

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

**REGULATION DU CHOLESTEROL HDL :
APPROCHE GENETIQUE ET NUTRITIONNELLE.
INTERÊT DE STEROLS D'ORIGINE MARINE**

THESE DE DOCTORAT

**Ecole Doctorale : Chimie Biologie
Discipline : Science de la Vie et de la Santé
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

Présentée et soutenue publiquement par

Hong Quang DO

Le 30 Avril 2008, devant le Jury suivant :

Rapporteurs :

M. Gérard Luc, Professeur, Faculté de Pharmacie, Lille

**M. Gilles Simard, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, Faculté de
Médecine, Angers**

Examineurs:

M. Jean Marie Bard, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Nantes

M. El-Hassane Nazih, Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie, Nantes

**Directeur de thèse : M. le Professeur Jean Marie Bard
M. le Docteur El-Hassane Nazih**

Je tiens à remercier vivement

Messieurs Gérald Luc et Gilles Simard

Sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, en acceptant d'être rapporteurs, en dépit de vos charges, je vous prie de croire en ma respectueuse gratitude.

Messieurs Jean Marie Bard et Hassan Nazih

Pour votre disponibilité, gentillesse et soutien toujours empreint d'optimisme. Pour avoir initié et guidé ce travail qui, sans vous, n'aurait pu être mené à bien. Qu'ils soient assurés de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

J'exprime également toute ma gratitude à Jean Michel Huvelin, Catherine Scoul et Laurianne Van Landeghem pour vos connaissances techniques très approfondies.

Tôi xin trân trọng Cảm ơn Chính phủ Việt Nam đã tài trợ một phần kinh phí cho luận án .

Xin Cảm ơn sự động viên, giúp đỡ của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Ban Điều hành Đề án 322, Trường Đại học Dược Hà Nội trong suốt 3 năm thực hiện luận án.

Cảm ơn sự chia sẻ của Gia đình, Bạn bè ở trong và ngoài nước, mà nếu thiếu, luận án này đã không thể hoàn thành.

Đỗ Hồng Quảng

TABLE DE MATIERES

Abréviations	8
Liste de Figures et Tableaux	9
Introduction générale	10
Etude bibliographique	12
I. Métabolisme des lipoprotéines	12
I.1. Les lipoprotéines	12
I.1.1 Fraction protéique des lipoprotéines : Apolipoprotéines	12
ApoAI	13
ApoE	13
Autres Apolipoprotéines	14
I.1.2 Classifications des lipoprotéines selon la densité	16
I.1.3 Classification des lipoprotéines selon la mobilité électrophorétique	16
I.1.4 Classification des lipoprotéines en fonction de la taille	17
I.1.5 Classification des lipoprotéines selon leur contenu protéique	17
I.2 Métabolisme des lipoprotéines	18
I.2.1 Les enzymes et protéines de transport impliqués dans le métabolisme lipidique	18
<i>I.2.1.1 Enzymes lipolytiques</i>	<i>18</i>
<i>I.2.1.2 LCAT</i>	<i>19</i>
<i>I.2.1.3 CETP</i>	<i>19</i>
<i>Distribution de la CETP dans le plasma</i>	<i>19</i>
<i>Rôle de la CETP dans la détermination de la taille et la concentration des HDL</i>	<i>20</i>
<i>Régulation de l'activité de la CETP</i>	<i>20</i>
<i>Concentration plasmatique et variation physiopathologique de la CETP</i>	<i>20</i>
I.2.2 Récepteurs impliqués dans le métabolisme lipidique	20
<i>I.2.2.1 La famille des Récepteurs LDL</i>	<i>20</i>
<i>I.2.2.2 La famille des récepteurs des HDL</i>	<i>21</i>
I.2.3 Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides	21
<i>I.2.3.1 L'absorption intestinale du cholestérol</i>	<i>21</i>

<i>I.2.3.1.1 La captation entérocytaire du cholestérol</i>	22
<u>La solubilisation</u>	<u>22</u>
<u>Le passage de la bordure en brosse</u>	<u>22</u>
<u>SR-BI</u>	<u>22</u>
<u>La protéine NPC1L1</u>	<u>23</u>
<u>Les transporteurs ABC</u>	<u>25</u>
<u>L'ACAT-2</u>	<u>26</u>
<i>I.2.3.1.2 Régulation de l'absorption du cholestérol</i>	27
<i>I.2.3.1.3 L'assemblage des lipoprotéines et rôle de la protéine MTP</i>	28
<u>L'assemblage de lipoprotéines primordiales</u>	<u>28</u>
<u>La synthèse des gouttelettes lipidiques riches en triglycérides (TG)</u>	<u>29</u>
<u>La formation des lipoprotéines naissantes</u>	<u>29</u>
<i>I.2.3.1.4 Influence des phytostérols sur l'absorption intestinale du cholestérol et sur le métabolisme lipidique</i>	29
<u>Les phytostérols</u>	<u>29</u>
<u>Absorption des phytostérols et leur influence sur l'absorption intestinale du cholestérol</u>	<u>30</u>
<u>Effets des phytostérols sur les lipides plasmatiques</u>	<u>30</u>
<u>Effets des phytostérols sur l'athérosclérose</u>	<u>31</u>
<i>I.2.3.2 Métabolisme des chylomicrons</i>	31
<i>I.2.3.3 Métabolisme des VLDL</i>	32
I.2.4 Métabolisme des HDL	33
<i>I.2.4.1 Origine des HDL</i>	33
<i>I.2.4.2 Récepteurs impliqués dans le métabolisme des HDL</i>	34
<i>I.2.4.2.1 Le récepteur scavenger B1 (SR-B1)</i>	34
<i>I.2.4.2.2 Transporteurs Adenosine Triphosphate-Binding Cassette « ABC »</i>	35
<i>I.2.4.3 Les rôles des HDL / Transport inverse de cholestérol</i>	36
II. PPAR : Facteur de transcription impliqué dans le métabolisme lipidique	37
II.1 Mécanisme d'action	38
II.2 Distribution tissulaire	38

II.3 Les principaux ligands des PPARs	39
II.3.1 Les ligands naturels	39
II.3.2 Les ligands pharmacologiques	39
II.3.3 PPARs et métabolisme lipidique chez l'homme	40
<i>II.3.3.1 PPAR et HDL</i>	<i>41</i>
<i>II.3.3.2 PPAR et Récepteur Scavenger de Type BI</i>	<i>41</i>
<i>II.3.3.3 PPAR et ABCA1</i>	<i>41</i>
III. Influence de polymorphismes génétiques sur le métabolisme lipidique	42
III.1. Polymorphisme du gène de l'apoAI	42
III.1.1 Gène de l'ApoAI	42
III.1.2. ApoAI-75G/A	42
III.1.3. ApoAI-27C/A	42
III.2. Polymorphisme du gène de l'apoE	43
III.3. Polymorphismes du gène de la CETP	43
III.3.1. Gène de la CETP	43
III.3.2. Intron14 G/A	43
III.3.3. Taq1B	44
III.3.4. D442G	44
III.3.5. A373P	45
III.4. Polymorphisme du gène PPAR	45
III.4.1 Gène de PPAR	45
III.4.2 Polymorphisme du gène de PPARα	45
<i>III.4.2.1 L162V</i>	<i>45</i>
<i>III.4.2.2 Val227Ala</i>	<i>46</i>
III.4.3 Polymorphisme du gène de PPARγ	46
<i>III.4.3.1 P12A</i>	<i>46</i>
<i>III.4.3.2 H449H</i>	<i>46</i>
Etude 1	48
Article 1	49
Population étudiée	49
Résultats	50
Discussion	51
Etude 2	54

Etat de la question	54
Matériel et Méthode	54
<i>Culture sur filtres semi-perméables</i>	<i>54</i>
<i>Préparation des micelles</i>	<i>55</i>
Résultats	55
Discussion	57
Discussion et Perspectives	60
References	64
Liste des fiches techniques	82

Abréviations

ABC	ATP Binding Cassette transporter
ACAT	Acyl CoA cholestérol acyltransférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
Apo	Apolipoprotéine
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
Chylo	Chylomicron
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Lipase hépatique
IDL	Intermediary Density Lipoprotein
LCAT	Lecithin :Cholesterol Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-receptor
Lp	Lipoparticules
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP	LDL-receptor Related Protein
LRT	Lipoprotéine Riche en Triglycéride
LXR	Liver X Receptor
PLTP	Phospholipid Transfer Protein
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
RXR	Retinoic X Receptor
SR-BI	Scavenger Receptor BI
TG	Triglycérides
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDL-R	VLDL-receptor

Liste de Figures et tableaux

Figure 1: Lipoprotéine	12
Figure 2 : L'absorption de cholestérol	27
Figure 3 : Mécanisme d'action du LXR	28
Figure 4 : Représentation schématique du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides	33
Figure 5 : Représentation schématique du récepteur SR-BI.	34
Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme des HDL.	37
Figure 7 : Mécanisme d'action des PPARs	38
Tableau 1: Principales caractéristiques des apolipoprotéines	15

Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité au sein des populations industrialisées (Thaumat 2003). L'athérosclérose est une des causes les plus fréquentes des MCV et son développement peut être relié à plusieurs facteurs modifiables alors que d'autres ne le sont pas. Au premier plan de ces facteurs modifiables et non modifiables, on retrouve d'abord le cholestérol et le HDL-Cholestérol (HDL-C) (Wilson 1990). En effet, plusieurs études ont montré que les concentrations de HDL-C et du cholestérol sont respectivement négativement et positivement reliées aux MCV.

En clinique, les facteurs modifiables sont les cibles de choix de prévention et de traitement des maladies cardiovasculaires. La concentration de cholestérol et de HDL-cholestérol peut être modifiée par l'amélioration des habitudes de vie (nutrition, activité sportive...).

L'un des facteurs modifiables est la cholestérolémie. En effet, les essais cliniques de prévention primaires et secondaires ont montré qu'il était possible de réduire le risque cardiovasculaire en diminuant le cholestérol à l'aide de statines.

Plusieurs études ont montré que la pratique d'exercices physiques, la perte de poids, la consommation d'une alimentation équilibrée influencent positivement la concentration d'HDL-C. La thérapie pharmacologique peut également influencer les concentrations d'HDL-C. En effet, l'utilisation des fibrates induit une augmentation des concentrations d'HDL-C (Rubins HB 1999).

D'autres études ont également démontré que la diminution de la mortalité coronarienne sous traitement par les statines n'est pas seulement causée par la baisse significative des niveaux de LDL-C, mais également par l'augmentation des concentrations d'HDL-C (Wierzbicki AS 2002).

Malgré la diversité des thérapies disponibles, une proportion de la population hypercholestérolémique est incapable de réduire sa concentration de cholestérol plasmatique et selon les recommandations de l'AFSSAPS 2005, la prescription d'hypolipémiants pharmacologiques n'est pas justifiée chez de nombreux patients ayant un risque cardiovasculaire faible, le traitement diététique devant rester la base de la prise en charge. Entre autres recommandations elle préconise une limitation du cholestérol alimentaire et des

acides gras saturés voire l'utilisation d'aliments enrichis en phytostérols, stérols végétaux réduisant l'hypercholestérolémie.

Parmi les facteurs non modifiables, on retrouve le polymorphisme des gènes codant pour les apolipoprotéines, les protéines de transfert, les enzymes, les facteurs de transcription qui interviennent dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines et pourraient influencer de ce fait les concentrations d'HDL-C.

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposés de répondre aux 2 questions suivantes :

a) Quelle est l'influence du polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et lipoprotéines, sur les concentrations d'HDL-C ?

b) Quelle est l'influence de stérols originaux d'origine spongiaire sur l'absorption intestinale du cholestérol in vitro?

Afin d'aboutir à la réalisation de nos objectifs et de répondre à la première question, nous avons mené une étude chez des individus indemnes de MCV issus de la cohorte PRIME.

Pour répondre à la deuxième question nous avons étudié l'effet d'un mélange de stérols comprenant notamment le 24-isopropylcholestérol, extraits d'une éponge marine, sur l'absorption intestinale du cholestérol, utilisant le modèle cellulaire Caco-2.

Le présent mémoire est divisé en 3 chapitres :

- Le premier chapitre consiste en une revue de littérature du métabolisme des lipides et des lipoprotéines ainsi qu'une revue de littérature sur l'absorption intestinale du cholestérol et sur l'approche nutritionnelle des phytostérols et leurs effets sur cette absorption du cholestérol et la cholestérolémie en générale.
- Le deuxième chapitre est dédié aux facteurs de transcription PPARs et leurs implications dans le métabolisme lipidique et lipoprotéique.
- Le dernier chapitre présente une liste de polymorphismes génétiques de facteur de transcription, d'apolipoprotéines, et de protéines de transfert et leur importance dans la détermination de HDL-C

- Etude bibliographique

I. Structure et Métabolisme des lipoprotéines

1.1 Les lipoprotéines

Le transport des lipides dans le plasma peut être réalisé grâce à des structures protéolipidiques appelées lipoprotéines. Ces structures sont pour la plupart sphériques constituées en surface par des composés hydrophiles (phospholipides, cholestérol libre, apolipoprotéines) qui entourent le centre occupé par des lipides neutres hydrophobes (triglycérides, cholestérol estérifié).

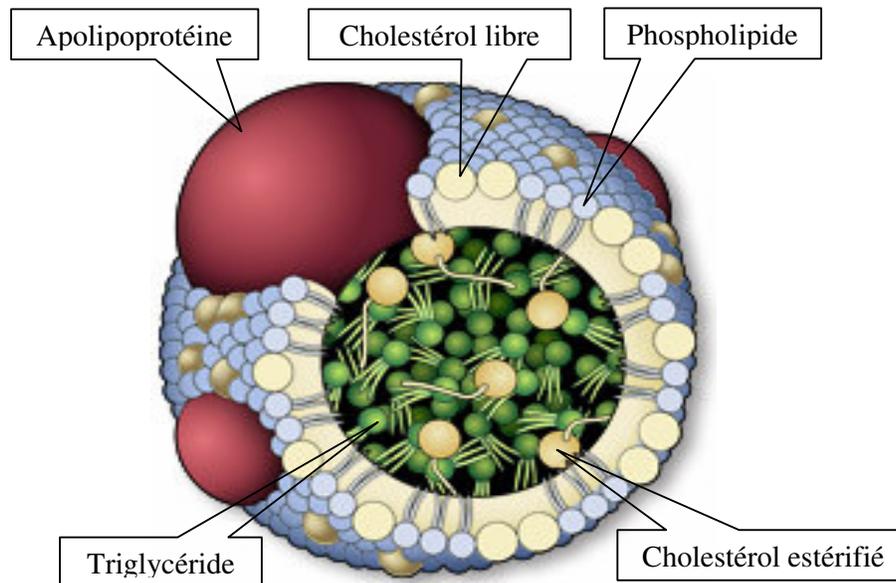


Figure 1 : Lipoprotéine

1.1.1 Fraction protéique des lipoprotéines : Apolipoprotéines

Les apolipoprotéines constituent la fraction protéique des lipoprotéines. Certaines apolipoprotéines sont intégrées et ne peuvent être échangées, comme l'apo B, alors que d'autres sont libres et peuvent être transférées à d'autres lipoprotéines, comme l'apo E ou les apo C. Les apolipoprotéines accomplissent différentes tâches structurales ou métaboliques.

Elles servent de cofacteurs enzymatiques, comme l'apo AI pour la LCAT. Elles jouent le rôle de ligands dans les interactions avec les récepteurs des lipoprotéines dans les tissus, comme l'apo E ou l'apo B pour les récepteurs des LDL.

Nous nous attarderons sur les deux apolipoprotéines qui ont fait l'objet de nos travaux expérimentaux.

Apo AI :

L'apolipoprotéine AI est une apolipoprotéine de 28 kDa synthétisée principalement par le foie et l'intestin. Elle est sécrétée sous forme de pro-apolipoprotéine, contenant quelque acides aminés supplémentaires par rapport à la forme mature (G. Luc 1991). Elle constitue l'apolipoprotéine majeure des HDL et en représente 70% de la masse protéique totale (Fielding 1995). Elle joue un rôle capital dans le métabolisme lipidique. Elle accélère le transport inverse du cholestérol et peut être un facteur protecteur dans le développement de l'athérocclérose. Elle est un des principaux co-facteurs de l'enzyme LCAT, permettant l'estérification du cholestérol et donc la maturation des HDL. Elle représente le principal accepteur du cholestérol tissulaire mis à sa disposition par l'action du transporteur ABCA1. Sa concentration plasmatique est de 1,2 à 1,4g/l. Des propriétés anti-oxydantes lui ont été associées car elle participe à la prévention de l'oxydation des LDL (Navab M. 2000).

Apolipoprotéine E

C'est une apolipoprotéine de 34 kDa. La majorité de l'apo E circulante est synthétisée par le foie bien que de nombreux tissus extra hépatiques soient capables de la synthétiser, comme le cerveau ou les macrophages. Elle comprend un seul polypeptide de 299 acides aminés, impliqué dans le transport des lipides dans le plasma et le cerveau. L'apoE est comme les autres apolipoprotéines, de nature amphiphile (Siest G 1995).

L'apolipoprotéine E joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol, systémique et cellulaire. Elle fait partie de la surface des lipoprotéines et elle a une grande affinité pour les récepteurs des LDL. Elle participe à la captation hépatique des lipoprotéines, chylomicrons résiduels, VLDL et certaines HDL. Ce rôle a été confirmé par l'accumulation des lipoprotéines plasmatiques chez la souris invalidée pour l'apoE et les sujets déficients en apoE

(Plump AS 1992; Zhang SH 1992). De plus, un rôle dans le transport inverse du cholestérol lui a été attribué. Les HDL des souris invalidées pour l'apoE et des sujets déficients en apoE ont une faible capacité à faire sortir le cholestérol des macrophages (Basu SK 1982; Hayek T 1994). Par ailleurs, il a été montré que l'apo E libre est capable de former un complexe avec le transporteur ABCA1 de la même façon que l'apo AI (Krimbou L 2004) en induisant la lipodation de cette apo E par microsolumbilisation de la membrane.

Autres apolipoprotéines :

D'autres apolipoprotéines jouent des rôles importants. L'apo B 100 et l'apo B 48, codées par le même gène, jouent des rôles structuraux, pour les lipoprotéines qui les contiennent : VLDL, IDL et LDL pour l'apo B100 et chylomicrons pour l'apo B 48. Elles régulent également le métabolisme de ces lipoprotéines, en servant de ligand pour leur récepteur (apo B100).

Synthétisées par le foie et par l'intestin, l'apo CII et l'apo CIII interviennent dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG. L'apo CII est le cofacteur de la LPL, enzyme impliquée dans la lipolyse des lipoprotéines riches en TG (Chylo, VLDL, IDL) (Olivecrona G. 1997). L'apo CIII inhibe la LPL (Ginsberg HN 1986; McConathy 1992) et module également la liaison des lipoprotéines contenant l'apo B aux récepteurs des LDL (Clavey 1995). La déficience en apo CII conduit à une hypertriglycéridémie similaire à celle observée lors d'un déficit en LPL (Fojo 1992). L'étude ECTIM (Etude Cas Témoin Infarctus de Myocarde) a démontré que l'apo CIII associée à l'apo B constitue un marqueur de risque d'athérosclérose (Luc 1996).

D'autres apolipoprotéines ont été identifiées et ne seront pas décrites ici. Les principales caractéristiques des apolipoprotéines sont résumées dans le tableau suivant :

Apolipo protéine	Classe Lp principal	Poids (kDa)	Concentration plasmatique (mg/l)	Fonction
AI	HDL	28	1200-1400	Ligand pour récepteur de HDL Activateur de l'efflux du cholestérol Activateur de la LCAT Modulateur de la CETP
AII	HDL3	17	350-500	Ligand pour récepteur de HDL Modulateur de la captation du cholestérol Modulateur de la CETP
AIV	Chylomicron HDL	46	<50	Ligand pour récepteur de HDL Activateur de l'efflux du cholestérol Activateur de la LCAT Stimulateur de la CETP Modulateur de l'activité de la LPL
B100	VLDL, LDL	550	700-900	Ligand pour le récepteur LDL apo B/E
B48	Chylomicron β-VLDL	265	<50	Absorption des lipides alimentaires
CI	Chylomicron VLDL	6,5	50-80	Activateur de la LCAT et de la LPL Inhibiteur de la captation hépatique des particules riches en TG
CII	Chylomicron VLDL	8,8	30-70	Activateur de la LPL et de la LCAT Inhibiteur de la captation hépatique des particules riches en TG
CIII	Chylomicron VLDL	8,9	100-120	Modulateur de l'action de la LCAT Inhibiteur de la LPL Inhibiteur de l'internalisation hépatique des lipoprotéines riches en TG
D	HDL3	29	80-100	Eboueur potentiel des radicaux libres Transporteur de lipides, stéroïdes, bilirubine
E	Chylomicron VLDL HDL-E	34	30-50	Ligand des récepteurs à l'apoE et apo B/E Stimulateur de l'efflux du cholestérol Transport intratissulaire des lipides
F	HDL	30	<50	Inhibiteur de la CETP
G	VHDL	72	<50	Inconnu
H	Chylomicron	55	150-300	Régulation d'activité procoagulante
(a)	Lp(a)	650	Variable	Interaction fibrinolyse ?
L	HDL	42	8	Transport de cholestérol Apoptose, cancer
J	HDL VHDL	75	100	Solubilisation et transport des lipides Cytolyse, interaction cellulaire

Tableau 1 : Principales caractéristiques des apolipoprotéines

I.1.2 Classifications des lipoprotéines selon la densité :

Les lipoprotéines plasmatiques peuvent-être définies selon plusieurs critères :

En ajustant la densité et en réalisant une ultracentrifugation, on peut séparer les lipoprotéines suivantes :

- Chylomicrons : très riches en triglycérides, sont présents normalement en période post-prandiale uniquement $d < 0,96$
- VLDL: (Very Low Density Lipoproteins) pauvres en cholestérol, riches en triglycérides $d < 1,006$
- IDL: (Intermediary Density Lipoproteins) plus riches en cholestérol, moins riches en triglycérides que les VLDL $1,006 < d < 1,019$
- LDL: (Low Density Lipoproteins) très riches en cholestérol, pauvres en triglycérides $1,019 < d < 1,063$
- HDL: (High Density Lipoproteins) riches en cholestérol et en phospholipides qui sont séparées en HDL₂: $1,063 < d < 1,125$ et HDL₃ : $1,125 < d < 1,210$

Une classe particulière de lipoprotéines, la lipoprotéine (a) (Lp(a)) a été distinguée. Elle est associée aux maladies cardiovasculaires. Elle représente une lipoprotéine particulière dont la partie protéique est constituée d'une molécule d'apo B100 associée par un pont di-sulfure à une molécule d'apo (a) (Marcovina S.M. 1995; White A.L 1995). La taille de cette Lp(a) est proche de celle des LDL tandis que sa densité est proche de celle des HDL₂.

