gender-dependent manner. *Lipids in Health and Disease*, *12*(1), 24.
- Stanley, M. M., Pineda, E. P., & Cheng, S. H. (1959). Serum Cholesterol Esters and Intestinal Cholesterol Secretion and Absorption in Obstructive Jaundice Due to Cancer. *New England Journal of Medicine*, *261*, 368–373.
- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., Gils, J. M. Van, Halle, A., Rayner, K. J., ... J, K. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*, *11*(2), 155–161.
- Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Salvayre, R., & Nègre-Salvayre, A. (1997). HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *17*(10), 2158–66.
- Sugatani, J., Miwa, M., Komiyama, Y., & Ito, S. (1996). High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, *13*(1), 73–88.
- Sumi, M., Sata, M., Miura, S. I., Rye, K. A., Toya, N., Kanaoka, Y., ... Nagai, R. (2007). Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(4), 813–818.
- Sundaram, S. S., Bove, K. E., Lovell, M. A., & Sokol, R. J. (2008). Mechanisms of disease: Inborn errors of bile acid synthesis. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology*, *5*(8), 456–68.
- Swarnakar, S., Temel, R. E., Connelly, M. A., Azhar, S., & Williams, D. L. (1999). Scavenger Receptor Class B, Type I, Mediates Selective Uptake of Low Density Lipoprotein

- Cholesteryl Ester. *Journal of Biological Chemistry*, 274(42), 29733–29739.
- Tall, A. R., Forester, L. R., & Bongiovanni, G. L. (1983). Facilitation of phosphatidylcholine transfer into high density lipoproteins by an apolipoprotein in the density 1.20-1.26 g/ml fraction of plasma. *Journal of Lipid Research*, 24(3), 277–89.
- Tamagaki, T., Sawada, S., Imamura, H., Tada, Y., Yamasaki, S., Toratani, a, ... Nakagawa, M. (1996). Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 123(1–2), 73–82.
- Temel, R. E., & Brown, J. M. (2010). A new framework for reverse cholesterol transport: non-biliary contributions to reverse cholesterol transport. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 16(47), 5946–52.
- Temel, R. E., & Brown, J. M. (2012). Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology*, 23(2), 85–90.
- Temel, R. E., & Brown, J. M. (2015). A new model of reverse cholesterol transport: EnTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 440–451.
- Temel, R. E., Sawyer, J. K., Yu, L., Lord, C., Degirolamo, C., Marshall, S., ... Brown, J. M. (2010). Biliary Sterol Secretion is Not Required For Macrophage Reverse Cholesterol Transport. *Cell Metabolism*, 12(1), 96–102.
- Temel, R. E., Tang, W., Ma, Y., Rudel, L. L., Willingham, M. C., Ioannou, Y. A., ... Yu, L. (2007). Hepatic Niemann-Pick C1 – like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1968–1978.
- Teslovich, T. M., Musunuru, K., Smith, A. V., Edmondson, A. C., Stylianou, I. M., Koseki, M., ... Kathiresan, S. (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, 466(7307), 707–13.
- Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., ... Parks, J. S. (2005). Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1333–1342.
- Toussaint, J.-F., Jacob, M.-P., Lagrost, L., & Chapman, M. J. (2003). *L’Athérosclérose. Physiopathologie, diagnostics et thérapeutiques*. Masson.
- Trigatti, B., Rayburn, H., Viñals, M., Braun, a, Miettinen, H., Penman, M., ... Krieger, M. (1999). Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9322–7.
- Uchida, K., Takase, H., Nomura, Y., Takeda, K., Takeuchi, N., & Ishikawa, Y. (1984). Changes in biliary and fecal bile acids in mice after treatments with diosgenin and  $\beta$ -sitosterol. *Journal of Lipid Research*, 25, 236–245.
- Ueda, Y., Royer, L., Gong, E., Zhang, J., Cooper, P. N., Francone, O., & Rubin, E. M. (1999). Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7165–71.
- Valacchi, G., Sticozzi, C., Lim, Y., & Pecorelli, A. (2011). Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229, 1–7.