I.1.3 Classification des lipoprotéines selon la mobilité électrophorétique :

Les lipoprotéines sont chargées et peuvent donc migrer dans un champ électrique, ce qui permet de les séparer en quatre classes après électrophorèse sur gel d'agarose à pH légèrement alcalin (8-8,5) :

- Les Chylomicrons : ne migrent pas dans l'électrophorégramme
- Les VLDL migrent au niveau des pré- β globulines
- Les LDL migrent au niveau des β globulines
- Les HDL migrent au niveau de α_1 globulines

Ces deux systèmes de classification des lipoprotéines ne séparent pas les même entités mais, en pratique, ils sont utilisés de manière interchangeable. Pendant de longues années, ils ont été la base de nombreuses études métaboliques, cliniques, épidémiologiques et pharmacologiques permettant de progresser dans le dépistage de l'athérosclérose et des dyslipoprotéinémies.

D'importants travaux ont cependant montré que ces systèmes étaient arbitraires et qu'ils rassemblaient, sous un même terme, des lipoprotéines très différentes ayant des compositions et des significations cliniques et métaboliques distinctes.

I.1.4 Classification des lipoprotéines en fonction de la taille :

Les lipoprotéines présentent des tailles variables, évoluant en fonction inverse de la densité. Elles peuvent donc être séparées classiquement par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Dans l'ordre de tailles décroissantes on trouve :

- Les chylomicrons
- Les VLDL
- Les LDL
- Les HDL

A cette classification des LDL et HDL selon la taille traditionnelle s'ajoute une autre classification. En effet, les LDL forment un groupe de lipoparticules hétérogènes en taille, densité et composition. On distingue selon la taille des LDL, deux phénotypes : le phénotype A : caractérisé par une prépondérance des LDL de grande taille (LDL1 et LDL2). Le phénotype B (non A), associé au risque athérogène, est caractérisé par la présence des LDL petites et plus denses (LDL3 à LDL7). Les HDL englobent également plusieurs lipoparticules de différentes origines, tailles, densités et composition. Les HDL de petite taille sont considérées comme plus efficaces pour initier l'efflux du cholestérol et les accepteurs de grande taille pour stimuler l'efflux membranaire par diffusion et le transporter vers le foie. Il est en mesure actuellement de décomposer les HDL en 9 fractions numérotées de 1 à 9 des plus grosses aux plus petites (Hoefner 2001).

I.1.5 Classification des lipoprotéines selon leur contenu protéique :

Les contenus protéiques des lipoprotéines qui s'appellent apolipoprotéines représentent leurs déterminants antigéniques. Le système nomenclature ABC a été suggéré par Alaupovic (Alaupovic 1972) et est utilisé aujourd'hui. Dans un premier temps l'apolipoprotéine A a été considérée comme associée préférentiellement aux HDL tandis que l'apolipoprotéine B était associée aux LDL et l'apolipoprotéine C aux VLDL. Ultérieurement, il est apparu que les protéines qui constituent l'apo A sont en fait formées par plusieurs polypeptides : ApoAI,

ApoAII, ApoAIV... Parallèlement, d'autres apolipoprotéines ont été identifiées dans les différentes classes de lipoprotéines ou dans certaines situations physiologiques. Cette découverte de nombreuses apolipoprotéines, associée au fait qu'elles représentent la partie active des lipoprotéines a conduit à une nouvelle classification des lipoprotéines. En effet, elles représentent le ligand des récepteurs des lipoprotéines et les cofacteurs des enzymes du métabolisme des lipoprotéines. Dans cette nouvelle classification, il est possible de distinguer des particules simples qui ne contiennent qu'une seule apolipoprotéine et les particules complexes contenant plusieurs apolipoprotéines. Au cours de leur métabolisme, les particules simples peuvent interagir avec d'autres particules pour former des particules complexes et inversement, des particules complexes peuvent perdre des apolipoprotéines et devenir des particules simples.

Les particules sont alors nommées selon leur contenu en apolipoprotéines. Par exemple, celles qui ne contiennent que l'apoB seront appelées LpB, celles qui ne contiennent que l'ApoAI seront appelées LpAI, tandis que celles qui contiennent à la fois de l'apoB et de l'apo E seront appelées LpB:E.

Cette classification est très intéressante car elle permet d'améliorer la connaissance du métabolisme des lipoprotéines et d'affiner potentiellement le dépistage du risque cardiovasculaire.

I.2 Métabolisme des lipoprotéines

Depuis leur absorption ou biosynthèse jusqu'à leur excrétion, les lipides peuvent subir de nombreuses transformations qui sont décrites plus loin dans le chapitre consacré au métabolisme des lipoprotéines.

I.2.1 Les enzymes et protéines de transport impliqués dans le métabolisme lipidique

I.2.1.1 Enzymes lipolytiques

Les lipides circulants sont soumis à l'action de nombreuses enzymes qui déterminent la durée de vie et la concentration des différents lipides. Parmi ces enzymes on distingue la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hépatique (HL). La LPL est présente à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux et elle hydrolyse les triglycérides des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL et chylomicrons), libérant les acides gras libres qui seront stockés dans les adipocytes après conversion en triglycérides. La lipase hépatique (HL) est synthétisée par les hépatocytes. Elle hydrolyse les triglycérides et probablement les phospholipides des

VLDL résiduelles qui deviennent des IDL. Son action sur cette dernière donne des LDL. Elle agit également sur les HDL₂ qui deviennent HDL₃.

Associées aux HDL on trouve l'enzyme Lécithine Cholestérol Acyl Transferase (LCAT), la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) et la protéine de transfert des phospholipides (PLTP).

1.2.1.2 LCAT

La LCAT transfère un acide gras des phospholipides au cholestérol libre ce qui entraîne la formation de cholestérol estérifié. Cette estérification permet d'une part de libérer la surface des HDL en cholestérol libre ce qui facilitera l'efflux de nouvelles molécules de cholestérol membranaire. Ceci suggère un rôle de la LCAT dans le transport inverse du cholestérol.

1.2.1.3 CETP

La Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) est une glycoprotéine hydrophobe qui est synthétisée majoritairement par le foie. L'effet de la CETP est de transférer le cholestérol estérifié depuis les HDL vers les lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) (VLDL et Chylomicrons). En échange, les triglycérides sont transférés des LRT vers les LDL et les HDL.

Si le niveau de VLDL est normal, la CETP transfère le cholestérol estérifié depuis les HDL vers les LDL. Par contre, quand le niveau de VLDL est important, le transfert se fera préférentiellement depuis les HDL vers les VLDL.

Distribution de la CETP dans le plasma :

La distribution de la CETP dans les lipoprotéines a été étudiée in-vitro. Il a été montré que la CETP se trouve essentiellement liée aux HDL, les LDL et VLDL représentant les fractions les moins riches en CETP (Nishida HI 1993).

L'analyse du plasma par gel filtration ou par chromatographie d'affinité vis-à-vis de l'apolipoprotéine AI indique que la majorité de la CETP est associée aux HDL (Moulin P 1994). Chez les sujets normolipidémiques, la CETP est liée aux LpAI. Cependant, chez les sujets hyperlipidémiques qui ont une faible concentration en LpAI, la CETP est trouvée majoritairement au niveau des LpAII. Ces données indiquent que la CETP possède une meilleure affinité pour les LpAI par rapport aux LpAII. Les analyses de plasma par électrophorèse sur gel d'agarose et par électrophorèse bidimensionnelle indiquent que la plupart de la CETP se trouve liée aux préβ HDL (Francone OL 1989; Marcel YL 1990).

Rôle de la CETP dans la détermination de la taille et la concentration des HDL

La CETP stimule la formation des HDL de type pré β . Ces HDL pré β sont maintenant considérées comme des accepteurs préférentiels du cholestérol cellulaire (Castro GR. 1988). Ainsi l'activité de la CETP peut être importante dans la formation de particules HDL qui sont les premiers accepteurs du cholestérol dans la voie du transport inverse du cholestérol.

Régulation de l'activité de la CETP

L'activité de la CETP dans le plasma est la résultante de plusieurs facteurs, dont les contributions respectives ne sont pas encore complètement appréhendées. Si le taux de biosynthèse et la concentration plasmatique de la CETP sont des éléments importants, le nombre et la composition chimique des particules impliquées dans la réaction doivent être pris en considération. En effet, plusieurs études ont signalé le rôle important par exemple du cholestérol libre, des acides gras, de la composition des apolipoprotéines, des HDL dans la régulation de l'activité de la CETP. A ces différents facteurs, s'ajouterait l'existence d'inhibiteurs physiologiques de la CETP : apo F et Apo CI (Wang X 1999; Gautier T 2000).

Concentration plasmatique et variation physiopathologique de la CETP

La concentration plasmatique en CETP est de l'ordre de 1 à 2mg/l chez les hommes normolipidémiques et un peu plus élevée chez les femmes (Marcel YL 1990). Les études de corrélation n'ont pas montré une vraie relation entre les concentrations de CETP et celles des HDL (Marcel YL 1990; McPherson R 1991). En revanche, en cas de déficit génétique en CETP, les concentrations en CETP sont inversement proportionnelles aux HDL-C.

Il a été également décrit que les concentrations plasmatiques de CETP sont augmentées dans le cas d'hyperlipidémie de type III (McPherson R 1991) et chez les sujets obèses (Arai T 1994). Elles sont normales dans le cas d'hyperlipidémie de type IV (McPherson R 1991).

I.2.2 Récepteurs impliqués dans le métabolisme lipidique

I.2.2.1 La famille des Récepteurs LDL

Suite à la découverte du récepteur aux LDL, d'autres protéines transmembranaires avec homologie structurale ont été identifiées. L'ensemble de ces protéines forme la famille

des récepteurs LDL (LDLR, LRP, VLDLR) qui sont présents à la surface cellulaire. Ils reconnaissent tous l'apo E. Le complexe ligand LDL-récepteur ainsi formé est ensuite internalisé sous forme de vésicules intracellulaires ou endosome. Le faible pH à l'intérieur de l'endosome induit la dissociation du complexe libérant le récepteur qui peut être recyclé et transporté à nouveau à la surface où il continue à jouer son rôle. Les LDL sont livrées aux lysosomes où elles sont dégradées par hydrolyse enzymatique qui libère le cholestérol qui sera ensuite métabolisé. Ces récepteurs en conditions normales sont les responsables de la plupart de la captation des LDL plasmatiques.

1.2.2.2 La famille des récepteurs des HDL

La famille des récepteurs des HDL sera étudiée en détail dans la partie métabolisme des HDL.

1.2.3 Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides

En période post-prandiale, les lipides ingérés sont dégradés partiellement dans l'intestin par des enzymes particulières, les lipases. Les acides gras libres, les monoglycérides, les diglycérides et le cholestérol sont donc absorbés et ensuite sécrétés dans la circulation sous forme de chylomicrons. Les chylomicrons, lipoprotéines très riches en triglycérides, contiennent principalement les apolipoprotéines B48, CIII, E et AIV.

Avant de détailler le métabolisme des chylomicrons nous focaliserons notre attention sur l'absorption intestinale du cholestérol qui fait l'objet de nos travaux expérimentaux.

1.2.3.1 L'absorption intestinale du cholestérol

La plupart du cholestérol entrant dans la lumière intestinale est sous forme libre, avec seulement 10 à 15% sous forme estérifiée. Le cholestérol estérifié doit être hydrolysé par l'enzyme Carboxy Ester Lipase ou Cholesterol Ester Hydrolase avant de passer dans la lymphe.

L'origine de ce cholestérol libre qui se trouve dans la lumière intestinale est triple : alimentaire, biliaire ou provient de la dégénérescence de l'épithélium intestinal ce qui représente par jour 300-500mg, 800-1200mg et 300mg respectivement. Le pourcentage moyen d'absorption chez l'homme est de 50% (Wang David Q.-H 2003) et pourrait varier de 30 à 80%, selon les individus (Bosner SM 1999).

1.2.3.1.1 La captation entérocytaire du cholestérol

La solubilisation

Le cholestérol ainsi que les produits de la lipolyse pancréatique (acide gras, 2-mono glycérides, lysolécithine ainsi que les vitamines liposolubles possèdent une solubilité limitée dans l'environnement aqueux du milieu luminal. La bile fournit un détergent puissant pour la solubilisation de ces molécules – les acides biliaires. Les acides biliaires ont une structure amphipatique qui leur permet de former des micelles dans lesquelles les groupements polaires des lipides sont à la surface et se projettent dans le milieu aqueux, tandis que les parties apolaires sont à l'intérieur et fuient l'eau.

Le passage de la bordure en brosse

Le cholestérol est absorbé principalement dans le duodénum et le jéjunum (Lammert 2005). Le(s) mécanisme(s) responsable(s) de l'absorption intestinale du cholestérol est (sont) très mal connu(s) et sujet(s) à controverse. Il était admis que le processus de transfert à travers la bordure en brosse était une diffusion passive selon le gradient de concentration du cholestérol. Toutefois, de nombreux résultats indiquent l'existence d'un mécanisme énergie-indépendant impliquant une ou plusieurs protéines. Les protéines candidates sont :

SR-BI

Le « Scavenger Receptor class B type I » (SR-BI) est une protéine membranaire hautement Glycosylée de 82 kDa présentant une forte homologie avec le CD36 humain (Acton SL 1994; Rigotti A 1995). Le SR-BI d'hamster et son analogue humain CLA-1 ont des structures similaires.

La fonction principale de SR-BI est de permettre le transport du cholestérol libre et estérifié des HDL vers la membrane plasmique des cellules, sans internalisation de la lipoprotéine. Ce phénomène est appelé captation sélective (Acton S 1996). D'autres travaux ont montré qu'il peut faciliter la captation sélective du cholestérol non lipoprotéique et faciliter l'efflux vers les lipoprotéines ou des accepteurs phospholipidiques (Jian B 1998; Stangl H 1998).

Hauser et al 1998 (Hauser H 1998) ont montré que SR-BI est aussi un transporteur impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol. Ils ont observé que la protéine SR-BI était présente dans la bordure en brosse de cellules Caco-2.

De plus, la préincubation d'anticorps anti SR-BI inhibe partiellement la captation du cholestérol libre et estérifié à partir de micelles des acides biliaires ou des vésicules phospholipidiques par les bordures en brosse des villosités et les cellules Caco-2. Les travaux de Cai et al 2001 (Cai SF 2001) ont montré que l'expression de SR-BI dans les cellules Caco-2 dépend de leur état de différenciation et que la protéine est présente à la fois sur les membranes apicales et basolatérales.

Sa présence sur la surface basolatérale de l'intestin distal suggère son implication dans la captation intestinale du cholestérol de lipoprotéines.

Cependant, les souris KO (invalidées) en SR-BI absorbent plus de cholestérol au niveau intestinal comparées aux souris témoins (Mardones P 2001). Parallèlement, on observe une diminution de l'excrétion du cholestérol au niveau fécal. Ces deux résultats sur les souris KO suggèrent que SR-BI ne jouerait pas un rôle essentiel dans l'absorption intestinale du cholestérol. Cela suppose que d'autres mécanismes seraient capables de compenser efficacement la perte de SR-BI chez les souris KO.

Les souris transgéniques pour SR-BI ont également une absorption intestinale du cholestérol ainsi que des triglycérides significativement importante (Bietrix F 2006).

D'autres travaux ont été réalisés pour essayer de comprendre le rôle de SR-BI. En effet, il a été montré chez le porc une endocytose de SR-BI de la membrane apicale vers les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (Hansen GH 2003).

La protéine NPC1L1

Cette protéine a été découverte en 2004 par Altmann et al. (2004) (Altmann SW 2004) et Davis et al. (2004) (Davis HR 2004) et est considérée maintenant comme le transporteur intestinal du cholestérol de la lumière intestinale vers le cytosol. Pour l'identifier, les auteurs ont utilisé une méthode bioinformatique qui leur a permis de faire l'analyse génomique de transcrits de jéjunum de rat en sélectionnant les régions conservées chez l'homme et la souris et présentant les caractéristiques attendues d'un transporteur de cholestérol. NPC1L1 (Nieman

Pick C1 Like1) est sorti comme le seul gène candidat. Il présente 50% d'homologie avec NPC1, gène défectueux dans la maladie de Nieman Pick de type C caractérisée par une accumulation de cholestérol dans les lysosomes. De plus l'ARNm de NPC1L1 est exprimé principalement dans l'intestin, avec une variation selon les différents segments, le plus fort taux étant au niveau du jéjunum proximal, le plus faible au niveau de l'iléon. Cette expression est confinée à la bordure en brosse du côté apical. En ce qui concerne l'intestin humain l'expression de NPC1L1 est aussi localisée au niveau du jéjunum. De plus, NPC1L1 a été localisé du côté apical dans l'intestin humain et les cellules Caco-2 avec une apparition dans la membrane de la bordure en brosse, un site crucial dans l'absorption intestinale. Il est aussi présent dans des compartiments cellulaires des entérocytes humains tels que les lysosomes et les mitochondries (Sane AT 2006).

Pour analyser *in vivo* le rôle de NPC1L1 sur l'absorption intestinale du cholestérol Altmann et *al.* (2004) (Altmann SW 2004) ont ensuite caractérisé des souris NPC1L1 déficientes (-/-). Ces souris présentent une diminution de l'absorption du cholestérol alimentaire par rapport à des souris normales (+/+), lors d'un régime alimentaire normal. Cependant ces mêmes souris NPC1L1 (-/-) présentent des concentrations de lipides plasmatiques similaires aux souris sauvages. Or la diminution de près de 80% de l'absorption intestinale du cholestérol observée chez ces souris est accompagnée de l'activation des gènes de l'HMG-CoA réductase au niveau intestinal et de l'HMG-CoA synthétase au niveau hépatique. La diminution de l'absorption du cholestérol chez ces souris serait donc compensée par ces deux enzymes, permettant ainsi le maintien d'une concentration normale du cholestérol. Les mêmes effets sont caractérisés chez les patients traités par l'ezetimibe. Sane *et al.* (2006) (Sane AT 2006) ont montré des résultats similaires pour les cellules Caco-2. En effet la diminution de l'expression de NPC1L1 de cellules Caco-2 entraîne la diminution de leur capacité à capturer le cholestérol. Cela mène aussi à l'augmentation de l'activité et du taux d'ARNm de l'HMGCoA reductase ainsi qu'à la diminution de l'activité et du taux de ARNm de l'ACAT (Acyl-CoA Cholesterol Acyl Transferase).

L'ezetimibe, inhibiteur direct de l'absorption intestinale du cholestérol a été récemment approuvé dans le traitement des patients hypercholestérolémiques. Chez les souris NPC1L1 (+/+) le traitement par ezetimibe diminue l'absorption intestinale du cholestérol de 68 à 73%, taux similaire à celui des souris NPC1L1 (-/-) non traitées. De plus l'ezetimibe ne modifie pas l'absorption intestinale chez les souris NPC1L1 (-/-). NPC1L1 ou une protéine associée pourrait donc être la cible thérapeutique de l'ezetimibe (Altmann SW 2004).

Ces données suggèrent que la co-administration d'ezetimibe et de statines, inhibiteur de la synthèse du cholestérol, pourrait être efficace. En inhibant à la fois l'absorption et la synthèse de cholestérol on observe un effet synergique sur la cholestérolémie (Davis HR 2004).

NPC1L1 joue donc un rôle clé dans l'absorption intestinale et le maintien de l'homéostasie du cholestérol.

Les transporteurs ABC

ABCG5/G8: ATP Binding Cassette G5/G8

Les individus affectés de sitostérolémie, une maladie rare autosomale et récessive, hyper-absorbent les phytostérols, comme le sitostérol, et le cholestérol. Les patients (1/500000) développent l'athérosclérose et souffrent de MCV. Miettinen (Miettinen TA 1980; Berge KE 2000) ont observé que la sitostérolémie est causée par les altérations de 2 gènes exprimés dans le foie et l'intestin, ABCG5 et ABCG8, codant pour 2 transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) : la stéroline-1 et la stéroline-2. Ils suggèrent que la stéroline-1 et -2 sont 2 moitiés de transporteurs ABC associés pour générer un complexe fonctionnel impliqué dans l'exclusion intestinale du cholestérol alimentaire. Ces deux semi-transporteurs sont exprimés sur la membrane apicale des entérocytes et des canalicules biliaires hépatiques et agissent en partenariat sous forme d'hétérodimères, pour former une pompe fonctionnelle à efflux. En effet, la surexpression des stérolines chez la souris induit une augmentation de la sécrétion du cholestérol dans la bile et une diminution de son absorption au niveau de l'intestin (Yu L 2002). En revanche, chez les souris Knock Out ou déficientes en ABCG8 (*ABCG8^{-/-}*) les sécrétions du cholestérol biliaire sont réduites alors que l'absorption intestinale du cholestérol et du sitostanol est augmentée (Klett EL 2004). La stéroline-1 et la stéroline-2 agissent donc en hétérodimères pour transporter les stérols de l'entérocyte vers la lumière intestinale, avec une plus grande affinité pour les phytostérols.

ABCA1 : ATP Binding Cassette A1

ABCA1 est responsable de l'efflux de cholestérol du pool intracellulaire vers la membrane plasmique, première étape du transport inverse conduisant le cholestérol des tissus

périphériques vers le foie. La déficience en ABCA1 a pour conséquence la maladie de Tangier caractérisée par une diminution de la concentration des HDL (Hoffman HN 1965). Il a été démontré qu'il participe à l'efflux du cholestérol entérocytaire au pôle basolatéral (Plosch T 2002; Mulligan JD 2003) et à la formation des HDL (Hussain MM 2005). Récemment, il a été démontré que la délétion de l'ABCA1 intestinal aboutit à la diminution des niveaux de HDL (Brunham LR 2006).

De plus, des souris déficientes en ABCA1 montrent une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol, et à l'inverse des souris chez qui l'expression de l'ARNm de ABCA1 est augmentée présentent une diminution de l'absorption du cholestérol. Il existe donc une relation inversement proportionnelle entre le taux d'expression intestinale de l'ARNm de ABCA1 et l'absorption intestinale du cholestérol (Knight BL 2004).

ABCA1 jouerait donc un rôle dans l'efflux de cholestérol de l'entérocyte vers le lumen mais aussi au pôle basolatéral dans la formation des HDL, lipoprotéines athéroprotectrices.

L'ACAT-2

Le cholestérol capté et restant dans l'entérocyte rejoint le pool de cholestérol libre du réticulum endoplasmique où il est estérifié dans le but d'être exporté dans la lymphe intégré à des lipoprotéines.

La principale enzyme responsable de cette estérification est l'ACAT2. Cette enzyme joue un rôle important dans l'absorption du cholestérol, puisque son inhibition conduit à une réduction de la sortie lymphatique du cholestérol estérifié (Tso P 1991). Récemment des études chez la souris ACAT (-/-), ont montré que l'absorption du cholestérol est fortement diminuée, et que même sous régime riche en cholestérol ces souris ne développent pas d'hypercholestérolémie (Buhman KK 2000).

Cette enzyme a été proposée comme étant une cible thérapeutique dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

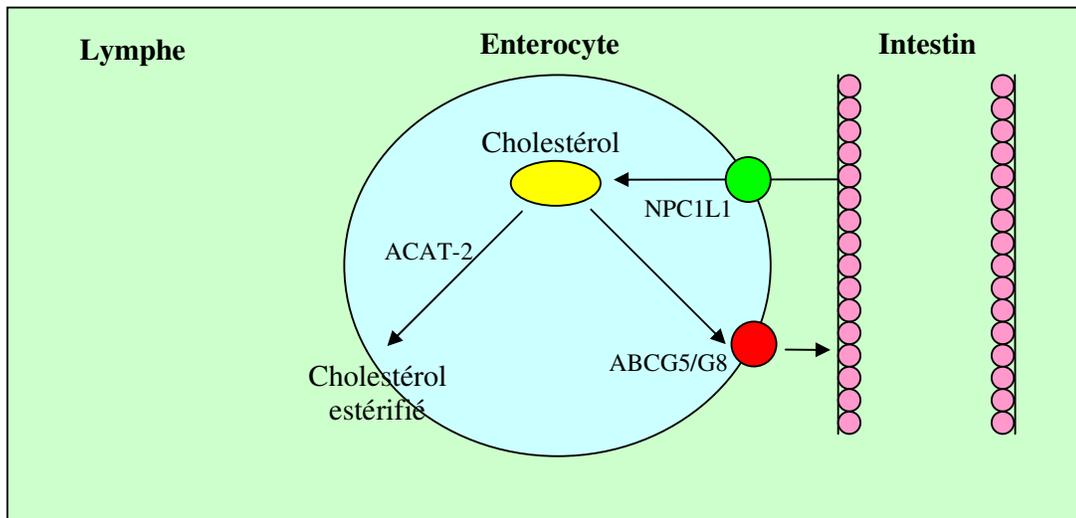


Figure 2 : L'absorption intestinale du cholestérol

1.2.3.1.2 Régulation de l'absorption du cholestérol

Le rôle des transporteurs ABC dans l'absorption du cholestérol est maintenant bien documenté. Plusieurs travaux ont montré que le transporteur ABCA1 est sensible aux variations intracellulaires de stérols ou ses dérivés par l'intermédiaire des facteurs de transcription LXR (Liver X receptor) et RXR (Retinoid X Receptor) (Lawn RM 1999; Santamarina-Fojo S 2000; Repa JJ 2002) qui se fixent sur un site de fixation se trouvant sur le promoteur du gène (Schwartz K 2000). Lorsque ces récepteurs sont activés par le cholestérol des LDL (Liao H 2002) ou par leurs ligands, tels que le 27 hydroxy-stérol (Repa JJ 2000), la transcription du gène ABCA1 est accrue. De même, il a été montré une augmentation de l'expression des récepteurs ABCG5/G8 avec la concentration du cholestérol intracellulaire d'origine alimentaire (Repa JJ 2002).

Récemment, il a été démontré que les activateurs de LXRs diminuaient l'expression de l'ARNm de NPC1L1 dans les cellules Caco-2 (Duval C 2006) et augmentaient l'expression de l'enzyme cholestérol 7-alpha hydroxylase. Cette enzyme régule la synthèse des acides biliaires (Peet DJ 1998). D'autres récepteurs nucléaires au niveau hépatique influencent indirectement l'absorption du cholestérol, c'est le cas des FXR (Farnesoid X Receptor). En effet, il a été démontré que les FXR stimulent l'expression du transporteur des acides biliaires dans la bile (Lambert G 2003)

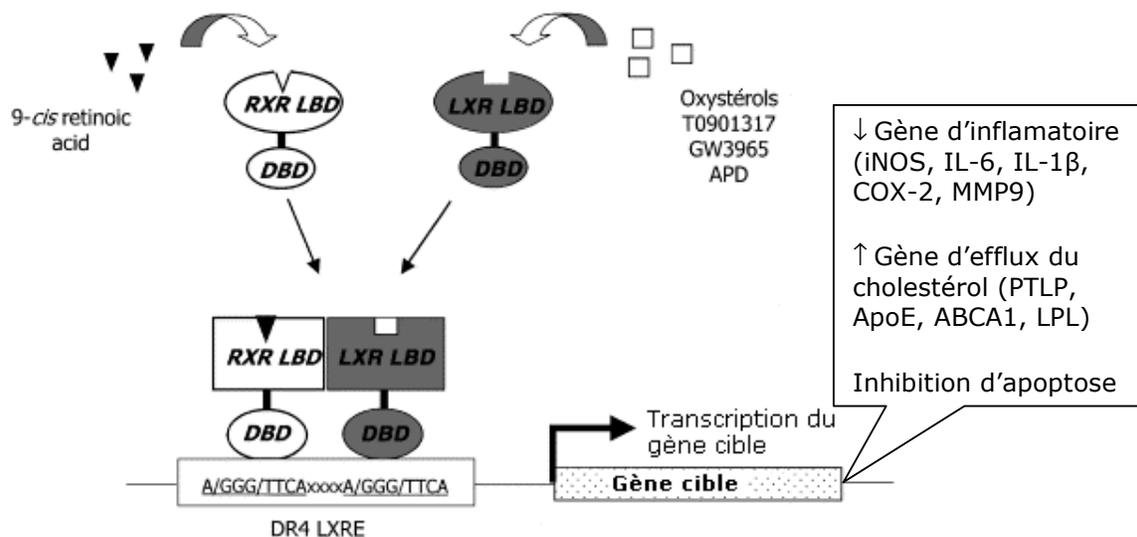


Figure 3: Mécanisme d'action du LXR

1.2.3.1.3 L'assemblage des lipoprotéines et rôle de la protéine MTP

L'intestin grêle synthétise les chylomicrons pour transporter les lipides et les vitamines liposolubles dans le sang. L'assemblage de ces lipoprotéines implique 3 événements indépendants (Hussain MM 2000).

L'assemblage de lipoprotéines primordiales

Des phospholipides, du cholestérol libre et du cholestérol estérifié sont associés à l'apolipoprotéine B 48 au fur et à mesure de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) ; La MTP « Microsomal Triglyceride Transfer Protein », semble être impliquée dans le transport des lipides neutres vers le site où l'apoB48 est associée à la membrane du réticulum endoplasmique.

Il faut noter que la MTP a été également localisée au niveau apical, dans la membrane des bordures en brosse (Slight I 2004), ce qui suggère d'autres processus pour l'instant inconnus.

La synthèse des gouttelettes lipidiques riches en triglycérides (TG)

La formation des gouttelettes lipidiques riches en triglycérides est facilitée par la présence de la MTP qui joue un rôle de stabilisateur. La taille des gouttelettes dépend de la nature de TG inclus.

La formation des lipoprotéines naissantes

A la jonction entre le réticulum endoplasmique lisse (REL) et le RER, fusionnent les lipoprotéines primordiales avec les gouttelettes lipidiques, conduisant à l'expansion du cœur des lipoprotéines primordiales et la synthèse des lipoprotéines. Les particules sont alors transportées vers l'appareil de Golgi où elles acquièrent d'autres lipides et apolipoprotéines. L'apoB48 y est modifiée par glycosylation, ce qui favorise la formation de chylomicrons et leur libération dans l'espace intercellulaire au niveau des puits recouverts de clathrine dans la membrane basolatérale.

Etant donné le rôle crucial de la MTP dans la sécrétion des chylomicrons, son inhibition représente une cible thérapeutique potentielle. En effet, son inhibition au niveau intestinal a déjà été réalisée et les résultats sont encourageants (Aggarwal D 2005).

1.2.3.1.4 Influence des phytostérols sur l'absorption intestinale du cholestérol et sur le métabolisme lipidique

Les phytostérols

Les phytostérols sont des composés structurellement proches du cholestérol. Ils ne diffèrent du cholestérol que par leur chaîne latérale (Ling WH 1995). Ils remplissent le rôle du cholestérol chez les végétaux dans lesquels ils sont essentiellement trouvés (plantes, oléagineux, germes de blé..). Le principal phytostérol est le bêta-sitostérol.

Les apports spontanés en phytostérols et phytostanols (homologues structuraux hydrogénés des phytostérols) sont d'environ 310 ± 100 mg (hommes) et 303 ± 100 mg (femmes) chez les britanniques (Andersson SW 2004) jusqu'à 400mg dans une population indienne (Jones PJ 1997).

Depuis peu les phytostérols sont estérifiés pour être incorporés dans des aliments (margarines, produits laitiers..) qui en sont les vecteurs (Korpela R 2006). Des capsules, existent également (Nissinen MJ 2006) et sont commercialisées comme compléments alimentaires.

Absorption des phytostérols et leur influence sur l'absorption intestinale du cholestérol

Même s'ils sont consommés et digérés, les phytostérols ne sont que très peu absorbés chez l'homme. En effet pour être incorporé aux chylomicrons, le cholestérol doit être estérifié par une enzyme, l'ACAT. Or les phytostérols ne sont pas de bons substrats de cette enzyme (Ntanios FY 1998).

Ils restent donc sous leur forme libre et n'intègrent que très peu les chylomicrons. De plus, Une fois dans le tube digestif, les phytostérols forment avec le cholestérol des micelles. Il semble que les phytostérols diminuent le taux d'incorporation du cholestérol dans ces mêmes micelles. Il y a donc une compétition entre le cholestérol et les phytostérols pour entrer dans les micelles. Ces micelles formées passeraient donc la membrane apicale de l'entérocyte composées de plus de phytostérols que de cholestérol. Ceci explique donc la diminution observée du taux de cholestérol absorbé. Or ceci n'est qu'une des explications et non loin la plus importante. En effet, Les phytostérols entrent dans l'entérocyte mais sont très peu sécrétés dans le plasma sous forme de chylomicrons. En effet un très faible pourcentage de phytostérols est absorbé (5% pour le sitostérol), sauf en cas de pathologie la sitostérolémie. En effet, les sujets sitostérolémique hyperabsorbent les phytostérols. Cette affection est due à une mutation sur l'un des deux gènes ABCG5 ou ABCG8 codant pour les semi-transporteurs des phytostérols.

Une partie des phytostérols peut être oxydée en oxyphytostérols activant ainsi LXR, stimulant l'expression des gènes ABCG5/G8 responsables de l'expulsion du cholestérol et des stérols végétaux dans la lumière intestinale. Ils induisent aussi l'expression d'ABCA1 susceptible d'accroître l'efflux de cholestérol hors des entérocytes vers la lumière intestinale (Plat J 2005).

Effets des phytostérols sur les lipides plasmatiques

Chez l'homme l'addition de 1 g de phytostérols à une alimentation riche en cholestérol réduit l'absorption du cholestérol d'environ un tiers et augmente l'excrétion fécale de cholestérol. La

diminution du cholestérol hépatique induit une augmentation de la synthèse des récepteurs des LDL entraînant ainsi une diminution dose dépendante du cholestérol plasmatique (7 à 10%) et du cholestérol LDL (8 à 15%) (Weststrate JA 1998; Hendriks HF 1999).

Il n'est pas exclu que l'effet hypocholestérolémiant de certaines huiles soit lié à la présence en teneur variable de phytostérols dans ces huiles (Ostlund RE 2002). Ainsi, l'effet plus hypocholestérolémiant des huiles de Colza et de maïs que de l'huile d'olive pourrait s'expliquer par leur teneur un peu plus élevée en phytostérols (Howell TJ 1998).

Effets des phytostérols sur l'athérosclérose

Les études sont peu contradictoires chez l'animal que chez l'homme. En effet, il a été rapporté que la consommation de phytostanols entraîne une réduction des LDL oxydées, de l'apoB et de la CETP (Homma Y 2003) chez les japonais sains, ce qui a priori est favorable. Une autre étude n'a pas retrouvé cet effet au cours d'une intervention de six semaines après prise de phytostérols (Korpela R 2006).

Une autre étude a montré que les stérols associés ou non à l'exercice physique chez les sujets Hypercholestérolémiques diminuent la concentration du cholestérol dans toutes les particules de LDL quelles que soient leurs tailles (Varady KA 2005)

Chez l'animal, les études ont été menées sur le développement de l'athérosclérose. Chez la souris déficiente en apoE (modèle développant l'athérosclérose spontanément), l'addition de phytostérols a permis une réduction des lésions aortique (Moghadasian MH 1997). De même, chez la souris apoE3-Leiden, les phytostanols ont réduit la taille lésions (Volger OL 2001). Chez le lapin l'addition de sitostanol dans un régime enrichi en phytostérols a diminué la plaque de manière dose dépendante (Ikeda I 1981; Ntanios FY 1998).

1.2.3.2 Métabolisme des chylomicrons

Dans la circulation sanguine, les chylomicrons subissent l'action de la LPL (Lipoprotéine lipase) qui hydrolyse les triglycérides, libérant ainsi les acides gras et le glycérol. Lors de ce processus, les chylomicrons résiduels riches en esters de cholestérol sont obtenus. Ces particules sont captées par le foie grâce aux récepteurs LRP (LDL-Receptor Related Protein) et LDL-R (Low Density Lipoprotein Receptor) après reconnaissance de leur apoE.

Les chylomicrons remants peuvent également être captés par les macrophages. En effet, Brown et al., (Brown ML 2000), ont montré que les macrophages reconnaissent ces lipoprotéines grâce au récepteur spécifique pour l'apoB48 et qu'ils se transforment en cellules sumeuses riches en lipides. Cette découverte renforce l'idée du pouvoir athérogène des chylomicrons remnants.

1.2.3.3 Métabolisme des VLDL

En période de jeûne les VLDL synthétisées par les hépatocytes, remplacent les chylomicrons dans leur rôle de transporteurs des lipides. Elles sont également riches en triglycérides et contiennent l'apolipoprotéine B100 comme protéine majoritaire.

Dans la circulation, les chylomicrons et les VLDL subissent l'action de l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL), attachée à l'endothélium vasculaire, qui dégrade les triglycérides en glycérol et acides gras libres qui sont utilisés *in situ* ou stockés dans le tissu adipeux. Parallèlement ces lipoprotéines riches en triglycérides réalisent des échanges avec les HDL par l'intermédiaire de l'enzyme CETP. Elles cèdent des triglycérides aux HDL qui, en retour leur transfèrent du cholestérol estérifié et les apolipoprotéines C et E. Les VLDL s'enrichissent en cholestérol estérifié et s'appauvrissent en triglycérides en se transformant progressivement en lipoprotéines de densité plus élevée, les IDL puis des LDL. Finalement les chylomicrons riches en cholestérol estérifié et pauvres en triglycérides, appelés chylomicrons résiduels, sont captés par le foie où ils vont être dégradés. L'ensemble des lipoprotéines, VLDL, IDL et LDL, peut être capté à tout moment par le foie ou par les tissus périphériques grâce au récepteur B/E. Ceci permet d'apporter les lipides aux tissus périphériques. Seul le foie peut recycler ou excréter les lipides, en particulier le cholestérol sous forme d'acides biliaires.

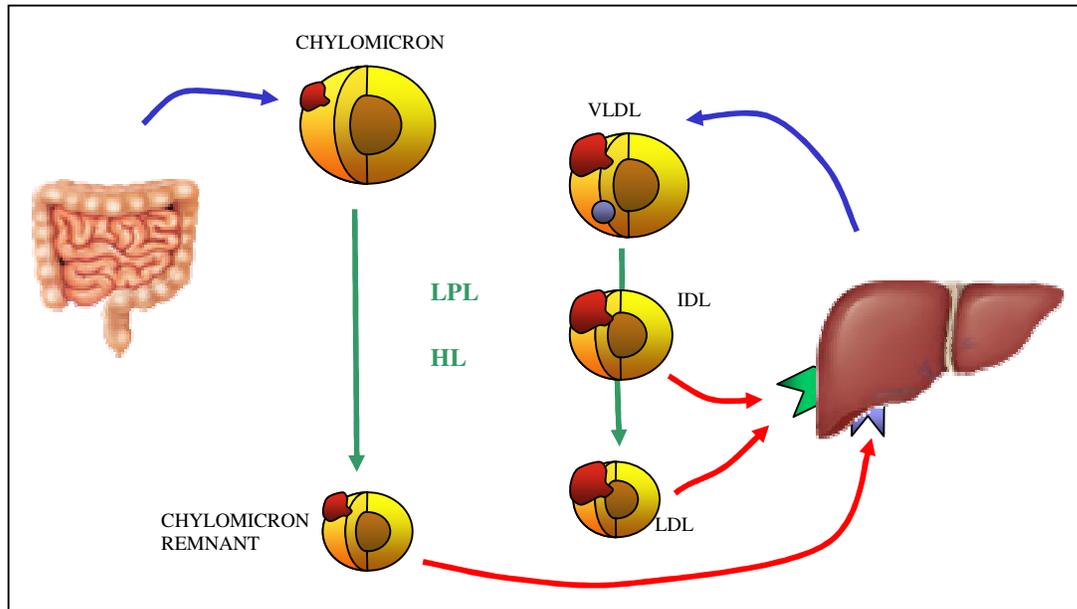


Figure 4 : Représentation schématique du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides.

I.2.4 Métabolisme des HDL

I.2.4.1 Origine des HDL

L'origine des HDL est triple. Les particules peuvent être synthétisées au niveau hépatique, au niveau intestinal, mais elles peuvent également provenir du métabolisme intravasculaire des lipoprotéines (Eisenberg S. 1984).

Les HDL d'origine hépatique, isolées à partir de perfusat de foie de rat, sont sécrétées sous forme de disques bi-lamellaires composés essentiellement de PL, de cholestérol non estérifié et d'apo E, AI et C (Hamilton RL . 1976; Eisenberg S. 1984).

Les HDL d'origine intestinale ont un contenu en apo AI et Apo AIV bien plus important que les HDL d'origine hépatique (Green PHR. 1978; Wu 1979).

Les HDL d'origine intestinale ou hépatique pourraient provenir soit de la synthèse directe d'HDL naissantes, soit de l'association des PL, provenant des cellules, avec des apolipoprotéines sécrétées par le foie et l'intestin sous forme libre (Hara 1991). Les apolipoprotéines peuvent également être synthétisées par d'autres cellules que les cellules hépatiques ou intestinales (ex. macrophages) (Mazzone 1987).

L'origine intra-vasculaire des HDL est le résultat du catabolisme ou du remaniement, dans la circulation, des lipoprotéines existantes. C'est ainsi que la lipolyse des lipoprotéines

riches en TG (VLDL, chylo) sous l'action de la LPL serait à l'origine des HDL. Les lipoprotéines subissent donc des hydrolyses qui tendent à réduire le volume de leur noyau (centre de la lipoprotéine). Cette hydrolyse rend excédentaire les composés de surface (PL, Cholestérol libre, apo AI, AII, AIV, C...) qui sont alors libérés sous forme de disques bi-lamellaires comparables aux HDL naissantes (Patsch 1978). Une autre origine intra-vasculaire est la formation des particules pré- β sous l'action de la triglycéride Lipase Hépatique (TGL-H) et la CETP. Sous l'action de la CETP les HDL₂ échangeraient leur cholestérol estérifié contre des TG des VLDL. Les HDL₂ ainsi enrichies en TG produisent les pré- β 1 HDL sous l'action de la TGLH. Cette particule serait capable de capter le cholestérol libre cellulaire pour se transformer en HDL pré- β 2 puis en HDL pré- β 3 qui sous l'action de la LCAT pourrait donner naissance à des HDL3 (Castro 1988; Barrans A. 1994; von Eckardstein 1996).

1.2.4.2 Récepteurs et transporteurs impliqués dans le métabolisme des HDL

1.2.4.2.1 Le récepteur scavenger B1 (SR-B1)

Il est localisé principalement à la surface des cellules du foie et des tissus stéroïdiens. Il intervient dans la captation sélective des lipides et du cholestérol estérifié, par les cellules. Il s'agit d'un récepteur multi-ligand. Il interagit avec un grand nombre de particules, HDL, LDL, LDL oxydées. Il a été suggéré que le SR-B1 et la TGLH agissent de concert dans la captation cellulaire sélective du cholestérol estérifié des HDL (Komaromy 1996; Wang 1996; Rigotti 1997a; Amar 1998; Bergeron 1998). Chez la souris, la sur-expression du SR-B1 entraîne la diminution des HDL et l'augmentation des sels biliaires (Kozarsky 1997; Sehayek 1998; Wang 1998; Ueda 1999). Chez les souris invalidées pour le SR-B1 la concentration du cholestérol plasmatique est augmentée avec augmentation de la taille des HDL riches en apo E (Rigotti 1997b).

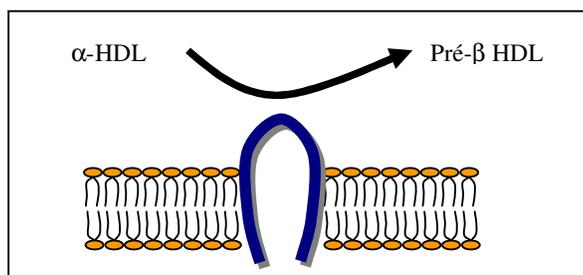


Figure 5 : Représentation schématique du récepteur SR-B1.

Cependant le mécanisme d'action de cette captation sélective des lipides et du cholestérol estérifié par le SR-B1 est contesté, puisque Silver et al (Silver 2001) ont suggéré l'internalisation du complexe SR-B1-HDL et la re-sécrétion de ces HDL déplétées en cholestérol estérifié.