- van der Veen, J. N., van Dijk, T. H., Vrans, C. L. J., van Meer, H., Havinga, R., Bijsterveld, K., ... Kuipers, F. (2009). Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(29), 19211–19219.
- van der Velde, A. E., Vrans, C. L. J., van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R. P. J., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2007). Direct Intestinal Cholesterol Secretion Contributes Significantly to Total Fecal Neutral Sterol Excretion in Mice. *Gastroenterology*, *133*(3), 967–975.
- van der Velde, A. E., Vrans, C. L. J., van den Oever, K., Seemann, I., Oude Elferink, R. P. J., van Eck, M., ... Groen, A. K. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(1), G203–G208.
- van Eck, M., Bos, I. S. T., Kaminski, W. E., Orsó, E., Rothe, G., Twisk, J., ... Schmitz, G. (2002). Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(9), 6298–6303.
- Van Eck, M., Singaraja, R. R., Ye, D., Hildebrand, R. B., James, E. R., Hayden, M. R., & Van Berkel, T. J. C. (2006). Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(4), 929–934.
- Van Eck, M., Twisk, J., Hoekstra, M., Van Rij, B. T., Van der Lans, C. a C., Bos, I. S. T., ... Van Berkel, T. J. C. (2003). Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(26), 23699–705.
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1995). Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *The American Journal of Cardiology*, *75*(3 SUPPL. 1), 3A–10A.
- Vantourout, P., Radojkovic, C., Lichtenstein, L., Pons, V., Champagne, E., & Martinez, L. O. (2010). Ecto-F 1 -ATPase : A moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor, *16*(47), 5925–5935.
- Varban, M. L., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., ... Huszar, D. (1998). Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(8), 4619–24.
- Verdier, C., Martinez, L. O., Ferrières, J., Elbaz, M., Genoux, A., & Perret, B. (2013). Targeting high-density lipoproteins: Update on a promising therapy. *Archives of Cardiovascular Diseases*, *106*(11), 601–611.
- Vergeer, M., Korporaal, S. J. A., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G. K., ... Kuivenhoven, J. A. (2011). Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *The New England Journal of Medicine*, *364*(2), 136–45.
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins. *Nature Cell Biology*, *13*(4), 423–433.
- Vickers, K. C., & Remaley, A. T. (2014). HDL and cholesterol: life after the divorce? *Journal of Lipid Research*, *55*(1), 4–12.