1.2.4.2.2 Transporteurs Adenosine Triphosphate-Binding Cassette « ABC »

La famille des transporteurs Adenosine Triphosphate-Binding Cassette comprend au moins 4 transporteurs, ABCA1, ABCG1, ABCG5 et ABCG8. Ils modulent le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines et ils sont responsables de la translocation des substrats lipophiles (phospholipides, acides biliaires et stérols) chez les procaryotes et les eucaryotes.

ABCA1

L'ABCA1 a été identifié pour la première fois comme le gène responsable de la maladie de Tangier. C'est une maladie génétique caractérisée par des amygdales oranges, altération des paramètres lipidiques (diminution du cholestérol plasmatique, diminution de la concentration des LDL, diminution des apo AI et apo AII, des HDL, avec augmentation des triglycérides), accumulation du cholestérol dans les tissus et dans les macrophages. Les patients développent prématurément des maladies cardiovasculaires (Brooks-Wilson 1999). Une mutation au niveau du gène de l'ABCA1 est à l'origine de cette maladie. Ce transporteur est présent dans le foie, les macrophages périphériques et autres tissus (Bortnick 2000). L'ABCA1 permet l'efflux du cholestérol et des phospholipides des cellules vers des accepteurs apolipoprotéiques, principalement l'apo AI pauvre en lipides, ce qui aboutit à la formation des particules pré β -HDL. Les souris invalidées pour l'ABCA1 ont des niveaux plasmatiques de cholestérol et phospholipides diminués avec une absence de HDL dans le plasma (Christiansen-Weber 2000; McNeish 2000; Orso 2000). Les souris transgéniques qui expriment l'ABCA1 humaine présentent une concentration de cholestérol plasmatique augmentée, liée à une augmentation du cholestérol dans les HDL d'origine hépatique (Vaisman 2001) et une augmentation du transport inverse du cholestérol.

ABCG1

Le transporteur ABCG1 est fortement exprimé dans les macrophages, les tissus nerveux et dans l'œil (Nakamura 2004). Récemment il a été montré qu'il participe à l'efflux du cholestérol cellulaire vers des HDL matures, HDL₂ et HDL₃ et n'a aucun effet sur l'efflux médié par l'apo AI et l'ABCA1 (Wang 2004).

1.2.4.3 Les rôles des HDL / Transport inverse de cholestérol

Pour expliquer le rôle protecteur des HDL vis à vis de l'athérosclérose, Glomset (Glomset 1968) a suggéré le cycle des HDL. Selon cet auteur de petites HDL auraient la capacité de se charger en cholestérol provenant des cellules périphériques, lequel sera livré au foie pour son catabolisme. Ce processus est appelé « transport inverse de cholestérol », dont la première étape nommée « efflux du cholestérol » est la sortie du cholestérol libre des cellules vers des accepteurs. 3 mécanismes pour cet efflux ont été décrits :

➤ La diffusion du cholestérol en milieu aqueux : Le cholestérol libre des membranes plasmiques des cellules peut être capté par simple diffusion vers les lipoprotéines. Les molécules diffuseraient dans le milieu aqueux jusqu'à ce qu'elles soient absorbées par les particules acceptrices contenant des PL et pauvres en cholestérol. Potentiellement, toutes les lipoprotéines peuvent capter ce cholestérol, bien que les HDL de petits tailles soient les meilleurs accepteurs (Rothblat 1982).

➤ L'efflux médié par SR-B1 : Dans ce mécanisme, le récepteur SR-B1 (Rigotti 1997b) initie le flux bidirectionnel du cholestérol libre, la direction de ce flux dépendant du gradient de cholestérol libre. Cependant ce récepteur a été décrit comme une protéine qui joue un rôle dans la captation sélective des esters de cholestérol (Acton 1996).

➤ L'efflux médié par ABCA1 : Le dernier mécanisme implique l'action du transporteur ABCA1. L'efflux du cholestérol initié par l'ABCA1 est unidirectionnel, des cellules vers les accepteurs pauvres en lipides. Parmi ceux-ci l'apo AI (principal accepteur), l'apo AII, l'Apo AIV, l'apo E ou les apo CI, CII et CIII. Cet efflux aboutit à la formation des particules HDL (pré-β) (Remaley 2001).

Le cholestérol libre au sein des HDL issu des 3 mécanismes est ensuite estérifié par la LCAT, ce qui permet de maintenir un gradient négatif du cholestérol libre. Sous l'action de la LCAT ces particules deviendraient des HDL₂, grosses particules sphériques riches en esters de cholestérol. Ces HDL₂ pourraient alors céder leur cholestérol estérifié aux lipoprotéines

riches en TG (chylomicrons, VLDL, IDL ou LDL) en échange des TG grâce à la CETP. L'enrichissement en TG qui en découle leur permet d'être hydrolysées par la HTGL qui permet de recycler les HDL sous forme de HDL₃. Les HDL₂ pourraient également céder leur cholestérol estérifié aux cellules hépatiques capables d'éliminer le cholestérol de l'organisme sous forme d'acides biliaires.

Ce cholestérol transféré aux lipoprotéines riches en TG sera livré au foie par l'intervention du LDLR ou du LRP. Il peut également être directement transféré des HDL vers le foie par l'intervention du SR-B1.

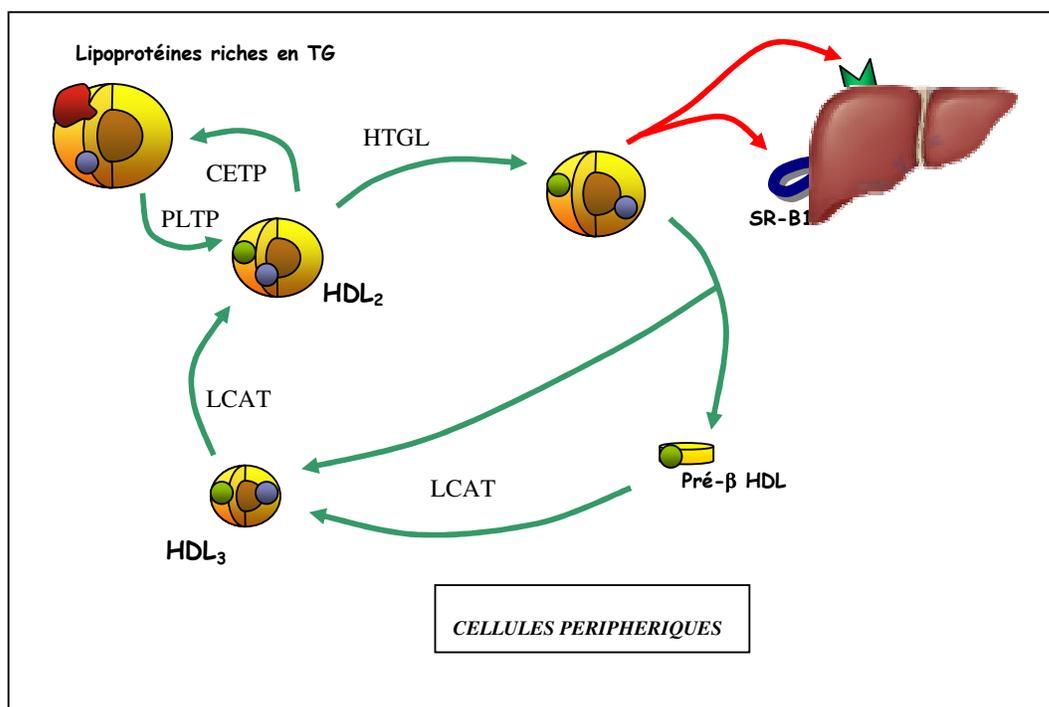


Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme des HDL.

II. PPAR : Facteur de transcription impliqué dans le métabolisme lipidique

Les récepteurs activés par des inducteurs de la prolifération des peroxysomes. (Peroxisom Proliferation Activated Receptors ou PPAR) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (Schoonjans K 1996). Ils sont des facteurs de transcription activés par certaines acides gras et/ou leurs métabolites (Forman 1997; Kliewer SA 1997). Ils pourraient exercer leur fonction régulatrice directement sur de nombreux gènes (Schoonjans K 1996) en signalant un changement de l'apport nutritionnel en particulier dans sa composante lipidique.

II.1 Mécanisme d'action

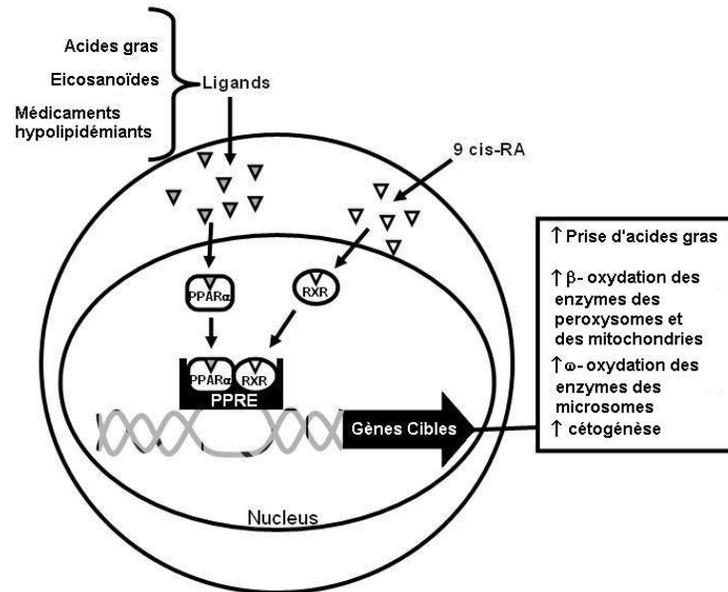


Figure 7 : Mécanisme d'action des PPARs

Activés par la fixation de leurs ligands, les PPARs forment des hétérodimères avec des récepteurs de l'acide rétinoïque 9 cis (RXR ou Retinoid X Receptor) (Kliwer SA 1992) et influent sur la synthèse des gènes cibles. En effet, les hétérodimères PPAR-RXR se lient à des séquences d'ADN, appelés éléments de réponse aux PPARs ou Peroxisome Proliferator Response Elements (PPRE), comprenant une séquence hexanucléotidique AGGTCA deux fois répétés, séparée par un ou deux nucléotides. Cette région est située dans la région promotrice des gènes cibles (Chinetti G 2000).

II.2 Distribution tissulaire :

Les PPARs présentent une expression tissulaire différente. Les PPARα s'expriment principalement dans le foie, le rein, le muscle, le cœur, le tissu adipeux brun et la muqueuse intestinale (Bishop-Bailey D 2000). Les PPARδ (β) sont ubiquitaires. Les PPAR γ quant à eux, existent sous trois formes (γ1, γ2, et γ3). Ils sont exprimés principalement dans le tissu adipeux et le tractus gastro-intestinal, en particulier le côlon. (Auboeuf D 1997). Les PPARγ3 sont exprimés dans le tissu adipeux blanc, les macrophages et le côlon (Chinetti G 1998).

II.3 Les principaux ligands des PPARs

Les PPARs peuvent être activés par 2 types de ligands :

- ligands naturels
- ligands pharmacologiques

II.3.1 Les ligands naturels

Différents acides gras sont capables de se lier et d'activer les PPARs (Forman 1997; Kliewer SA 1997). L'acide linoléique fait partie des meilleurs activateurs (Yu K 1995) et peut activer 3 types de PPARs. Parmi les eicosanoïdes on signale différents ligands de PPARs. Ainsi en ce qui concerne PPAR γ , la prostaglandine PGJ₂, semble être un ligand plus efficace que ses précurseurs (Kliewer SA 1995). Pour PPAR α , le leucotriène B₄ (Devchand PR 1996) et les acides hydroxy eicosapentaénoïque (HEPE) et hydroxy eicosatétraénoïque (HETE) ont été identifiés comme des ligands activateurs (Kliewer SA 1997). Concernant les PPAR β ou δ , plusieurs acides gras polyinsaturés peuvent les activer (Forman 1997; Krey G 1997), et la prostaglandine I₂ semble être un ligand très efficace.

II.3.2 Les ligands pharmacologiques

Les fibrates, médicaments hypolipémiants sont les ligands privilégiés des PPAR α . Leur liaison à ces récepteurs induit l'activation ou l'inhibition d'une multitude de gènes engagés dans le métabolisme des lipides (Fruchart JC 1999). Les thiazolidinediones (Pioglitazone, Rosiglitazone..) ayant une haute affinité pour PPAR γ sont des médicaments antidiabétiques améliorant la sensibilité à l'insuline (Nolan JJ 1994; Lehmann JM 1995).

En plus de la régulation ligand-dépendante, il a été montré que les PPARs peuvent être phosphorylés par les kinases. Cette phosphorylation augmente l'activité transcriptionnelle des PPAR α (Shalev A 1996; Blanquart C 2004; Burns KA 2007) et diminue celle de PPAR γ (Hu E 1996; Burgermeister E 2007). Enfin, il est important de noter que l'interaction avec les co-facteurs est un mécanisme fondamental de la régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Ce processus correspond à la " transactivation ". Il existe une série de protéines accessoires qui se lient aux PPAR(s) à la manière de ligands dont le rôle de "co-activateurs" permet l'initiation de la transcription du gène cible. Il existe trois classes de

protéines co-activatrices : 1) celles qui modifient la structure de la chromatine par leur activité histone acétylase (ie : SRC1 et CBP/p300) ; 2) celles du complexe DRIP/TRAP qui interagissent avec la machinerie permettant la transcription (PBP/TRAP220) ; 3) celles, enfin, dont les fonctions sont mal définies (PGC1, RIP140 et AR70). Le nombre de ces cofacteurs est à ce jour très nombreux (Glass CK 1997; Torchia J 1998; Yuan CX 1998; Ge K 2002; Misra P 2002).

II.3.3 PPARs et métabolisme lipidique chez l'homme

Chez l'homme, les fibrates diminuent les concentrations circulantes de triglycérides et augmentent celles du HDL-C (Staels B 1998). La réduction de la concentration des triglycérides est due à une diminution de la synthèse hépatique de VLDL et une augmentation de leur lypolyse intra-vasculaire. Les fibrates stimulent l'entrée des acides gras dans les mitochondries et leur β -oxydation, ce qui diminue les quantités d'acides gras libres disponibles pour la synthèse hépatique des triglycérides-VLDL. Plusieurs gènes impliqués dans le transport membranaire des acides gras et dans la β -oxydation possèdent un PPRE dans leur région promotrice. De plus les fibrates augmentent l'activité de la LPL, enzyme responsable de l'hydrolyse des triglycérides, par deux mécanismes : la stimulation de l'expression du gène qui code pour cette enzyme et la diminution de la synthèse de l'apoCIII, inhibiteur naturel de LPL.

Les activateurs PPARs n'exercent pas seulement leur action via une augmentation des lipoprotéines riches en TG mais aussi en augmentant le catabolisme des acides gras libérés au cours de la lypolyse. En effet, ils activent la transcription des transporteurs des acides gras (Fatty Acid Transport Protein) qui facilitent le passage membranaire des acides gras libres (Martin G 2000), suivie d'une augmentation de l'expression de l'acyl CoA synthase, qui catalyse leur activation dans le cytosol (Martin G 2000). L'expression des carnitine Palmitoyl Transferase 1 et 2 (CPT1 et 2), enzymes permettant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie ainsi que les enzymes de la β -oxydation sont aussi augmentées par l'activation de PPAR α (Brandt 1998; Mascaro C 1998).

De plus, il a été montré que les PPARs inhibent la synthèse de novo d'acides gras, diminuant ainsi le niveau d'acides gras intracellulaires disponibles pour la synthèse des TG (Blake WL 1990). Cette inhibition s'effectue via la réduction de l'activité Acetyl CoA Carboxylase et de

l'activité Fatty Acid Synthase. Récemment, les agonistes du PPAR α ont été impliqués dans la surexpression de l'apoAV, une apolipoprotéine dont la concentration est inversement corrélée aux concentrations de TG plasmatiques (Prieur X 2003; Vu-Dac N 2003).

II.3.3.1 PPAR et HDL :

Les études réalisées chez les rongeurs ont montré que les fibrates en activant les PPAR α provoquaient une diminution des concentrations de HDL par réduction de l'expression des gènes d'apoAI et d'apoAII. A l'inverse, chez l'homme, il est noté une augmentation des concentrations plasmatiques de HDL, d'apoAI et d'apoAII (Malmendier CL 1985; Mellies MJ 1987). La différence d'effet entre l'homme et les rongeurs est due à une différence de 3 nucléotides dans le promoteur du gène rendant le PPRE positif dans le promoteur d'apoAI chez l'homme et non-fonctionnel chez les rongeurs (Vu-Dac N 1998).

II.3.3.2 PPAR et Récepteur Scavenger de Type BI :

Les récepteurs Scavengers SR-BI sont des récepteurs qui lient les HDL. Ils médient d'une part la captation sélective du CE (Cholestérol estérifié) à partir des HDL au niveau du foie et d'autre part l'efflux de cholestérol cellulaire par les HDL. Ce récepteur est également une cible des PPARs (Chinetti G 2000).

II.3.3.3 PPAR et ABCA1 :

ABCA1 intervient dans le métabolisme de HDL en exportant le cholestérol non estérifié et les phospholipides des cellules vers l'apoAI. Il joue ainsi un rôle dans l'efflux de cholestérol des tissus. Il a été démontré que l'activation des PPAR α par le fénofibrate induit l'expression du gène ABCA1 dans les macrophages humains (Chinetti G. 2001).

III. Influence des polymorphismes génétiques sur le métabolisme lipidique

III.1 Polymorphisme du gène de l'apoAI :

III.1.1 Gène de l'apoAI

Le gène de l'ApoAI est un gène comportant 4 exons et situé dans le chromosome 11 dans le même cluster que les gènes d'ApoCIII, d'ApoAIV et d'ApoAV (Paul 1987; Pennacchio 2001).

III.1.2 ApoAI-75G/A

Le polymorphisme ApoAI-75G/A est un Single Nucleotide polymorphism (SNP), une mutation qui remplace une Guanine (G) par une Adénine (A) à la position 75 dans la région promotrice du gène APOA1 sur le chromosome 11. Il est associé au changement de la tension artérielle (Sadaf A 2002), à la redistribution des sous fractions d'HDL lors de la pratique sportive (Gualberto Ruano 2006) et aux différences dans les concentrations plasmatiques des triglycérides et de VLDL-cholestérol (Sorkin S.C 2005). Dans une étude réalisée en Inde, les homozygotes *g* ont les niveaux plasmatiques d'HDL et d'ApoAI significativement plus haut que les porteurs de l'allèle *a*. Dans cette étude l'allèle *a* a été suspecté contribuer à la sévérité des maladies cardiovasculaires (Chhabra S. 2005). L'interaction gène-nutriments a été étudiée pour ce SNP dans l'étude Framingham (Ordovas 2002). En effet, la consommation d'acides gras polyinsaturés a été associée aux fortes concentrations d'HDL-C chez les sujets féminins porteurs de l'allèle *a*, tandis que l'effet opposé de cette consommation a été observé chez les sujets homozygotes pour l'allèle *g*. En conséquence, les effets de ce SNP pourraient dépendre d'autres facteurs par exemple les facteurs environnementaux et le sexe.

III.1.3 ApoAI-27C/A

Un autre polymorphisme au niveau du promoteur du gène d'apoAI a été également identifié chez un patient hétérozygote pour le polymorphisme ApoAI-75G/A, il s'agit du SNP ApoAI-27C/A, conduisant au remplacement d'une Cytosine (C) par une Adénine (A). Les concentrations d'HDL-C et d'apoAI étaient très faibles dans le plasma de ce patient (Matsunaga 1999).

II.2 Polymorphisme du gène de l'apoE

Le polymorphisme de l'apo E est caractérisé par un changement des résidus cystéine et arginine aux positions 112 et 158 (Zannis VI 1981). Ce changement est codé par trois allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ et les protéines correspondantes sont appelés apo E2, apo E3, et apo E4 et sont à l'origine de 6 phénotypes différents : 3 homozygotes (apo E3/3, apo E4/4, apo E2/2) et 3 hétérozygotes (apo E2/3, apo E2/4 et apo E3/4).

L'allèle $\epsilon 3$ est le plus fréquemment rencontré (50-90%) suivi de l'allèle $\epsilon 4$ (5-35%) et enfin de l'allèle $\epsilon 2$ (1-15%) (Mahley RW 2000).

Les populations européennes présentent un gradient géographique de la répartition de fréquences allélique : Les européens du Nord (Finlandais) tendent à avoir de plus fortes fréquences de l'allèles $\epsilon 4$ (17,8%) que les européens du Sud (Portugais et Espagnols) (9,7 et 11,5% respectivement). Les fréquences alléliques dans la population française sont 12,4 ; 79 ; 8,6 pour $\epsilon 4$, $\epsilon 3$, et $\epsilon 2$ respectivement (Schiele F 2000).

III.3. Polymorphisme du gène de la CETP:

III.3.1 Gène de la CETP :

Le gène de la CETP comporte 16 exons et est situé dans le bras long du chromosome 16 (Lusis A J 1987).

Les mutations décrites du gène de la CETP s'accompagnent d'une diminution des concentrations de la CETP (Brown M L 1989; Koizumi J 1991) et d'une augmentation des concentrations des HDL.

Ces mutations ont été décrites dans les populations japonaises (Brown M L 1989; Inazu A 1990; Takahashi K 1993; Barter PJ 2003) et européennes (Funke H 1994).

III.3.2 Intron14 G/A

La première mutation décrite en 1989 par Brown et al et Inazu en 1990, est due à une substitution d'une guanine par une adénine dans l'intron 14. Cette mutation inhibe l'épissage normal de l'ARNm. 1 à 2% d'individus hétérozygotes pour cette mutation ont été identifiés parmi des populations japonaises de sujets sains (Inazu A 1993). Ces hétérozygotes présentent

des taux plasmatiques de CETP diminués de moitié, alors que les homozygotes sont complètement déficients en CETP.

III.3.3 Taq1B

Plusieurs variants génétiques de la CETP ont été rapportés. Le plus fréquent est le polymorphisme de restriction Taq 1B situé au niveau de l'intron 1 de la CETP. Il est associé à une augmentation de l'activité de la CETP et une diminution de la concentration de HDL-C. Une association entre la présence du génotype Taq 1B B2B2, la diminution de l'activité de CETP et l'augmentation de la concentration de HDL-C est observée chez les sujets témoins et non chez les sujets diabétiques avec des complications cardiovasculaires. Dans l'étude Framingham Offspring Study, les sujets homozygotes d'allèle B1 ont un niveau de CETP plus haut et le niveau d'HDL-C plus bas que les sujets Taq 1B B1B2 et Taq 1B B2B2 (Ordovas 2000). Les hommes avec allèle B2 ont moins de risque de CHD tandis qu'il n'y a pas d'association significative chez les femmes. Des résultats similaires sont obtenus dans l'étude VA-HIT (Brousseau ME 2002). Le génotype de Taq 1B est associé aux variations de réponse de l'athérome aux statines, en le mesurant par angiographie (Kuivenhoven JA 1998).

III.3.4. D442G

En 1993, Takahashi et coll (Takashi K 1993) ont identifié un autre polymorphisme faux sens induit par la substitution d'une Adénine par une Guanine au niveau de l'exon 15. Le résultat se traduit par le remplacement de l'Aspartate par une Glycine au niveau du codon 442. Les hétérozygotes pour cette mutation présentent une augmentation d'environ 3 fois la concentration d'HDL-C et une nette diminution de la concentration de CETP (17-20%). Cet effet semble plus modeste que celui du polymorphisme Taq1B qui influence la concentration CETP d'environ 50%.

Une récente étude réalisée sur des sujets MCV et sujets sains issus d'une population chinoise a montré que l'allèle *g* était très représenté chez les sujets malades et lié aux fortes concentrations du cholestérol total et de LDL-C (Keqin Zheng 2005). Dans la même année, Arai Hidenoi et al ont montré que ce polymorphisme était également associé aux faibles concentrations de triglycérides dans une population japonaise (Arai H 2005).

III.3.5 A373P

C'est un polymorphisme au niveau de l'exon 12 du chromosome 16 qui remplace une Cytosine par une Guanine (Alanine par Proline au codon 373). Dans un rapport de Copenhague, les sujets 373P ont un niveau d'HDL cholestérol réduit donc moins de risque d'ischémie cardiovasculaire (Agerholm-Larsen B 2000). Corbex.M *et al* ont cherché 20 polymorphismes de CETP y compris CETP 373 chez 568 patients ayant eu un infarctus du myocarde et 668 sujets sains, ils ont trouvé le même résultat (Corbex M 2000).

III.4 Polymorphisme du gène PPAR

III.4.1 Gène de PPAR

Les PPARs peuvent stimuler l'expression d'un certain nombre de gènes, c'est ce qu'on appelle trans-activation ou les réprimer, c'est le trans-répression.

La famille des PPARs, comprend trois membres distincts, désignés α , β et γ , chacun codé par un gène différent. Le gène du PPAR α est localisé sur le chromosome 22, celui de PPAR γ sur le chromosome 3 et celui de PPAR β sur le chromosome 6 (Desvergne B 1999).

Les récepteurs PPARs contrôlent des mécanismes importants dans le métabolisme des glucides et celui des lipides. De nombreux polymorphismes ont été suspectés parmi lesquels, certains auraient des propriétés protectrices, tandis que d'autres contribueraient plutôt à l'apparition de certains troubles ou pathologies.

III.4.2 Polymorphisme du gène de PPAR α

Plusieurs variants génétiques, incluant L162V, A268V, G/C au niveau de l'intron 7 et G/A, V227A ont été décrits.

III.4.2.1 L162V

Il correspond à une mutation faux sens conduisant au remplacement d'une Cytosine par une Guanine, ce qui se traduit par un remplacement de la leucine par la valine au niveau du codon 162. C'est une région qui se lie à l'ADN. La fréquence de ce polymorphisme chez les

caucasiens est de 6 à 8% (Daniel H.van Raalte 2004). Les porteurs de l'allèle *g* seraient protégés contre l'athérosclérose, avec des taux de HDL-C augmentés d'environ 50% (Flavell DM 2002).

III.4.2.2 Val227Ala :

C'est une mutation faux sens conduisant au remplacement d'une Thymine par une Cytosine au niveau du nucléotide 892 ce qui se traduit par un remplacement d'une Valine par une Leucine entre les domaines qui se fixent sur l'ADN et qui fixent le ligand. Dans une étude réalisée chez une population Japonaise, les porteurs de l'allèle *c* ont une concentration en cholestérol plasmatique et TG moindre que les porteurs de l'allèle *T* (K Yamakawa-Kobayashi K 2002).

III.4.3 Polymorphisme du gène de PPAR γ

Les études des mutations sur les gènes codant les PPARs ont également porté sur PPAR γ , car son rôle dans la différenciation adipocytaire et dans l'insulinorésistance est important (Auwerx J 1999; Valve R 1999).

III.4.3.1 P12A

Le polymorphisme plus étudié correspond à une substitution d'une Proline en une Alanine au niveau du codon 12. Cette mutation est spécifique de la forme PPAR γ 2 et se trouve dans le domaine d'activation indépendant du ligand. Cette mutation est en corrélation avec les pressions diastoliques et systoliques, l'indice de masse corporelle, l'obésité et le diabète (Koch M 1999; Valve R 1999; Oh EY 2000; Kil Soo Kim 2004). En revanche, dans une autre étude, l'allèle *c* a été associé avec une augmentation du risque de diabète (Altshuler D 2000). En 2003, Masud et Ye (Masud S 2003) en analysant les données de 30 études (19136 individus) ont associé l'allèle *A* à une augmentation de l'IMC (indice de masse corporelle).

III.4.3.2 H449H

C'est le polymorphisme silencieux au niveau de l'exon 6 qui correspond à une transition au niveau du codon 449. Cette mutation où il n'y a pas de changement d'acide aminé a été associée à l'obésité (Smith WM 2001).

Il faut noter que, de façon générale, les études de l'influence des polymorphismes sur les différents troubles qui leur sont associés, sont souvent contradictoires.

Compte tenu de la multiplicité des effets contradictoires observés sur les MCV et de la multiplicité des facteurs génétiques potentiellement impliqués dans la régulation du HDL-C, un facteur athéroprotecteur, nous nous sommes intéressés aux HDL en premier lieu, par l'examen de facteurs génétiques. Ce type d'étude ne peut se faire que sur des études de population à grande échelle. La population PRIME apporte un échantillon d'environ 9000 sujets, pour lesquels, à l'issue d'une période de suivi de 5 années, aucun accident cardiovasculaire n'a été recensé. Il apparaît donc légitime d'évaluer l'influence du polymorphisme des gènes codant pour les gènes d'intérêt sur les concentrations d'HDL-C. Le génotypage a été effectué selon la méthode TaqMan de discrimination allélique utilisant des sondes fluorescentes Taqman PCR (Voir fiche technique 5).

Étude 1 :

La question posée est celle de la relation entre le polymorphisme des gènes codant pour l'apolipoprotéine E (e2, e3 et e4), du facteur de transcription PPAR α (L162V, V227A), du gène de l'apoAI (-75G/A) et de la CETP (A373P et D442G) avec les concentrations du HDL-C.

Article 1 : Etude du rôle du polymorphisme génétique des apolipoprotéines, de certains facteurs de transcription impliqués dans leur expression et de la CETP sur la concentration plasmatique du HDL-C de sujets indemnes de maladies cardiovasculaires.

La concentration plasmatique des HDL est très largement reconnue comme étant liée inversement au risque cardiovasculaire. Les résultats récents de l'étude PRIME confirment que le cholestérol HDL représente un excellent facteur protecteur contre le développement des maladies coronaires à court ou moyen terme (Luc G 2002). En dehors de l'apolipoprotéine A-I, constituant majeur des HDL, de nombreuses apolipoprotéines, ainsi que certaines enzymes et protéines de transfert des lipides peuvent affecter la concentration plasmatique des HDL.

Population étudiée :

L'étude PRIME (Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction) s'inscrit dans un programme européen.

Ce projet a débuté en 1991 et regroupe 4 villes (3 Françaises: Lille, Toulouse, Strasbourg et 1 Irlandaise: Belfast) correspondant à des centres MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in Cardiovascular disease). Les sujets sont indemnes de MCV et suivis de manière prospective. Les analyses biologiques spécifiques au projet ont été centralisées à l'IPL (Institut Pasteur de Lille), le génotypage a été effectué au sein du LEPA (Laboratoire d'Etude du Polymorphisme de l'ADN, EA3823 Nantes) selon la méthode de discrimination allélique utilisant les sondes fluorescentes TaqMan PCR. La population étudiée est un sous échantillon de la population PRIME, composée de 857 sujets hommes, âgé de 50 à 59 ans. Les sujets restés indemnes de maladies cardiovasculaires à 5 ans de suivi, ont été utilisés pour étudier la fréquence des allèles rares du PPAR α (L162V allèle *g*, V227A allèle *c*), de l'apoAI (-75G/A, allèle *a*) de la CETP (A373P allèle *c*, D442G allèle *g*) et de l'apoE (ϵ 2 et ϵ 4) dans les différents groupes de sujets séparés en tertiles de concentration de HDL-C et la relation entre la présence de ces variants et les concentrations plasmatiques de HDL-C, ApoAI, LpAI et LpAIAII.

Cet échantillon de sujets a été calculé pour avoir 25% de sujets dans le tertile de plus faible concentration d'HDL-C (≤ 28 mg/dL) dans toute la population PRIME, 25% de sujets dans le tertile de concentration la plus élevée d'HDL-C (≥ 73 mg/dL) et 50% de sujets dans le tertile de concentration moyenne d'HDL-C (28-73mg/dL)

Résultats

Les polymorphismes des PPAR α V227A et CETP D442G n'ont pas été trouvés dans notre population étudiée (792 sujets), soit une fréquence de 100% pour les allèles sauvages. Cependant, les fréquences de PPAR α L162V sont en accord avec celles publiées par d'autres chercheurs (Marie-Claude Vohl 2000; Tai ES 2002; Khan Q.D. 2004). Aucune influence de l'allèle rare *g* sur les concentrations de HDL-C, ApoAI, LpAI et Lp AIAII n'a été observée. Cependant, les niveaux des triglycérides sont diminués en présence de cet allèle. (résultats présentés en annexe de cet article) .

Nos résultats sur la fréquence du polymorphisme de l'apoE sont similaires à ceux observés dans d'autres études européennes et nous avons observé que les concentrations de LpAI et ApoAI sont significativement dépendantes du polymorphisme de l'apoE (l'allèle ϵ 2).

L'allèle *c* (CETP A373P) est moins fréquent dans le groupe de sujets avec HDL-C élevé. (tableau 3 article)

En accord avec ce résultat, cet allèle a été associé avec des concentrations basses en HDL-C ($42,6 \pm 23,2$ vs $51,9 \pm 24,1$ mg/dL; $p=0,0006$) en ApoAI (140 ± 37 vs 154 ± 38 mg/dL; $p=0,0007$) en LpAI ($42,3 \pm 13,7$ vs $48,4 \pm 15,6$ mg/dL $p=0,0004$) et en LpAIAII (98 ± 27 vs 106 ± 27 mg/dL; $p=0,007$) présence vs absence de l'allèle rare, respectivement.

Pour étudier l'influence de chaque allèle d'une manière indépendante, sur les concentrations d'HDL-C, un modèle de régression multiple incluant tous les autres allèles ainsi que les variables qui pourraient influencer les niveaux d'HDL-C (tabagisme, activité physique, consommation alimentaire, BMI (Body mass Index)), a été utilisé. Par ce modèle, nous avons montré que l'allèle rare *c* (CETP A373P) restait indépendamment et négativement associé aux niveaux d'HDL-C (Odds ratio : 0,6 [0,38-0,93], $p=0,0236$). La présence de l'allèle ϵ 2 a été également associé aux niveaux d'HDL-C ($p=0,0776$).

Puisque la concentration des triglycérides est connue pour être inversement corrélée à la concentration d'HDL-C, un second modèle de régression multiple incluant tous les allèles, les paramètres influençant les niveaux de HDL-C ainsi que les triglycérides a été utilisé et a montré que l'hypertriglycéridémie ($TG \geq 1,5$ g/L) reste indépendamment et négativement associée aux concentrations d'HDL-C. Cependant l'introduction des triglycérides dans le modèle fait perdre ou diminuer la relation entre l'allèle *c* de CETP A373P et la concentration de HDL-C ; On suggère donc que la relation entre ce polymorphisme et HDL est modulée par l'existence d'une hypertriglycéridémie.

Discussion

Le polymorphisme V227A n'a pas été trouvé dans notre population d'étude, ce qui laisse supposer qu'il n'existerait pas dans la population européenne constituant l'échantillon PRIME. Ce résultat diffère de ceux publiés dans la littérature mais les populations d'étude n'était pas européenne (K Yamakawa-Kobayashi K 2002). Dans cette population, ce polymorphisme a été associé avec des modifications des concentrations du cholestérol plasmatique et des triglycérides. Les porteurs de l'allèle *T* (V227A) présentaient un niveau élevé en cholestérol et TG.

L162V : La fréquence du polymorphisme L162V est en accord avec d'autres études (Marie-Claude Vohl 2000; Tai ES 2002; Khan Q.D. 2004). Nous n'avons trouvé aucune différence d'HDL-C, LpAI, ApoAI et LpAII entre les groupes porteurs et non porteurs de l'allèle *g*. Cependant, les niveaux de TG sont diminués en présence de cet allèle. La même tendance a été reportée dans d'autres études (Ordovas 2002; Tai E.S. 2005) dans lesquelles, l'allèle *g* apparaissait être un facteur protecteur contre les MCV. Dans une autre étude, ce même allèle a été associé à un niveau élevé en apoB et LDL-C (Marie-Claude Vohl 2000).

A373P : La fréquence de l'allèle *c* dans la partie de la population qui se trouve dans le tertile intermédiaire d'HDL-C est de 14,68% ce qui correspond à la fréquence dans la population caucasienne (10,3%) (Agerholm-Larsen B 2000). Nos résultats sur les concentrations en HDL-C sont en accord avec les études Copenhagen City Heart Study (Agerholm-Larsen B 2000) et ACCESS (Atorvastatin Comparative Cholesterol Efficacy and Safety Study) qui ont montré que les sujets porteurs de l'allèle *c* ont des concentrations plus faibles d'HDL-C que les sujets homozygotes pour l'allèle *g* (Lloyd DB 2005). En plus des résultats sur le HDL-C, nous avons montré pour la première fois que l'allèle *c* de CETP est également associé aux faibles concentrations de l'ApoAI, LpAI et LpAII.

Les mécanismes de cette diminution de HDL-C sur l'influence du polymorphisme de CETP sont mal connus. Il est possible que ce polymorphisme s'accompagne d'une diminution de l'activité CETP selon Wang et al (Wang S 1991). En revanche, il a été décrit dans une autre étude que le variant P373 est associé à une augmentation de la masse de CETP plutôt que de son activité (Lloyd DB 2005).

Un modèle de régression multiple incluant tous les allèles rares étudiés ainsi que les autres facteurs qui influencent les concentrations d'HDL-C (l'activité physique, la consommation de tabac, la consommation d'alcool, la consommation alimentaire, le BMI) montre que l'allèle *c*

(CETP A373P) reste indépendamment associé aux faibles concentrations d'HDL-C, d'apoAI, de LpAI et de LpAII.

L'inclusion de la présence d'une hypertriglycémie ($TG \geq 1,5g/L$) dans le modèle précédent fait perdre l'association entre cet allèle de la CETP et les niveaux d'HDL ($p=0,126$), ce qui pourrait indiquer que l'effet de ce polymorphisme sur les concentrations d'HDL-C est modulé par les concentrations de triglycérides. La non détection de l'autre polymorphisme étudié de la CETP (CETP D442G) pourrait être expliquée par son absence dans les populations européennes. En effet, cette mutation n'a été observée que dans certaines populations asiatiques japonaise et chinoise (Arai H 2005; Keqin Zheng 2005).

Les fréquences de l'allèle ApoAI-75G/A dans notre population d'étude sont similaires aux fréquences observées dans d'autres études (Ordovas 2002; Gualberto Ruano 2006). Cependant, aucune association n'a été trouvée avec les concentrations des lipides et lipoprotéines. En revanche, Jeenah et al (Jeenah M 1990) ont montré que des sujets masculins porteurs de l'allèle a d'ApoAI-75G/A avaient des concentrations plus élevées en HDL-C et en ApoAI que les sujets homozygotes pour l'allèle g. La même année, Pagani et al (Pagani F 1990) ont publié les mêmes résultats mais cette fois chez les femmes.

L'interaction gène-nutrition a été étudiée pour ce SNP dans l'étude Framingham (Ordovas 2002). En effet, la consommation d'acides gras polyinsaturés a été associée aux fortes concentrations d'HDL-C chez les sujets féminins porteurs de l'allèle *a*. Tandis que l'effet opposé a été observé chez les sujets homozygotes. En conséquence, les effets de ce SNP pourraient dépendre d'autres facteurs par exemple les facteurs environnementaux et le sexe.

Article 1

Influence of CETP, PPAR α , ApoE and ApoAI polymorphisms on HDL-C, ApoAI, LpAI and LpAI:AII concentrations: The PRIME Study

Hong Quang Do¹, Hassan Nazih¹, Gérald Luc², Dominique Arveiler³, Jean Ferrières⁴, Alun Evans⁵, Philippe Amouyel⁶, François Cambien⁷, Pierre Ducimetière⁸, Jean-Marie Bard^{1*} for the PRIME Study Group

Key words:

Coronary Heart Disease (CHD), Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), Single nucleotide polymorphism (SNP), High Density Lipoprotein cholesterol (HDL-C), Lipoproteins.

Article en révision dans **Metabolism** 2008

Etude 2 :

Etat de la question :

Les effets des phytostérols de plantes sur l'absorption intestinale du cholestérol et sur la cholestérolémie sont très bien documentés. Ces propriétés nous ont conduit à développer une recherche sur les organismes d'origine marine qui pourraient contenir de fortes concentrations de stérols originaux. Les stérols de l'éponge *Ciocalypta sp.* ont été isolés et identifiés. Les composés majoritaires sont le 24-isopropylcholestérol et son dérivé mono insaturé en C22/C23. Ils représentent 80% du mélange naturel de stérols : 24-isopropylcholesterol (56,3%), 24-isopropyl-22-dehydrocholesterol (23,6%).

On trouve dans ce mélange d'autres stérols tels que, le 24-isopropenylcholesterol, le β -sitosterol, le poriferasterol et crinosterol (fig 1, article 2). Le 24-isopropylcholestérol est trouvé chez d'autres espèces d'éponge appartenant au même ordre (15-21, article 2).

Cependant aucune étude n'a été réalisée avec des mélanges stéroliques et du 24-isopropylcholestérol extraits à partir de cette éponge marine, *Ciocalypta sp.*

Pour tenter de tester l'effet du mélange stérolique et du 24-isopropyl cholestérol sur l'absorption intestinale du cholestérol, nous avons réalisé une approche mécanistique sur le modèle entérocytaire humain, la lignée Caco-2. Cette lignée est très utilisée pour étudier le métabolisme des lipides (Trotter PJ 1996; van Greevenbroek MM 2000; Nazih H 2001).

Matériel et méthodes

Culture sur filtres semi-perméables :

Pour les expérimentations les cellules Caco-2 sontensemencées à une densité de 300 000 cellules sur des inserts transparents de porosité 0,4 μ M (Greiner bio-one) ; Les inserts sont placés dans des plaques de 6 puits permettant l'accès séparé aux pôles apicaux et basolatéraux des monocouches cellulaires (1.5ml de milieu de culture apical et 2 ml de milieu de culture basolatéral). Les expérimentations sont réalisées 20 jours après l'ensemencement. A ce stade les cellules sont différencies en entérocytes (Pinto M 1983). (Voir fiche technique 11)

Préparation des micelles :

Les concentrations micellaires finales utilisées sont Acide taurocholique (5mM), Acide oléique (400µM), Monooleyl glycerol (100µM), Cholestérol (100µM).

L'apport des micelles contenant le 3H-cholestérol en présence ou non du mélange stérolique des phytostérols isolés (le sitostérol ou le 24 isopropylcholestérol) aux cellules se réalise du côté apical. Après cette étape d'incubation les milieux basolatéraux sont utilisés pour mesurer la radioactivité. Les cellules sont lavées 3 fois avec du milieu seul (sans SVF) et les lipides sont extraits des cellules avec de l'isopropanol.

Résultats :

Pour la discussion de nos résultats, «l'absorption» du cholestérol sera définie comme le transfert du cholestérol de la lumière intestinale c'est-à-dire du côté apical des cellules vers le côté basolatéral. La «captation» se réfèrera à l'entrée du cholestérol dans les entérocytes, et la sécrétion à la sortie du cholestérol des entérocytes. La présence du cholestérol marqué au tritium incubé au pôle apical des cellules dans le compartiment basolatéral est la résultante du phénomène de captation apical suivi du phénomène de sécrétion basolatérale. Leur détection dans le milieu basolatéral permet donc d'estimer le phénomène d'absorption intestinale dans sa globalité.

Pour étudier l'effet du mélange stérolique (M) (contenant du 24-isopropylcholesterol (25.4 µM), du 24-isopropyl-22-dehydrocholesterol (10.7 µM), du 24-isopropenylcholesterol (1.1 µM), du β-sitosterol (5.4 µM), du poriferasterol (2.7 µM) et du crinosterol (0.2µM) sur la captation du cholestérol et la sécrétion par les cellules Caco-2, les cellules différenciées ont été incubées (5h et 20 h) avec des micelles contenant le 3H-cholestérol (1µci/ml) en présence du mélange .

La figure 2 (article2) montre qu'après 20 h d'incubation, la sécrétion du 3H-cholestérol est réduite en présence de stérols spongiaires, d'environ 40% (p<0.01). Le même pourcentage (39%, p<0.01) de réduction a été obtenu avec 5 h d'incubation (résultat non présenté).

La figure 3 (article 2) montre qu'après 20 h d'incubation, la captation du 3H-cholestérol est réduite en présence de stérols spongiaires d'environ 55%.

Même si le rôle premier de l'intestin est de transférer les nutriments de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin, il est capable de métaboliser une partie des stérols qu'il capte. Si ces stérols ou leurs métabolites pouvaient interagir avec LXR/RXR, la diminution de la captation et de la sécrétion pourraient alors s'expliquer par l'augmentation des stérolines. ABCG5 et ABCG8. Or, ces deux protéines ne sont pas bien exprimées à l'état basal dans les Cellules Caco-2 (Plat 2005). En effet, nous n'avons pas été capables de montrer une influence du mélange sur les stérolines, probablement à cause de leur faible expression.