- Vila, A., Korytowski, W., & Girotti, A. W. (2002). Spontaneous transfer of phospholipid and cholesterol hydroperoxides between cell membranes and low-density lipoprotein: Assessment of reaction kinetics and prooxidant effects. *Biochemistry*, *41*(46), 13705–13716.
- Viswambharan, H., Ming, X. F., Zhu, S., Hubsch, A., Lerch, P., Vergères, G., ... Yang, Z. (2004). Reconstituted High-Density Lipoprotein Inhibits Thrombin-Induced Endothelial Tissue Factor Expression Through Inhibition of RhoA and Stimulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase but not Akt/Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation Research*, *94*(7), 918–925.
- Voight, B. F., Peloso, G. M., Orho-Melander, M., Frikke-Schmidt, R., Barbalic, M., Jensen, M. K., ... Kathiresan, S. (2012). Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: A mendelian randomisation study. *The Lancet*, *380*(9841), 572–580.
- von Eckardstein, A. (2006). Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes. *Atherosclerosis*, *186*, 231–239.
- von Eckardstein, A., Jauhiainen, M., Huang, Y., Metso, J., Langer, C., Pussinen, P., ... Assmann, G. (1996). Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1301*(3), 255–62.
- von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology and Therapeutics*.
- Voshol, P. J., Havinga, R., Wolters, H., Ottenhoff, R., Princen, H. M. G., Elferink, R. P. J. O., ... Kuipers, F. (1998). Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 P-glycoprotein-deficient mice. *Gastroenterology*, *114*(5), 1024–1034.
- Vrins, C. L. J., Ottenhoff, R., van den Oever, K., de Waart, D. R., Kruyt, J. K., Zhao, Y., ... Groen, A. K. (2012). Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, *53*(10), 2017–23.
- Vrins, C. L. J., van der Velde, A. E., van den Oever, K., Levels, J. H. M., Huet, S., Oude Elferink, R. P. J., ... Groen, A. K. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *Journal of Lipid Research*, *50*(10), 2046–2054.
- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Röxe, T., ... Dimmeler, S. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *33*(6), 1392–1400.
- Wahli, W., & Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *23*(7), 351–363.
- Wang, D. Q.-H., & Carey, M. C. (2003). Measurement of intestinal cholesterol absorption by plasma and fecal dual-isotope ratio, mass balance, and lymph fistula methods in the mouse: an analysis of direct versus indirect methodologies. *Journal of Lipid Research*, *44*(5), 1042–1059.
- Wang, H., Jiang, M., & Qiu, J. (2010). Quantitative assessment of the effect of hepatic lipase gene polymorphism on the risk of coronary heart disease. *Archives of Medical Research*, *41*(5), 383–90.
- Wang, J., Mitsche, M. A., Lütjohann, D., Cohen, J. C., Xie, X.-S., & Hobbs, and H. H. (2015).

- Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine. *J. Lipid Res.*, 56(2), 319–330.
- Wang, K., Edmondson, A. C., Li, M., Gao, F., Qasim, A. N., Devaney, J. M., ... Rader, D. J. (2011). Pathway-Wide Association Study Implicates Multiple Sterol Transport and Metabolism Genes in HDL Cholesterol Regulation. *Frontiers in Genetics*, 2(July), 41.
- Wang, L., Jia, X.-J., Jiang, H.-J., Du, Y., Yang, F., Si, S.-Y., & Hong, B. (2013). MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, 33(10), 1956–64.
- Wang, M. D., Franklin, V., & Marcel, Y. L. (2007). In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), 1837–1842.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., & Tall, a R. (1998). Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32920–6.
- Wang, N., Robaye, B., Agrawal, A., Skerry, T. M., Boeynaems, J.-M., & Gartland, A. (2012). Reduced Bone Turnover in Mice Lacking the P2Y 13 Receptor of ADP. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(January), 142–152.
- Waterworth, D. M., Ricketts, S. L., Song, K., Chen, L., Zhao, J. H., Ripatti, S., ... Sandhu, M. S. (2010). Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(11), 2264–76.
- Watson, A. D., Navab, M., Hama, S. Y., Sevanian, A., Prescott, S. M., Stafforini, D. M., ... Berliner, J. A. (1995). Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, 95(2), 774–782.
- Watson, a D., Berliner, J. a, Hama, S. Y., La Du, B. N., Faull, K. F., Fogelman, a M., & Navab, M. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(6), 2882–2891.
- Webb, N. R., Connell, P. M., Graf, G. A., Smart, E. J., De Villiers, W. J. S., De Beer, F. C., & Van Der Westhuyzen, D. R. (1998). SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 15241–15248.
- Weissglas-Volkov, D., & Pajukanta, P. (2010). Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2032–2057.
- Wells, J. E., Williams, K. B., Whitehead, T. R., Heuman, D. M., & Hylemon, P. B. (2003). Development and application of a polymerase chain reaction assay for the detection and enumeration of bile acid 7alpha-dehydroxylating bacteria in human feces. *Clinica Chimica Acta*, 331(1–2), 127–134.
- Wiersma, H., Gatti, A., Nijstad, N., Oude Elferink, R. P. J., Kuipers, F., & Tietge, U. J. F. (2009). Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice. *Hepatology*, 50(4), 1263–1272.
- Wiersma, H., Nijstad, N., Gautier, T., Iqbal, J., Kuipers, F., Hussain, M. M., & Tietge, U. J. F. (2010). Scavenger receptor BI facilitates hepatic very low density lipoprotein production