Par ailleurs, les stérols ou leurs métabolites peuvent interagir avec LXR/RXR et stimuler l'expression d'une autre protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC, ABCA1 impliqué dans l'efflux du cholestérol et dans la biogénèse des HDL. Nous avons, par RT-PCR quantitative, montré que le mélange stérolique stimule l'expression du gène ABCA1 (fig 4, article 2).

Etant donné que le 24-isopropylcholestérol est le stérol majoritaire de la fraction stérolique, il a été isolé (voir material and methods, article 2) et nous avons étudié son influence sur l'absorption du cholestérol.

Pour étudier l'effet du 24-isopropylcholestérol sur la captation du cholestérol et la sécrétion par les cellules Caco-2, les cellules différenciées ont été incubées avec des micelles contenant le 3H-cholestérol (1 μ ci/ml) en présence du 24-isopropylcholestérol (50 μ M).

La présence du 24-isopropylcholestérol dans le milieu apical a réduit la captation du cholestérol par les Caco-2 (fig 5, article 2) de 67%. De plus, le 24 isopropylcholestérol (50 μ M) a réduit la sécrétion du 3H-cholestérol dans le milieu basolatéral (fig 6, article 2). L'inhibition est de l'ordre de 49%.

La présence du sitostérol (50 μ M), inhibiteur connu de l'absorption intestinale du cholestérol, a également réduit la captation et la sécrétion. Cependant cette inhibition a été moindre par rapport au 24-isopropylcholestérol (42 et 29%, respectivement).

Pour étudier l'effet du 24-isopropylcholestérol sur les gènes candidats impliqués dans la captation et la sécrétion, nous avons examiné l'expression des ARNm de NPC1L1, ABCG5G8 et ABCA1. Nous avons montré par QRT-PCR que le 24-isopropylcholestérol

induit l'expression de l'ARNm d'ABCA1 (fig 7, article 2). En revanche nous n'avons montré aucune influence sur les niveaux d'ABCG5G8 et NPC1L1.

Discussion

Nous avons montré pour la première fois que la captation du 3H-cholestérol et sa sécrétion au pôle basolatéral par les Caco-2 sont diminuées en présence d'un mélange stérolique, extrait d'une éponge d'origine marine *Ciocalypta sp.*, contenant le 24-isopropylcholesterol (56.3%), le 24-isopropyl-22-dehydrocholesterol (23.6%), le 24-isopropenylcholesterol (2,4%), le β -sitosterol (11,5%), le poriferasterol (5,8%) et le crinosterol (0,4%). Le 24-isopropylcholestérol seul extrait de la même éponge a été plus efficace que le mélange stérolique et que le β -sitostérol.

Les effets des phytostérols dans la diminution de l'absorption du cholestérol et de la cholestérolémie sont bien documentés, bien que le mécanisme de cette diminution n'ait pas été clairement démontré et ceci à cause de la variété des gènes cibles impliqués.

Récemment, NPC1L1 a été identifié comme étant un composé important dans la captation du cholestérol par l'entérocyte. Bien que l'expression de NPC1L1 ait été décrite comme étant influencée par les stérols, nous n'avons montré dans notre étude aucune influence des stérols évalués sur l'expression de NPC1L1. Le même résultat a été obtenu dans une autre étude chez le cochon d'Inde (20-article2). Aussi on peut émettre l'hypothèse que ces stérols pourraient diminuer l'affinité du cholestérol pour la protéine NPC1L1, sans modifier son expression.

Les phytostérols ont d'autres gènes cibles. Parmi ceux-ci les ABCG5/G8, sont 2 transporteurs jouant un rôle important dans la régulation de l'absorption intestinale du cholestérol. En effet, il a été montré que l'expression des ABCG5/G8 pourrait être induite par les activateurs de LXR (29-article2) et que le traitement des cellules intestinales avec les phytostérols stimulent l'expression des gènes cibles de LXR (22- article 2), ce qui suggère que les phytostérols ou leurs métabolites pourraient agir comme des ligands de LXR et influencer le métabolisme du cholestérol. Si les stérols testés ou leur métabolites pouvaient interagir avec LXR la diminution de la captation et de la sécrétion pourraient alors s'expliquer par l'augmentation des stérolines, ABCG5 et ABCG8. Or, ces deux protéines ne sont pas bien exprimées à l'état

basal dans les Cellules Caco-2 (Plat 2005). En effet, nous n'avons pas réussi à montrer une influence du mélange sur les stérolines, probablement à cause de leur faible expression.

De plus, l'interaction des stérols avec LXR peut stimuler l'expression d'une autre protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC, ABCA1 impliqué dans l'efflux du cholestérol et dans la biogénèse des HDL. Nous avons, par RT-PCR quantitative, montré que le mélange stérolique et le 24-isopröylcholestérol stimulent l'expression du gène ABCA1 ce qui suggère que ces composés pourraient jouer un rôle dans l'augmentation des niveaux d'HDL d'origine intestinale. D'autres expériences sont nécessaires pour évaluer l'effet de ces stérols sur l'expression du gène d'apoAI chez les cellules Caco-2 et d'autres cellules exprimant ABCAI et produisant l'ApoAI.

Ces stérols pourraient également diminuer l'estérification du cholestérol et/ou l'assemblage des lipides et des apolipoprotéines pour la formation des lipoprotéines. Afin d'évaluer ces hypothèses, de nouvelles investigations devront être menées en incubant les cellules Caco-2 avec ces stérols séparément et en quantifiant les ARNm des gènes candidats par RT-PCR quantitative.

En conclusion, notre étude a montré pour la première fois qu'un mélange stérolique et qu'un stérol, le 24 isopröyl cholestérol, extraits d'une éponge marine *Ciocalypta sp.* diminuent la captation et la sécrétion du cholestérol utilisant le modèle cellulaire Caco-2. De plus, ces stérols stimulent l'expression du gène ABCA1. D'autres études sont nécessaires pour élucider les mécanismes par lesquels ces stérols pourraient influencer l'absorption et l'expression d'ABCA1. Ces résultats ajoutent un nouveau stérol, le 24-isopröylcholestérol, à la liste des stérols qui réduisent l'absorption du cholestérol.

Article 2

**Unusual sterolic mixture, and 24-isopropylcholesterol, from the sponge *Ciocalypta* sp.
reduce cholesterol uptake and basolateral secretion in Caco-2 cells**

Hong Quang Do^a, Laurianne Van Landeghem^c Gaëtane Wielgosz-Collin^b, Martin Takoudju^b, Jean-Michel Huvelin^a, Jean-Michel Kornprobst^b, Jean-Marie Bard^a, Gilles Barnathan^{b*}, Hassan Nazih^{a*}

Keywords

Sterols; 24-Isopropylcholesterol, Intestinal cholesterol absorption; Marine sponge; Halichondriidae.

Article soumis à **Bioorg Med Chem** Mars 2008

Discussion et Perspectives

L'athérosclérose est aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. De nombreux travaux ont montré que son développement est relié à plusieurs facteurs, certains sont modifiables et d'autres non modifiables.

Parmi les facteurs modifiables on retrouve le cholestérol et le HDL-C. Parmi les facteurs non modifiables, on retrouve le polymorphisme des gènes codant pour les acteurs du métabolisme lipidique et lipoprotéique (facteurs de transcription, les apolipoprotéines, les enzymes, les protéines de transfert) et qui pourrait à leur tour influencer les concentrations d'HDL-C.

Au cours de notre travail, nous avons exploré quelques facteurs modifiables et non modifiables : 1) nous avons étudié les relations existant entre le polymorphisme de certains gènes (facteurs non modifiables) sur la concentration du HDL-C et 2) nous avons évalué l'influence de stérols d'origine spongiaire sur un facteur modifiable, l'absorption du cholestérol, à l'aide d'un modèle de cellules entérocytaires.

Dans le premier projet, nous avons étudié l'influence des polymorphismes des gènes (ApoAI - 75G/A, ApoE, CETP A373P, CETP D442G, PPAR α L162V, PPAR α V227A) sur les concentrations d'HDL-C chez une population issue de la cohorte PRIME qui comprenait 857 hommes, indemnes de maladies cardiovasculaires (MCV).

Nos travaux sur le polymorphisme génétique de la CETP et HDL-C ont montré que le polymorphisme CETP A373P a une influence sur les concentrations d'HDL-C. En effet nous avons montré que l'allèle *c* (CETP A373P) est moins fréquent dans le groupe de sujets avec HDL-C élevé. De plus, cet allèle a été associé avec des concentrations basses en HDL-C, en ApoAI, en LpAI et en LpAII.

L'influence du CETP A373P peut être expliquée par les changements de son activité ou de sa masse. En effet, Lloyd (Lloyd 2005) a confirmé que les variations du HDL-C sont liées aux variations de la concentration de la CETP plutôt qu'aux modifications de son activité spécifique. Dans son étude, il a montré que les sujets avec l'allèle *c* (CETPA373P) ont un niveau de CETP plus élevé que les sujets non porteurs de l'allèle. De plus, il a montré que la CETP issue de sujets ayant l'allèle *c* était plus résistante à la protéolyse expliquant sa forte concentration et la faible concentration du HDL-C.

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent également influencer les concentrations d'HDL-C par exemple : la consommation d'alcool et de tabac, l'alimentation et l'activité physique. Pour savoir si l'influence de CETP A373P sur les concentrations d'HDL-C est indépendante de ces facteurs environnementaux, nous avons réalisé une analyse multivariée. Nos résultats montrent que l'association entre le polymorphisme CETP A373P et les concentrations d'HDL-C persiste en présence de ces facteurs. En revanche, l'introduction de la triglycéridémie dans le modèle statistique rend cette association moins significative. Ce résultat suggère qu'une partie de l'effet de la CETP sur le HDL-C s'explique par son effet hypertriglycéridémiant.

Les polymorphismes CETP D442G et PPAR α V227A qui sont souvent présents dans la population asiatique n'ont pas été trouvés dans notre population PRIME étudiée.

Parmi les polymorphismes trouvés, l'ApoAI -75G/A et PPAR α L162V n'ont pas une association significative avec le profil lipidique. Cette inexistence de relation entre ces polymorphismes (L162V et ApoAI-75G/A) et nos paramètres lipidiques pourrait être expliquée par la différence de la population étudiée. Dans la cohorte Framingham, le polymorphisme PPAR α L162V a été associé aux concentrations du LDL-C et d'Apo B. Quant au polymorphisme ApoAI-75G/A il est associé aux concentrations du HDL-C. Les PPAR α contrôlent d'autres processus physiologiques, il serait intéressant d'étudier l'effet du polymorphisme L162V sur les protéines de l'inflammation (ex :TNF α) et sur d'autres protéines impliquées dans la lipolyse (ApoCIII, LPL).

Par ailleurs nous avons mis en évidence une relation entre l'allèle ϵ 2 l'ApoAI et LpAI. Ces résultats suggèrent que l'apoE pourrait jouer un rôle dans le catabolisme des HDL au travers des récepteurs cellulaires spécifiques pour l'ApoE.

Même si, en temps normal, les HDL circulantes sont de différentes origines, il serait intéressant de pouvoir apprécier leur production dans des modèles cellulaires transfectés par un des polymorphismes et évaluer la sécrétion de l'apoAI et des HDL.

Le développement d'une méthode de mesure de l'absorption intestinale du cholestérol, en présence de stérols spongiaires, a représenté notre deuxième objectif. En utilisant Caco-2 comme modèle de cellules entérocytaires nous avons pu observer une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol et l'augmentation de l'expression d'ABCA1 en présence d'un mélange stérolique et du 24-isopropylcholestérol.

Au vu de ces résultats de nombreuses questions restent posées. Quel(s) est(sont) le(s) mécanisme(s) par le(s) quel(s) ces stérols spongiaires et le 24-isopropylcholestérol peuvent diminuer le trafic du cholestérol du milieu apical au milieu basolatéral des cellules Caco-2 ?

La première hypothèse qui s'impose au premier abord est que les stérols et le 24-isopropylcholestérol rentraient en compétition avec le cholestérol pour la formation des micelles et donc moins de disponibilité du cholestérol dans celles-ci. Cette supposition est renforcée par des études sur la compétition des phytostérols avec le cholestérol. Une approche consisterait à rechercher une interaction physique de ces stérols avec les micelles contenant le cholestérol.

La deuxième question posée est : Existe-t-il une relation directe entre la diminution de la captation cellulaire et la sécrétion du cholestérol dans le compartiment basolatéral et les modifications de l'expression des transporteurs ABC. De nombreux travaux ont clairement démontré l'implication des transporteurs ABCA1 dans l'efflux du cholestérol et les ABCG5/G8 dans l'excrétion du cholestérol de la cellule vers le milieu apical. Dans le modèle Caco-2, en présence de micelles contenant le 24-isopropylcholestérol, il n'a pas été possible de mettre en évidence de variations des ARNm d'ABCG5/G8. Dans la littérature ce transporteur est faiblement exprimé dans les cellules Caco-2. Cependant, l'incubation des cellules Caco-2 avec les mêmes micelles contenant le 24-isoprpylcholestérol est accompagnée par une augmentation significative des ARNm d'ABCA1 suggérant un rôle du facteur de transcription LXR activateur des ABC. Les observations rapportées dans ce mémoire ne permettent pas de corréliser directement les variations des ARNm d'ABCA1 avec la diminution de la captation et la sécrétion du cholestérol dans le compartiment basolatéral. On peut simplement noter que dans les cellules Caco-2 incubées avec des micelles contenant le 24-isopropylcholestérol et le mélange stérolique ces deux phénomènes co-existent et il faudrait réaliser des études complémentaires chez d'autres cellules épithéliales ou hépatiques (ex : HepG2) exprimant ces deux transporteurs à l'état basal et évaluer leur expression membranaire en présence de ces stérols.

Les études sur l'absorption et sur l'expression d' ABCA1 que nous avons menées, en présence des stérols spongiaires, montrent l'intérêt du modèle Caco-2 pour étudier la biogénèse des lipoprotéines d'origine intestinale et surtout les HDL qui sont sous le contrôle d'ABCA1. L'évaluation de ces molécules chez la cellule Caco-2 apporterait des informations complémentaires sur la synthèse de ces lipoprotéines et leurs contenus (ex : l'ApoAI, l'ApoAIV, l'ApoB, les triglycérides, le cholestérol....).

Chez l'animal comme chez l'homme l'absorption intestinale du cholestérol est réduite en présence de phytostérols. L'étude de l'influence des stérols spongiaires sur l'absorption du cholestérol chez l'animal en appliquant une des méthodes déjà décrites (Joki 2003; Wang 2003) permettrait de replacer les observations décrites in vitro dans un contexte physiologique. Cette étude est utile pour confirmer les résultats obtenus chez Caco-2 et indispensable pour étudier la cholestérolémie et un certain nombre de paramètres au niveau intestinal : l'expression des protéines et enzymes intestinales impliquées dans la captation du cholestérol, l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines intestinales : ex : NPC1L1, le récepteur SR-B1, La protéine MTP, l'activité ACAT-2.

D'autres purifications seront envisagées afin d'obtenir les molécules isolées. Cet axe devrait permettre la mise en évidence d'autres molécules à l'origine de la diminution de l'absorption du cholestérol. De plus, la diminution de l'absorption du cholestérol n'est pas le seul phénomène expliquant l'intérêt de ces stérols. L'augmentation d' ABCA1 qui est observée sous l'influence de ces stérols montre une voie intéressante soulignant leur intérêt dans la biogénèse des HDL.

En conclusion, les études réalisées dans cette thèse s'inscrivent dans une démarche visant une meilleure compréhension des facteurs de risque, modifiables et non modifiables, qui contrôlent le développement de l'athérosclérose chez l'Homme.

References

Acton S, R. A., Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." Science **271**: 518-20.

Acton, S., Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." Science **271**: 518-20.

Acton SL, S. P., Lodish HF, Krieger M (1994). "Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor." J Biol Chem **269**: 21003-9.

Agerholm-Larsen B, T.-H. A., Schnohr P, Steffensen R, Nordestgaard BG (2000). "Common cholesteryl ester transfer protein mutations decreased HDL cholesterol, and possible decrease risk of ischemic heart disease: the Copenhagen study." Circulation **102**: 2197-2203.

Aggarwal D, W. K., Zern TL, Shrestha S, Vergara-Jimenez M, Fernandez ML (2005). "JTT-130, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor lowers plasma triglycerides and LDL cholesterol concentrations without increasing hepatic triglycerides in guinea pigs." BMC Cardiovasc Disord **5**: 30.

Alaupovic, P. (1972). "Protides Biol." Fluids Proc. Colloq **19**: 9-19.

Altmann SW, D. H. J., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP (2004). "Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption." Science **303**: 1201-1204.

Altshuler D, H. J., Klannemark M, et al (2000). "The Common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes." Nat Genet **26**: 76-80.

Amar, M., Dugi KA., Haudenschild CC., Shambureck RD., Fogger B., Chase M., Bensandoun A., Hoyt RF Jr., Brewer HB Jr and Santamarina-Fojo S (1998). "Hepatic lipase facilitates the selective uptake of cholesteryl esters from remnants lipoproteins in apoE-deficient mice." J Lipid Res **39**: 2436-42.

Andersson SW, S. J., Ellegard L, Welch AA, Bingham A, Mulligan A, et al (2004). "Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study." Eur J Clin Nutr **58**: 1378-85.

Arai H, Y. A., Matsuzawa Y, Saito Y, Yamada N, Oikawa S, Mabuchi H, Teramoto T, Sasaki J, Nakaya N, Itakura H, Ishikawa Y, Ouchi Y, Horibe H, Egashira T, Hattori H, Shirahashi N, Kita T (2005). "Polymorphisms in four genes related to triglyceride and HDL-cholesterol levels in the general Japanese population in 2000." J Atheroscler Thromb **12**(5): 240-250.

Arai T, Y. S., Hirano K, Sakai N, Kotani K, Fujioka S, Nozaki S, Keno Y, Yamane M, Shinohara E (1994). "Increased plasma cholesteryl ester transfer protein in obese subjects. A possible mechanism for the reduction of serum HDL cholesterol levels in obesity." Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol **14**: 1129-36.

Auboeuf D, et al. (1997). "Tissue Distribution and Quantification of the Expression of mRNAs of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Liver X Receptor- α in Humans, No Alteration in Adipose Tissue of Obese and NIDDM Patient." Diabetes **46**: 1319-27.

Auwerx J (1999). "PPAR, the ultimate thrifty gene." Diabetologia **42**: 1033-49.

Barrans A., Collet X, Barbaras R, Jaspard B, Manent J, Vieu C, Chap H, and Perret B. (1994). "Hepatic lipase induces the formation of pre- β ₁ high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL₂." J Biol Chem **269**: 11572-7.

Barter PJ, H. B. B. J., M. John Chapman, Charles H. Hennekens, Daniel J. Rader, Alan R. Tall (2003). "Cholesteryl ester transfer protein a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis" Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**: 160-167.

Basu SK, H. Y., Brown MS, Bilheimer DW, Anderson RG and Goldstein JL (1982). "Biochemical and genetic studies of the apolipoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes." J Biol Chem **257**: 9788-95.

Berge KE, T. H., Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000). "Accumulation of dietary cholesterol in sistosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters." Science **290**: 1771-1775.

Bergeron, N., Kotite L., Verges M., Blanche P., Hamilton RL., Krauss RM., Bensandoun A and Havel RJ (1998). "Lamellar lipoproteins uniquely contribute to hyperlipidemia in mice doubly deficient in apolipoprotein E and hepatic lipase." Proc natl Acad Sci USA **95**: 15647-52.

Bietrix F, D. Y., Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Coméra C, Shaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Tercé F, Collet X (2006). "Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI." J. Biol. Chem. **281**(11): 7214-9.

Bishop-Bailey D, H. T., and Warner TD (2000). "Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) is a PPAR agonist in an ECV304 cell line." British Journal of Pharmacology **131**: 651-4.

Blake WL, C. S. (1990). "Suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat." I. Nutr. **120**: 1727-9.

Blanquart C, M. R., Paumelle R, Fruchart JC, Staels B, and Glineur C (2004). "The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor α ." Mol Endocrinol **18**: 1906-18.

Bortnick, A., Rothblat GH., Stoudt G., Hoppe KL., Royer LJ., McNeish J and Francone OL (2000). "The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines." J Biol Chem **275**: 28634-40.

Bosner SM, L. L., Stenson WF & Ostlund RE (1999). "Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry." Journal of Lipid Research **40**: 302-8.

Brandt, J. M., Djouadi, F., and Kelly, D.P (1998). "Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyl transferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha." J. Biol. Chem. **273**: 23786-23792.

Brooks-Wilson, A., Marcil M., Clee SM., Zang LH., Roomp K., van Dam M., Yu L., Brewer C., Collins JA., Molhuizen HO., Luobser O., Oulette BF., Fichter K., Ashbourne-Excoffon KJ., Sensen CW., Scherer S., Mott S., Denis M., Martindale D., Frohlich J., Morgan K., Koop B., Pimstone S., Kastelein JJ and Hayden MR (1999). "Mutations in ABCA1 in Tangier disease and familial high density lipoprotein deficiency." Nat Genet **22**: 316-8.

Brousseau ME, O. C. J. J., Ordovas JM, Collins D, Otovos JD, Massov T, McNamara JR, Rubins HB, Robins SJ, Schaefer EJ (2002). "Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**: 1148-1154.

Brown M L, I. A., Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H, et al (1989). "Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high density lipoproteins." Nature **342**: 448-51.

Brown ML, R. M., Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, et al (2000). "A macrophage receptor for apolipoprotein B48: Cloning, expression, and atherosclerosis." PNAS: 7488-93.

Brunham LR, K. J., Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR (2006). "Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo." J. Clin. Invest. **116**: 1052-62.

Buhman KK, A. M., Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S., Farese RV Jr. (2000). "Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice." Nat. Med. **6**: 1341-7.

Burgermeister E, S. R. (2007). "MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma." Cell Cycle **6**(13): 1539-48.

Burns KA, V. H. J. (2007). "Modulation of PPAR activity via phosphorylation." Biochim. Biophys. Acta **1771**: 952-60.

Cai SF, K. R., Howles PN, Hui DY (2001). "Differentiation dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine." J. Lipid Res **42**: 902-9.

Castro, G., Fielding, CJ (1988). "Early incorporation of cell derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein." Biochemistry **27**: 25-9.

Castro GR., F. C. (1988). "Early incorporation of cell derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein." Biochemistry **27**: 25-9.

Chhabra S., N. R., Lakshmy R., Das N. (2005). "APOA1-75 G to A substitution associated with severe forms of CAD, lower levels of HDL and apoA-I among Northern Indians." Dis Markers **21**(4): 169-74.

Chinetti G, F. J., Staels B (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the cross-roads between lipid metabolism and inflammation. ." Inflamm Res **49**: 497-505.

Chinetti G, G. F., Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B (2000). "CLA-1/SR-B1 is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)." Circulation **101**: 2411-7.

Chinetti G, G. S., Antonucci M et al. (1998). "Activation of proliferator-activated receptor alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophage." J Biochem **273**: 25573-80.

Chinetti G., e. a. (2001). "PPAR alpha and PPAR gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway." Nat. Med. **7**: 53-58.

Christiansen-Weber, T., Volland JR., Wu Y., Ngo K., Roland BL., Nguyen S., Peterson PA., Fung-Leung WP (2000). "Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency." Am J Pathol **157**: 1017-29.

Clavey, V., Lestavel-Delattre, S., Copin, C., Bard, JM., Fruchart, JC. (1995). "Modulation of Lipoprotein B Binding to the LDL Receptor by Exogenous Lipids and Apolipoproteins CI, CII, CIII, and E " Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**: 963-71.

Corbex M, P. O., Fumeron F, Betoulle D, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Cambien F (2000). "Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction." Genet Epidemiol **19**(1): 64-80.

Daniel H.van Raalte, M. L., Haydn Pritchard, Kishor M. Wasan (2004). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-alpha: A Pharmacological Target with a Promising Future." Pharmaceutical Research **21**(9): 1531-1538.

Davis HR, Z. L., Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Lui JL, Yao X, Iyer SPN, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. (2004). "Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis." J. Biol. Chem. **297**: 33586-92.

Desvergne B, W. W. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocrine Reviews **20**: 649-88.

Devchand PR, K. H., Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ & Wahli W (1996). "The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control." Nature **384**(39-43).

Duval C, T. V., Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, Staels B, Lestavel S (2006). "Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine." Biochem Biophys Res Commun **340**(4): 1259-63.

- Eisenberg S. (1984). "High density lipoprotein metabolism." J Lipid Res **25**: 1017-58.
- Fielding, J. C., Fielding, P.E. (1995). "Molecular physiology of reverse cholesterol transport." J. Lipid Res **36**: 211-228.
- Flavell DM, J. Y., E. Hawe, I. Pineda Torra, M.R. Taskinen, M.H. Frick, M.S. Nieminen, Y.A. Kesaniemi, A. Pasternack, B. Staels, G. Miller, S.E. Humphries, P.J> Talmud, M. Sylvanne. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease." Circulation **105**: 1440-1445.
- Fojo, S., Brewer. HB (1992). "Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II." J. Intern. Med. **231**: 669-77.
- Forman, B. M., et al (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ ." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 4312-7.
- Francone OL, G. A., Fielding C (1989). "Distribution and functions of lecithin : cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins AI and D that catalysed the esterification and transfer of cell-derived cholesterol." J Biol Chem **264**(12): 7066-72.
- Fruchart JC , D. P., Staels B (1999). "PPAR α activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis." Current Opinion in Lipidology **10**: 245-57.
- Funke H, W. H., Fuer L, Muntoni S, Schulte H, Assmann G (1994). "Identification of mutations in the cholesterol ester transfer protein in Europeans with elevated high density lipoprotein cholesterol." Circulation **90**(pt2): I-241.
- G. Luc, J.-M. L., J.-M. Bard, E. Hachulla, J.-C. Fruchart, B. Devulder (1991). Cholestérol et Ath rocl rose, Masson S.A Paris.
- Gautier T, M. D., de Barros JP, Athias A, Gambert P, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Lagrost L (2000). "Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity." J Biol Chem **275**: 37504-09.
- Ge K, G. M., Yuan CX, et al. (2002). "Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR γ 2-stimulated adipogenesis." Nature **417**(6888): 563-7.
- Ginsberg HN, L. N., Goldberg IJ., Gibson JC., Rubinstein A., Wangiverson P., Norum R., Brown., WV (1986). "Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI." J. Clin. Invest. **78**: 1287-95.
- Glass CK, R. D. a. R. M. (1997). "Nuclear receptor coactivators." Curr Opin Cell Biol **9**: 222-32.

Glomset, J. (1968). "The plasma lecithin : cholesterol acyltransfer reaction." J Lipid Res **9**: 155-67.

Green PHR., T. A. a. G. R. (1978). "Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein." J Clin Invest **61**: 528-34.

Gualberto Ruano, R. L. S., Andreas Windemuth, Stefan Zollner, Gregory J. Tsongalis, Jose Ordovas, James Otvos, Cherie Bilbie, Mary Miles, Robert Zoeller, Paul Visich, Paul Gordon, Theodore J. Angelopoulos, Linda Pescatello, Niall Moyna, Paul D. Thompson (2006). "Apolipoprotein A1 genotype affects the change in high density lipoprotein cholesterol subfractions with exercise training." Atherosclerosis **185**: 65-69.

Hamilton RL ., W. M., Fielding CJ and Havel RJ (1976). "Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver." J Clin Invest **58**: 667-80.

Hansen GH, N.-C. L., Immerdal L, Danielsen EM (2003). "Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption." Gut **52**: 1424-31.

Hara, H., Yokohama, S (1991). "Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol." J Biol Chem **266**: 3083-6.

Hauser H, D. J. H., Nandy A, Vega MA, Werder M, Bieliauskaite E, Weber FE, Compassi S, Gemperli A, Boffelli D, Wehrli E, Schulthess G, Phillips MC (1998). "Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine." Biochemistry **37**: 17843-50.

Hayek T, O. J., Brook JG and Aviram M (1994). "Role of HDL apolipoprotein E in cellular cholesterol efflux : Studies in apoE knockout transgenic mice." Biochem Biophys Res Commun **295**: 1072-78.

Hendriks HF, W. J., Van Vliet T, Meijer GW (1999). "Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects." Eur J Clin Nutr **53**: 319-27.

Hoefner DM, Hodel SD., O'Brien JF, Barnum EL, Sun D., Meissner I, McConnell JP., (2001) Development of a Rapid, Quantitative Method for LDL Subfractionation with Use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. Clin Chem **47** : 266-274

Hoffman HN, F. D. (1965). "Tangier disease (familial high density lipoprotein deficiency). Clinical and genetic features in two adults." Am J Med **39**: 582-93.

Homma Y, I. I., Ishikawa T, Tateno M, Sugano M, Nakamura H (2003). "Decrease in plasma low-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, cholesteryl ester transfer protein, and oxidized low-density lipoprotein by plant stanol ester-containing spread: A randomized, placebo-controlled trial " Nutrition **19**(4): 369-74.

- Howell TJ, M. D., Jones PJH (1998). "Phytosterols partially explain differences in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding." J Lipid Res **39**: 892-900.
- Hu E, K. J., Sarraf P, Spiegelman BM (1996). "Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma." Science **274**: 2100-3.
- Hussain MM (2000). "A proposed model for the assembly of chylomicrons." Atherosclerosis **148**: 1-15.
- Hussain MM, F. S., Pan X, Iqbal J (2005). "Intestinal lipoprotein assembly." Curr. Opin. Lipidol. **16**: 281-5.
- Ikeda I, K. A., Samezima K, Sugano M (1981). "Antihypercholesterolemic activity of β -sitostanol in rabbits." J Nutr Sci Vitaminol **27**: 243-51.
- Inazu A, B. M., Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR (1990). "Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation." N Engl J Med **323**: 1234-1238.
- Inazu A, K. J., Haraki T, Yagi K, Wakasugi T, Takegoshi T, Mabuchi H, Takeda R (1993). "Rapid detection and prevalence of cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by an intron 14 splicing defect in hyperalphalipoproteinemia." Hum Genet **91**: 13-6.
- Jeenah M, K. A., Miller N, Humphries SE (1990). "G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations." Mol Biol Med **7**: 233-41.
- Jian B, d. I. L.-M. M., Ji Y, Wang N, Phillips MC, Swaney JB, Tall AR, Rothblat GH (1998). "Scavenger Receptor Class B Type I as a Mediator of Cellular Cholesterol Efflux to Lipoproteins and Phospholipid Acceptors." J. Biol. Chem. **273**: 5599-606.
- Joki, P. (2003). "Cholesterol precursors and plant sterols in children with food allergy." Am J Clin Nutr **77**(1): 51-5.
- Jones PJ, M. D., Ntanios F, Vanstone CA. (1997). "Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans." Can.J Physiol Pharmacol. **75**: 217-27.
- K Yamakawa-Kobayashi K, H. I., T Arinami, R Miyazaki, H Hamaguchi (2002). "A Val227Ala polymorphism in the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha) gene is associated with variations in serum lipid levels." J Med Genet **39**: 189-191.
- Keqin Zheng, S. Z., Li Zhang, Yong He, Linchuan Liao, Yiping Hou, Dejie Huang (2005). "Carriers of three polymorphisms of cholesteryl ester transfer protein gene are at increased risk to coronary heart disease in a Chinese population." International Journal of Cardiology **103**: 259-265.
- Khan Q.D., P. D. E., Lyengar S., Ye S (2004). "Evidence of differing genotypic effects of PPAR α in women and men." J Med Genet **41**: e79.

Kil Soo Kim, S. M. C., Seung Uoo Shin, Hyun Sung Yang, and Yoosik Yoon (2004). "Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 Pro12Ala Polymorphism on Body Fat Distribution in Female Korean Subjects." Metabolism **53**(12): 1538-1543.

Klett EL, P. S. (2004). "Will the real cholesterol transporter please stand up." Science **303**: 1149-50.

Kliwer SA, L. J., Willson TM, Patel I, Morris DC, and Lehmann JM. (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation." Cell **83**: 813-9.

Kliwer SA, S. S., Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ ." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 4318-23.

Kliwer SA, U. K., Noonan DJ, Heyman RA & Evans RM (1992). "Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors." Nature **358**: 771-4.

Knight BL (2004). "ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux." Biochem Soc Trans **32**: 124-7.

Koch M, R. K., Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Horing HU (1999). "The PPAR γ 2 amino acid polymorphism Pro12Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in subgroup of obese subjects." Diabetologia **42**: 758-62.

Koizumi J, I. A., Yagi K, Koizumi I, Uno Y, Kajinami K, Miyamoto S, Moulin P, Tall AR, Mabuchi H (1991). "Serum lipoprotein lipid concentration and composition in homozygous and heterozygous patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency." Atherosclerosis **90**(2-3): 189-96.

Komaromy, M., Azhar S., and Cooper AD (1996). "Chinese hamster ovary cells expressing a cell surface-anchored form of hepatic lipase." J Biol Chem **271**: 16906-14.

Korpela R, T. J., Höglström P, Seppo L, Piironen V, Salo-Väänänen P, Toivo J, Lamberg-Allardt C, Kärkkäinen M, Outila T, Sundvall J, Vilkkilä S, Tikkanen MJ. (2006). "Safety aspects of cholesterol-lowering efficacy of low fat dairy products containing plant sterols." Eur. J. Clin. Nutr. **60**: 633-42.

Kozarsky, K., Donahee MH., Rigotti A., Iqbal SN., Edelman ER and Krieger M (1997). "Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels " Nature **387**: 414-7.

Krey G, B. O., L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG and Wahli W (1997). "Fatty acids, eicosanoids and hypolipidaemic agents identified as ligands of PPARs by co-activator dependent receptor ligand assay." Mol. Endocrinol **11**: 779-91.

Krimbou L, D. M., Haidar B, Carrier M, Marcil M and Genest J Jr (2004). "Molecular interactions between apolipoprotein E and the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) : Impact on Apo E lipidation." J Lipid Res **45**: 839-48.

Kuivenhoven JA, J. J., Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ (1998). "The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis: the Regression Growth Evaluation Statin Study Group." N Engl J Med **338**: 86-93.

Lambert G, A. M., Guo G, Brewer HB Jr, Gonzalez FJ, Sinal CJ (2003). "The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis." J Biol Chem **278**(4): 2563-70.

Lammert, F., Wang, D.Q.H (2005). "New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption." Gastroenterology **129**: 718-734.

Lawn RM, W. D., Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF (1999). "The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway." J Clin Invest **104**: 8.

Lehmann JM, M. L., Smith-Oliver TA, Wilkinson WO, Willson TM & Kliewer SA (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma." Journal of Biological Chemistry **270**: 12953-6.

Levy E., Y. W., Seidman EG., Garofalo C., Delvin E., Nard M (1999). "Caco-2 cells and human fetal colon: a comparative analysis of their lipid transport." Biochim. Biophys. Acta **1439**: 353-362.

Liao H, L. T., Schmitz G, Zhu Y (2002). "Native LDL Upregulation of ATP-Binding Cassette Transporter-1 in Human Vascular Endothelial Cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**: 127.

Ling WH, J. P. (1995). "Minireview: Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects." Life Sciences **57**: 195-206.

Lloyd, D., Maruja E. Lira, Linda S. Wood, L. Kathryn Durham et al (2005). "Cholesteryl ester transfer protein variants have differential stability but uniform inhibition by Torcetrapib." J. Bio. Chem **280**(15): 14918-14922.

Lloyd DB, M. E. L., Linda S. Wood, L. Kathryn Durham et al (2005). "Cholesteryl ester transfer protein variants have differential stability but uniform inhibition by Torcetrapib." J. Bio. Chem **280**(15): 14918-14922.

Luc G, B. J., Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Arveiler D, Fruchart JC, Ducimetiere P (2002). "Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1155-61.

Luc, G., Fievet, C., Arveiler, D., et al. (1996). "Apolipoproteins CIII and E in apoB- and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study." J Lipid Res **37**: 508-17.

Lusis A J, Z. S., Sparkes RS, Klisak I, Mohandas T, Drayna D, and Lawn RM (1987). "Assignment of the human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21." Genomics **1**(3): 232-5.

Mahley RW, R. S. J. (2000). "Apolipoprotein E : far more than a lipid transport protein." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 507-37.

Malmendier CL, D. C. (1985). "Effect of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia." Atherosclerosis **55**: 161-9.

Marcel YL, M. R., Hogue M, Czarnecka H, Zawadzki Z, Weech PK, Whitlock ME, Tall AR, Milne RW (1990). "Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects." J Clin Invest **85**(1): 10-17.

Marcovina S.M., M. J. D. (1995). "Structure and metabolism of lipoprotein (a)." Curr Opin Lipidol **6**: 136-145.

Mardones P, Q. V., Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, et al (2001). "Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice." J. Lipid Res **42**: 170-80.

Marie-Claude Vohl, P. L., Daniel Gaudet, Carl G. Brewer, Christine Bétard, Patrice Perron, Ghislaine Houde, Christine Cellier, Janet M. Faith, Jean-Pierre Després, Kenneth Morgan, Thomas Hudson (2000). "Molecular scanning of the human PPAR-alpha gene: association of the L162V mutation with hyperapobetalipoproteinemia." Journal of Lipid Research **41**: 945-952.

Martin G, P. H., Hennuyer N, Crombie D, Fruchart JC, Heyman RA, Besnard P, Auwerx J (2000). "Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer selective rexinoids suggests that the PPAR-RXR heterodimer is their molecular target." J. Biol. Chem. **275**: 12612-12618.

Mascaro C, A. E., Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D (1998). "Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor." J Biol Chem **273**: 8560-3.

Masud S, Y. S. (2003). "Effect of the peroxisome proliferators activated receptor- α gene Pro12Ala variant on body mass index: A meta-analysis." J Med Genet **40**: 773-780.

Matsunaga, A., Sasaki J, Han H, Huang W, Kugi M, Koga T, Ichiki S, Shinkawa T, Arakawa K. (1999). "Compound heterozygosity for an apolipoprotein A1 gene promoter mutation and a structural nonsense mutation with apolipoprotein A1 deficiency." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(2): 348-55.

Mazzone, T., Gump, H., Diller, P and Getz, GS (1987). "Macrophage free cholesterol content regulates apolipoprotein E synthesis." J Biol Chem **262**: 11657-62.

- McConathy, W., Gesquiere, JC., Bass H., Tartar A, Fruchart, JC., Wang CS (1992). "Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III." J. Lipid Res **33**: 995-1003.
- McNeish, J., Aiello RJ., Guyot D., Turi T, Gabel C, Aldinger C., Hoppe KL., Roach ML., Royer LJ., de Wet J., Broccardo C., Chimini G and Francone OL (2000). "High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1." Proc Natl Acad Sci USA **97**: 4245-50.
- McPherson R, M. C., Tall AR, Hogue M, Martin L, Milne RW and Marcel YL (1991). "Plasma concentrations of cholesteryl ester transfer protein in hyperlipoproteinemia. Relation to cholesteryl ester transfer protein activity and other lipoprotein variables." Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **11**: 797-804.
- Mellies MJ, S. E., Khoury P, Lamkin G, Glueck CJ (1987). "Effects of fenofibrate on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in 33 subjects with primary hypercholesterolemia." Atherosclerosis **63**: 57-64.
- Miettinen TA (1980). "Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis." Eur J Clin Invest **10**: 27-35.
- Misra P, Q. C., Yu S, et al (2002). "Interaction of PIMT with transcriptional coactivators CBP, p300, and PBP differential role in transcriptional regulation." Journal of Biological Chemistry **277**(22): 20011-9.
- Moghadasian MH, M. B., Pritchard PH, Frohlich JJ (1997). ""Tall Oil"-Derived Phytosterols Reduce Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice " Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **17**: 119-126.
- Moulin P, C. M., Bruce C, Zhong S, Cocke T, Richardson H, Tall AR (1994). "Gender effects on the distribution of the cholesteryl ester transfer protein in apolipoprotein A-I-defined lipoprotein subpopulation." J Lipid Res **35**(5): 793-802.
- Mulligan JD, F. M., Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR, Attie AD (2003). "ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens." J. Biol. Chem. **278**: 13356-66.
- Nakamura, K., Kennedy MA., Baldan A., Bojanic DD., Lyons K., Edwards PA (2004). "Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoform that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein." J Biol Chem **279**: 45980-45.
- Navab M., H. S., Cooke CJ., Anantharamaiah GM., Chaddha M., Jin L., Subbanagounder G., Faull KF., Reddy ST., Miller NE., et al (2000). "Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1." J. Lipid Res **41**(9): 1481-94.

- Nazih H, N.-S. F., Krempf M, Michel Huvelin J, Mercier S, Marie Bard J (2001). "Butyrate stimulates ApoA-IV-containing lipoprotein secretion in differentiated Caco-2 cells: role in cholesterol efflux." J Cell Biochem **83**(2): 230-8.
- Nishida HI, A. H., Nishida T (1993). "Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins." J Biol Chem **268**(22): 16352-60.
- Nissinen MJ, G. H., Miettinen TA (2006). "Effects of plant stanol esters supplied in a fat free milieu by pastilles on cholesterol metabolism in colectomized human subjects." Nutr Metab Cardiovasc Dis **16**(6): 426-35.
- Nolan JJ, e. a. (1994). "Improvement in Glucose Tolerance and Insulin Resistance in Obese Subjects Treated with Troglitazone." New England J. of Med. **331**(18): 1188-93.
- Ntanios FY, J. P., Frohlich JJ (1998). "Dietary sitostanol reduces plaque formation but not lecithin cholesterol acyl transferase activity in rabbits." Atherosclerosis **138**: 101-10.
- Oh EY, M. K., Chung JH, et al (2000). "Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor- α 2 in Korean diabetic and obese subjects." J Clin Endocrinol Metab **85**: 1801-4.
- Olivecrona G., B. U. (1997). "Lipid Binding of Apolipoprotein CII Is Required for Stimulation of Lipoprotein Lipase Activity Against Apolipoprotein CII-Deficient Chylomicrons." Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol **17**: 1545-9.
- Ordovas, J. M., Corella D, Cupples LA, Demissie S., Kelleher A., Coltell O., Wilson PW., Schaefer EJ., Tucker K. (2002). "Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study." Am J Clin Nutr **75**: 38-46.
- Ordovas, J. M., Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, Lahoz C, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ. (2000). "Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk. ." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**: 1323-1329.
- Orso, E., Broccardo C., Kaminsky WE., Bottcher A., Liesbisch G., Drobnik W., Gotz A., Chambenoit O., Diederich W., Langmann T., Spruss T., Luciani MF., Rothe G., Lackner KJ., Chimini G., and Schmitz G (2000). "Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice." Nat Genet **24**: 192-6.
- Ostlund RE, J. (2002). "Phytosterols in human nutrition." Annual Review of Nutrition **22**: 533-49.
- Pagani F, S. A., Giudici GA, Barenghi L, Vergani C, Baralle FE (1990). "Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia." J Lipid Res **31**: 1371-7.

Patsch, J., Gotto, AM Jr., Olivercrona, T and Eisenberg, S (1978). "Formation of high density lipoprotein-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro." Proc Natl Acad Sci USA **75**: 4519-32.

Paul, H., Galton D., Stock J. (1987). "DNA polymorphic patterns and haplotype arrangements of the apo A-1, apo C-III apo A-IV gene cluster in different ethnic group." Hum Genet **75**(3): 264-8.

Peet DJ, T. S., MA W, Janowsky BA, Lobaccaro JMA, Hammer RE, Mangelsdorf DJ (1998). "Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha." Cell **93**: 693-704.

Pennacchio, L. e. a. (2001). "An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing." Science **294**(5540): 169-73.

Pinto M, R.-L. S., Appay M-D, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983). "Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture." Biol. Cell **47**: 323-30.

Plat J, M. R. (2005). "Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects." Am J Cardiol **96**: 15-22.

Plat, J., Nichols, J.A., Mensink, R. P. (2005). "Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation." J Lipid Res **46**: 2468-2476.

Plosch T, K. T., Bloks VW, Smit MJ, Havinga R, Chimini G, Groen AK, Kuipers F (2002). "Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1." J Biol Chem **277**: 33870-7.

Plump AS, S. J., Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM and Breslow JL (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." Cell **71**: 343-53.

Prieur X, C. H., and Rodríguez JC (2003). "The human apolipoprotein AV gene is regulated by PPAR alpha and contains a novel FXR response element." J. Biol. Chem. **278**(28): 25468-80.