- in mice. *Journal of Lipid Research*, 51(3), 544–53.
- Willer, C. J., Sanna, S., Jackson, A. U., Scuteri, A., Bonnycastle, L. L., Clarke, R., ... Abecasis, G. R. (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature Genetics*, 40(2), 161–9.
- Yancey, P. G., De La Llera-Moya, M., Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S. M., Connelly, M. A., ... Rothblat, G. H. (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. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36596–36604.
- Yano, S., Tsukimoto, M., Harada, H., & Kojima, S. (2012). Involvement of P2Y13 receptor in suppression of neuronal differentiation. *Neuroscience Letters*, 518(1), 5–9.
- Yokota, H., Hashimoto, Y., Okubo, S., Yumoto, M., Mashige, F., Kawamura, M., ... Nakahara, K. (2002). Apolipoprotein A-I deficiency with accumulated risk for CHD but no symptoms of CHD. *Atherosclerosis*, 162, 399–407.
- Yoo, E. (2016). Sitosterolemia: a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 21(1), 7–14.
- Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 411(23–24), 1875–82.
- Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 358–362.
- Yu, L., Hammer, R. E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2002). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16237–42.
- Yu, X. H., Qian, K., Jiang, N., Zheng, X. L., Cayabyab, F. S., & Tang, C. K. (2014). ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 428, 82–88.
- Yuhanna, I. S., Zhu, Y., Cox, B. E., Hahner, L. D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., ... Shaul, P. W. (2001). High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nature Medicine*, 7(7), 853–857.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., ... Lisheng, L. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study. *The Lancet*, 364(9438), 937–952.
- Yvan-Charvet, L., Bobard, A., Bossard, P., Massiéra, F., Rousset, X., Ailhaud, G., ... Quignard-Boulangé, A. (2007). In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(6), 1340–1345.
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E. L., Avagyan, S., Siry, R. L., Han, S., ... Tall, A. R. (2010). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5986), 1689–93.
- Yvan-Charvet, L., Wang, N., & Tall, A. R. (2010). Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), 139–143.

- Zannis, V., Kateifides, A., Fotakis, P., Zanni, E., & Kardassis, D. (2012). Dyslipidemia - From prevention to treatment - chapitre 9 (Pleiotropic functions of HDL lead to protection from atherosclerosis and other diseases), (July), 173–198.
- Zanoni, P., Khetarpal, S., Larach, D., Hancock-Cerutti, W., Millar, J., Cuchel, M., ... Consortium., C. E. C. Cardi. E. C. G. L. G. (2016). Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease. *Science*, *351*(6278), 1166–1171.
- Zerrad-Saadi, A., Therond, P., Chantepie, S., Couturier, M., Rye, K. A., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2009). HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: Relevance to inflammation and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(12), 2169–2175.
- Zhang, L.-H., Kamanna, V. S., Zhang, M. C., & Kashyap, M. L. (2008). Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *Journal of Lipid Research*, *49*(6), 1195–201.
- Zhang, Q., Yin, H., Liu, P., Zhang, H., & She, M. (2010). Essential role of HDL on endothelial progenitor cell proliferation with PI3K/Akt/cyclin D1 as the signal pathway. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *235*(9), 1082–1092.
- Zhang, Y., Silva, J. R. Da, Reilly, M., Billheimer, J. T., Rothblat, G. H., & Rader, D. J. (2005). Hepatic expression of scavenger receptor class B type I ( SR-BI ) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(10), 2870–2874.
- Zhao, Y., Pennings, M., Hildebrand, R. B., Ye, D., Calpe-Berdiel, L., Out, R., ... Van Eck, M. (2010). Enhanced foam cell formation, atherosclerotic lesion development, and inflammation by combined deletion of ABCA1 and SR-BI in bone marrow-derived cells in LDL receptor knockout mice on western-type diet. *Circulation Research*, *107*(12).
- Zhao, Y., Pennings, M., Vrans, C. L. J., Calpe-Berdiel, L., Hoekstra, M., Kruijt, J. K., ... Van Eck, M. (2011). Hypocholesterolemia, foam cell accumulation, but no atherosclerosis in mice lacking ABC-transporter A1 and scavenger receptor BI. *Atherosclerosis*, *218*(2), 314–22.
- Zhu, H., & Fan, G.-C. (2011). Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *American Journal of Cardiovascular Disease*, *1*(2), 138–149.





## **ABSTRACT**

### **Respective contribution of P2Y<sub>13</sub> and SR-BI receptors in HDL-C metabolism and atherosclerosis development.**

The atheroprotective effect of High Density Lipoproteins (HDL) is mostly attributed to their central role in reverse cholesterol transport, a process whereby excess cholesterol is taken up from peripheral cells to be delivered to the liver where it is secreted into the bile. Two independent pathways have been identified as being involved in the hepatic HDL uptake. The first one involves the ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> pathway. Briefly, apoA-I binds to an ecto-F<sub>1</sub>-ATPase expressed at the surface of the hepatocyte and stimulates HDL endocytosis. The second pathway involves the SR-BI receptor which mediates selective HDL-cholesteryl ester uptake by the liver.

In this work, we have demonstrated that hepatic extinction of SR-BI essentially contributes to an increase of HDL-C levels while P2Y<sub>13</sub> extinction mainly contributes to a decrease of hepato-biliary cholesterol secretions which translates into an increased atherosclerosis development, on top of SR-BI hepatic extinction.

---

Key words: HDL, P2Y<sub>13</sub>, SR-BI, reverse cholesterol transport, atherosclerosis

---

**Sara ESPINOSA DELGADO**

**Directeurs de thèse : Dr. Laurent MARTINEZ - Dr. Laetitia LICHTENSTEIN**

Université Paul Sabatier (Toulouse) - 12 janvier 2017

**Contribution respective des récepteurs P2Y<sub>13</sub> et SR-BI dans le métabolisme du HDL-C et le développement de l'athérosclérose**

Le rôle athéroprotecteur des Lipoprotéines de Haute Densité (HDL) est principalement attribué à sa fonction dans le transport retour du cholestérol des cellules périphériques vers le foie où il est éliminé *via* les voies biliaires. Au niveau du foie, deux voies ont été impliquées dans la captation des HDL. La première, concerne la voie ecto-F<sub>1</sub>-ATPase/P2Y<sub>13</sub> dans laquelle l'apolipoprotéine A-I se lie sur une ecto-F<sub>1</sub>-ATPase de surface qui stimule le récepteur P2Y<sub>13</sub> puis l'endocytose des HDL. La deuxième, concerne le récepteur SR-BI, responsable de la captation sélective du cholestérol estérifié des HDL.

Ces travaux nous ont permis de montrer que l'invalidation hépatique de SR-BI contribue essentiellement aux concentrations plasmatiques de HDL-Cholestérol alors que l'invalidation de P2Y<sub>13</sub> contribue essentiellement aux sécrétions hépato-biliaires de cholestérol et agit de façon importante sur le développement de la plaque d'athérosclérose chez les souris invalidées pour SR-BI hépatique.

---

Mots clés : HDL, P2Y<sub>13</sub>, SR-BI, transport retour du cholestérol, athérosclérose

---

Discipline administrative : physiopathologie

Ecole doctorale : INSERM - UMR1048 - I2MC - équipe 5, 1 avenue Jean Poulhès,

BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4