Remaley, A., Stonil JA., Demosky SJ., Neufeld EB., Bocharov AV, Vishnyakova TG., Eggerman TL., Patterson AP., Duverger NJ., Santamarina-Fojo S and Brewer HB Jr (2001). "Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter." Biochem Biophys Res Commun **280**: 818-23.

Repa JJ, B. K., Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ (2002). "Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta." J Biochem **277**: 18793-18800.

Repa JJ, T. S., Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ (2000). "Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers." Science **289**: 1524-29.

Rigotti A, A. S., Krieger M (1995). "The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids." J Biol Chem **270**: 16221-4.

Rigotti, A., Trigatti B., Babitt J., Penman M., Xu S., and Krieger M (1997a). "Scavenger receptor BI – a cell surface receptor for high density lipoprotein." Curr Opin Lipidol **8**: 181-8.

Rigotti, A., Trigatti B., Penman M., Rayburn H., Herz J and Krieger M (1997b). "A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 12610-5.

Rothblat, G., Phillips MC (1982). "Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration." J Biol Chem **257**: 4775-82.

Rubins HB, R. S., Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J (1999). "Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group." N. Engl. J. Med. **341**(6): 410-8.

Sadaf A, S. S., Lestringant GG, Frossard PM. (2002). "Apolipoprotein AI promoter variant in blood pressure determination." Clin Genet **61**: 314-6.

Sane AT, S. D., Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF, Levy E (2006). "Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine." J Lipid Res **47**: 2113-20.

Santamarina-Fojo S, e. a. (2000). "Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 7987-92.

Schiele F, B. D., Vincent-Viry M, Beisiegel U, Ehnholm C, Evans A, Kafatos A, Martins MC, Sans S, Sass C, Visvikis S, Backer GD, Siest G (2000). "Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries : the ApoEurope Project." Atherosclerosis **152**: 475-88.

Schoonjans K, S. B., Auwerx J (1996). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression." J Lipid Res **37**(5): 907-25.

Schwartz K, L. R., Wade DP (2000). "ABC1 gene expression and ApoA-1-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR." Biochem Biophys Res Commun **274**: 794-802.

Sehayek, E., Ono JG., Shefer S., Nguyen LB, Wang N., Batta AK., Salen G., Smith JD., Tall AR and Breslow JL (1998). "Biliary cholesterol excretion : A novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption." Proc Natl Acad Sci USA **95**: 10194-9.

Shalev A, S.-K. A., Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA (1996). "The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein : regulation by insulin." Endocrinology **137**: 4499-4502.

Siest G, P. T., Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S (1995). "Apolipoprotein E : An important gene and protein to follow in laboratory medicine." Clin. Chem. **41**(8): 1068-86.

Silver, D., Wang N, Xiao X, and Tall AR (2001). "HDL particle uptake mediated by SR-BI results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion." J Biochem **276**: 25287-93.

Slight I, B. M., Malo C, Delvin E, Lambert M, Levy E (2004). "Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush-border membrane." Exp Cell Res **300**(1): 11-22.

Smith WM, Z. X., Kurose K, Gao X, Latif F, Kroll T, Sugano K, Cannistra SA, Clinton SK, Maher ER, Prior TW, Eng C (2001). "Opposite association of two PPARG variants with cancer: overrepresentation of H449H in endometrial carcinoma cases and underrepresentation of P12A in renal cell carcinoma cases." Hum Genet **109**: 146-51.

Sorkin S.C, F. F. J., Hirata M.H., Guzman E.C., Cavalli S.A., Bertolami M.C., Salazar L.A., Hirata R.D. (2005). "APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals." Clin Chem Lab Med **43**(12): 1339-45.

Staels B, D. J., Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. (1998). "Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism." Circulation **98**: 2088-93.

Stangl H, C. G., Wyne KL, Hobbs HH (1998). "Scavenger receptor, class B, type-I-dependent stimulation of cholesteryl esterification by high density lipoproteins, low density lipoproteins and nonlipoprotein cholesterol." J. Biol. Chem. **273**: 31002-8.

Tai E.S., C. D., Demissie S., Cupples L.A. et al (2005). "Polyunsaturated fatty acids interact with the PPARA-L162 polymorphism to affect plasma triglyceride and apolipoprotein C-III concentrations in the Framingham Heart Study." J. Nutr **135**: 397-403.

Tai ES, S. D., L.A. Cupples, D. Corella, et al (2002). "Association between the PPARA L162V Polymorphism and plasma lipid level: The Framingham Offspring Study." Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol **22**: 805-810.

Takahashi K, J. X., Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Bujo H, Yamazaki H, Kusunoki J, Miura T, Kussie P, et al (1993). "A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins." J Clin Invest **92**(4): 2060-4.

Takashi K, J. X., Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Bujo H, Yamazaki H, Kusunoki J, Miura T, Kussie P, et al (1993). "A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins." J Clin Invest **92**(4): 2060-4.

Thaunat, O. (2003). Athérocérose hypertension thrombose. Paris, Med-line éditions.

Torchia J, G. C. a. R. M. (1998). "Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses." Curr Opin Cell Biol **10**: 373-83.

Trotter PJ, H. S., Storch J (1996). "Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells." J Lipid Res **37**(2): 336-46.

Tso P, F. K. (1991). "The absorption and transport of lipids by the small intestine." Brain. Res. Bull. **27**: 477-82.

Ueda, Y., Royer L., Gong E., Zhang J., Cooper PN., Francone O., Rubin EM (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." J Biol Chem **274**: 7165-71.

Vaisman, B., Amar, M., Amar, M (2001). "ABCA 1 overexpression leads to hyperalpha lipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice." J Clin Res **108**: 303-9.

Valve R, e. a. (1999). "Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women." J. Clin. Endocrinol. Metab. **84**: 3708-12.

van Greevenbroek MM, E. D., de Bruin TW (2000). "Caco-2 cells secrete two independent classes of lipoproteins with distinct density: effect of the ratio of unsaturated to saturated fatty acid." Atherosclerosis **149**(1): 25-31.

Varady KA, S.-P. A., Lamarche B, Jones PJH (2005). "Effect of plant sterols and endurance training on LDL particle size and distribution in previously sedentary hypercholesterolemic adults." Eur J Clin Nutr **59**: 518-25.

Volger OL, M. R., Plat J, Hornstra G, Havekes LM, Princen HMG (2001). "Dietary vegetable oil and wood derived plant stanol esters reduce atherosclerotic lesion size and severity in apoE*3-Leiden transgenic mice " Atherosclerosis **157**(2): 375-81.

von Eckardstein, A., Jauhiainen, M., Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, Wu S, Ehnholm C and Assmann G (1996). "Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre β 1-HDL." Biochim Biophys Acta **1301**: 255-62.

Vu-Dac N, C.-D. S., Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V and Staels B (1998). "The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates." J Biol Chem **273**: 25713-20.

Vu-Dac N, e. a. (2003). "Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators." J. Biol. Chem. **278**: 17982-5.

Wang, D., Carey MC (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**: 1042-59.

- Wang David Q.-H, C. M. (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**: 1042-59.
- Wang, N., Arai T., Ji Y., Rinninger F and Tall AR. (1998). "Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein apoB, and high density lipoprotein in transgenic mice." J Biol Chem **273**: 32920-6.
- Wang, N., Lan D., Chen W., Matsuura F., Tall AR (2004). "ATP-binding transporter G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein." Proc Natl Acad Sci USA **101**: 9774-9.
- Wang, N., Weng W., Breslow JL., and Tall AR (1996). "Scavenger receptor BI (SR-BI) is upregulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores." J Biol Chem **271**: 21001-4.
- Wang S, D. L., Brown ML, Agellon LB, Tall AR (1991). "Structure-function studies of human cholesteryl ester transfer protein by linker insertion scanning mutagenesis." Biochemistry **30**(14): 3484-90.
- Wang X, D. D., Morton RE (1999). "Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F." J Biol Chem **274**: 1814-20.
- Weststrate JA, M. G. (1998). "Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects." Eur. J. Clin. Nutr. **52**: 334-43.
- White A.L, L. R. E. (1995). "Biosynthesis and metabolism of lipoprotein (a)." Curr Opin Lipidol **6**: 75-80.
- Wierzbicki AS, M. D. (2002). "Dose-response effects of atorvastatin and simvastatin on high-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolaemic patients : a review of five comparative studies." Int. J. Cardiol. **84**(1): 53-7.
- Wilson, P. (1990). "High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease." Am J Cardiol **66**: 7A-10A.
- Wu, A., Windmueller, HG (1979). "Relative contributions by live and intestine to individual plasma apolipoproteins in rat." J Biol Chem **254**: 7316-22.
- Yu K, B. W., Kallen CB , Harding HP, Ravera CP , McMahon G, Brown M, Lazar MA (1995). "Differential Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptors by Eicosanoids." J. Biol. Chem. **270**: 23975-83.
- Yu L, L.-H. J., Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH (2002). "Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol " J. Clin. Invest. **110**: 671-680.

Yuan CX, I. M., Fondell JD, Fu ZY and Roeder RG (1998). "The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion." Proc Natl Acad Sci USA **95**: 7939-44.

Zannis VI, B. J. (1981). "Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranscriptional modification." Biochemistry **20**: 1033-41.

Zhang SH, R. R., Piedrahita JA and Maeda N (1992). "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." Science **258**: 468-71.

Liste des fiches techniques

1. Dosage ADN (Methode Pico Green)	83
2. PCR Aplification pour Apo E	84
3. Purification de produit PCR	85
4. Electrophorèse de produit PCR	86
5. Discrimination allèlique par la methode TaqMan	87
6. Séquençage par la methode MegaBace	89
7. Purification des produits Bigdye PCR et séquençage	90
8. Extraction des ARN totaux (Rneasy Mini Kit-Qiagen)	91
9. (Reverse Transcription RT) Transcription inverse des ARNm	93
10. PCR quantitative en temp réel	95
11. Culture des cellules Caco-2	97
12. Préparation de micelle	99

Fiche technique 1

DOSAGE ADN METHODE PICOGREEN (PG) (1)

1. Réactifs :

- Tris EDTA (TE) 20X : Diluer dans de l'eau : 47,5 H₂O + 2,5 TE
- Picogreen 100x : Diluer au dernier moment : 50µl PG + 4,95ml TE (dans 1 tube plastique à l'abris de la lumière)
- Lambda DNA Standard : 100µg/ml

2. Manipulation :

- *Dilution des standards :*
+ Solution Standard : 30µl Standard + 1,47ml TE → Solution 2µg/ml
Préparer la gamme

[ng/ml]	15	30	60	125	250	500	750	1000
Solution Standard 2µg/ml	7,5	15	30	62,5	125	250	375	500
TE	992,5	985	970	927,5	875	750	625	500

- *Dilution des échantillons au 500^{ème}*

+ 1/10 dans les plaques 96 puits coniques : 18µl TE + 2µl ADN
+ 1/50 dans les plaques 96 puits fonds plats : 49µl TE + 1µl ADN
- Déposer 50µl de chaque point de gamme
- Déposer 50µl de TE pour les 8 blancs
- Déposer 50µl de Picogreen 1X
- Recouvrir d'un film
- Envelopper de papier Aluminium.

3 Lecture :

Mettre la plaque dans l'appareil Wallac Victor² 1420 Multi label counter (Perkin Elmer)

(1) : Molecular Probes, INC – www.probes.com

Fiche technique 2

PCR Amplification Apo E

1. Principe : Cette technique permet d'amplifier la séquence du gène de l'ApoE.

2. Tampon et Solution :

- Dimethyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma)
- Tampon 10X (Eurogentec)
- MgCl₂ 25mM (Eurogentec)
- dNTPs 2.5mM chaque : Desoxyribonucléotide Set (Sigma)
- Hot Gold Star DNA polimerase (Eurogentec)
- Oligo F 10 picomol/μl (Sigma)
- Oligo R 10 picomol/μl (Sigma)
- ADN 10ng/μl

3. Matériel

- Plaque sécable (AB gene) et bouchons
- Thermocycleur (iCycler BIORAD ou PTC200 MJ Research)
- Centrifugeuse JOUAN C3.12

4. Méthode

- Préparer le Mix dans laboratoire pré-PCR

	Volume pour 1 puit (μl)
H ₂ O	15,9
DMSO	3
Tampon 10X	3
MgCl ₂ 25mM	2,4
dNTPs 2.5mM chaque	2,4
Taq Hot Gold Star	0,3
Oligo F	1
Oligo R	1

- Distribuer 29μl de Mix dans chaque puit
- Ajouter 1μl d'ADN dans chaque puit
- Fermer les puits avec les bouchons
- Centrifuger la plaque à 2000 tours par minute pendant 30 sec
- Mettre la plaque dans le thermocycleur
- Choisir le cycle :

95°C	10 min	}	40 cycles
94°C	1 min		
60°C	30 sec		
72°C	30 sec		
72°C	10 min		
15°C	∞		

Fiche technique 3

Purification des produits PCR

1. Principe : Cette technique permet de purifier les produits PCR.

2. Matériels :

- Plaque Millipore
- Plaque Costar
- Bio-Gel P100 (BIORAD)
- Centrifugeuse JOUAN C3.12

3. Méthode :

- Mettre 400µl de Biogel P100 dans chaque puit de la plaque Millipore
- Centrifuger la plaque à 1000 tours par minute pendant 3 minutes, jeter les fluides
- Ajouter 30µl de produits PCR au dessus du gel
- Mettre une plaque Costar en dessous de la plaque Millipore pour collecter les produits purifiés
- Centrifuger la plaque à 1000 tours par minute pendant 5 minutes

Fiche technique 4

Electrophorèse des produits PCR

1. Principe : Cette technique permet de vérifier les produits PCR en électrophorèse

2. Tampon et Solution :

- Tampon Tris Acétate EDTA (TAE) 10X (Sigma) (T9650-1L)
- Tampon de migration Tris Acétate EDTA (TAE) 0,5 X (Sigma)
- Tampon de gel TAE 1X (Sigma)
- Bromide d'éthidium (BET) (Sigma)
- Marqueur de taille Smart ladder (Eurogentec)
- Bleu de bromophénol (Sigma)

3. Matériel :

- Agarose (QA-Agarose Qbiogene)
- Cuve d'électrophorèse (Run one)
- Plaque Costar
- Appareil lecteur UV

4. Méthode :

- Couler le gel horizontal d'agarose 1.5% (p/v) dans du TAE 1X contenant 0,02% BET
- Préparer les échantillons en mélangeant 5µl produit PCR avec 2µl bleu sur la plaque Costar
- Mettre le gel dans le cuve d'électrophorèse, ajouter du tampon de migration
- Déposer délicatement les échantillons et 5µl de Smart Ladder dans les puits
- Migration tension 100V pendant 10 min
- Lire le résultat dans l'appareil lecteur UV.

Fiche technique 5

Discrimination allélique par le méthode TaqMan

1. Principe : Cette technique permet de déterminer le génotype d'un SNP

2. Tampon et Solution :

- Assay Mix : TaqMan[®] SNP genotyping assay (Applied Biosystems)
- Master Mix: TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

3. Matériel:

- Plaque optique (ABgene)
- Film optique (Optical Adhesive Covers Applied Biosystems)
- Appareil de lecture (ABI PRISM 7900HT)
- Thermocycleur (iCycler BIORAD)

4. Méthode :

- Préparer le Mix dans laboratoire pré-PCR

	Volume pour 1 puits (µl)	
	Plaque 96 puits	Plaque 384 puits
Eau	4,225	1,9
Master Mix	5,5	2
Assay Mix	0,275	0,1

- Distribuer le Mix dans chaque puit
- Ajouter 1µl d'ADN à chaque puit
- Couvrir la plaque avec le film optique
- Centrifuger la plaque à 2000 tours par minute pendant 30 sec
- Mettre la plaque dans le thermocycleur
- Déclencher le programme TaqMan :

95°C	10 min	}	40 cycles
92°C	15 sec		
60°C	1 min		
4°C	∞		
- Lire les résultats en utilisant le ABI PRISM 7900HT (programme Discrimination Allélique)

SNP	Primers	Probes	NCBI SNP Reference
ApoAI -75G/A			rs670
PPARα L162V	CAGAAACAAATGCCAGTATTGTCGAT CCTTACCTACCGTTGTGTGACATC	VIC-ACAAGTGCCTTTCTG FAM-CAAGTGCCTTTCTG	rs1800206
CETP A373P	TCTCCCCAGGATATCGTGACTAC GCAGCACATACTGGAAATCCAAGA	VIC-TCTTAGAATAGGAGGCCTGGA FAM-TTAGAATAGGAGGGCTGGA	rs5880
CETP	GCCCTCATGAACAGCAAAGG	VIC-CCTCTTCGACATCATC	rs2303790

D442G	GCTTTGACTCACATCTCGAGTGAT	FAM-TCTTCGGCATCATC	
PPAR α Val227 Ala	CTACGAGGCCTACTTGAAGAACTTC GCCGCAAACACCTACTGGAT	VIC-CTGAGAGGATGGCCCG FAM-CTGAGAGGATGACCCG	rs1800234
ApoE T388C	GCACGGCTGTCCAAGGA GCTTGCGCAGGTGGGA	VIC-CATGGAGGACGTGTGC FAM-ATGGAGGACGTGCGC	rs429358
ApoE C526T			rs7412

Fiche technique 6

Séquençage par la méthode MegaBace

1. Principe : Cette technique permet de séquencer l'ADN génomique

2. Tampon et solution :

- BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5X) (PERKIN ELMER)
- Mix BigDye Terminator (PERKIN ELMER)
- Oligo F et R à 3,2pmol/μl (Sigma)
- Produit PCR purifié par Bio-Gel P100
- pGEM[®]-3f(+) double-stranded DNA Control Template 0,2μg/ml (Applied Biosystems)
- -21 M13 Control Primer 0,8pmol/μl (Applied Biosystems)

3. Matériel :

- MegaBace[™]1000 Sequencing system (Amersham biosciences)
- Puits plastique et bouchons
- Plaque Millipore
- Plaque Costar
- Sephadex G50 (Sigma)
- Centrifugeuse (JOUAN C3.12)

4. Méthode :

Réaction de Bigdye

- Préparer le Mix dans laboratoire pré PCR:

	Echantillon	Témoin positif
	Volume pour 1 puit (μl)	
Eau	11	11
Tampon 5X	4	2
Bigdye	2	4
Oligo à 3,2 pmol/μl	1	1

- Distribuer le Mix dans les puits
- Ajouter 2μl d'ADN dans les puits respectifs et 2μl pGEM dans le puit témoin positif
- Mettre les puits dans le thermocycleur
- Déclencher le programme Bigdye
 - 96°C 1 min
 - 96°C 10 sec
 - 50°C 5 sec
 - 60°C 4 min
 - 15°C ∞ } 25 cycles

Fiche technique 7

Purification des produits Bigdye PCR et séquençage

1. Principe : Cette technique permet de purifier les produits Bigdye PCR par gel filtration.

2. Matériels :

- Plaque Millipore
- Plaque Costar
- Sephadex G50 (Sigma)
- Centrifugeuse JOUAN C3.12
- Séquenceur MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare)

3. Méthode :

- Mettre 400µl de Sephadex G50 dans chaque puit de la plaque Millipore
- Centrifuger la plaque à 2000 tours par minute pendant 4 minutes, jeter les fluides
- Ajouter 30µl de produits Bigdye PCR au dessus du gel
- Mettre une plaque Costar en dessous de la plaque Millipore pour collecter les produits purifiés
- Centrifuger la plaque à 2000 tours par minute pendant 3 minutes
- Mettre la plaque contenant les produits purifiés dans le MegaBace et déclencher le programme de séquençage

Fiche technique 8

Extraction des ARN totaux (RNeasy Mini Kit-Qiagen)

1. Principe : Cette technique permet d'extraire les ARN totaux à partir des cellules en cultures ou de tissus animaux.

2. Tampon et solution :

- Kit RNeasy Mini (Qiagen)
- Ethanol 70%

3. Matériel :

- Portoirs pour tubes de 1,5ml
- Pipettes 10-100 et 100-1000µl
- Tubes eppendorf 1,5ml RNase- Dnase free
- Centrifugeuse (réfrigérée, qui peut aller au delà de 10 000 rpm)

4. Méthode :

Sur cellules

- Ajouter le buffer RLT – environ 300µl
- Gratter légèrement et délicatement les cellules avec la pointe du cône
- Transférer le lysat cellulaire dans un tube eppendorf de 1,5ml RNase-DNase free
- Ajouter le même volume d'éthanol 70%
- Vortexer
- Déposer le mix sur la colonne (jusque 700µl)
- Centrifuger à 10 000rpm pendant 15 secondes à 0°C
- Vider la cartouche
- Ajouter 700µl de buffer RW1 sur la colonne
- Centrifuger à 10 000rpm pendant 15 secondes à 0°C
- Vider et jeter la cartouche – placer la colonne dans une cartouche neuve RNase-DNase free
- Ajouter 500µl de buffer RPE
- Centrifuger à 10 000rpm pendant 15 secondes à 0°C
- Vider la cartouche
- Centrifuger à 10 000rpm pendant 2minutes à 0°C

- Vider et jeter la cartouche – transférer la colonne dans un tube eppendorf 1,5ml
RNase-DNase free bouchon ouvert
- Ajouter 30µl d'eau RNase-DNase free
- Centrifuger pendant 1minute à 10 000rpm à 0°C

Les échantillons d'ARN doivent être conservé à -20°C ou -80°C

Fiche technique 9

(Reverse Transcription RT) Transcription inverse des ARNm

1. Principe : La reverse transcription ou transcription inverse permet de synthétiser de l'ADNc ou ADN complémentaire à partir d'ARN. Cette synthèse est réalisée par la Reverse Transcriptase.

2. Tampon et solution :

- Eau RNase-DNase free
- dNTP Mix (Invitrogen)
- Kit SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)
- pd(N)₆ random hexamer (GE Healthcare)
- Solution ARN total à 1µg/µl

3. Matériel:

- Portoirs pour tubes de 0,2, 0,5 et 1,5ml
- Tubes RNase-DNase free de 0,2 et 1,5ml
- Pipettes 0,5-10µl, 10-100µl et 100-1000µl
- Thermocycleur (PTC-100, MJ Research)

4. Méthode :

- **Dénaturation**

	µl
Eau RNase-DNase free	6,5
ARN 1µg/µl	1
pd(N) ₆ random hexamer	1

Incuber à 70°C pendant 10 minutes

- **RT-PCR**

Préparer le mix

Pour une réaction de RT

	µl
Eau RNase-DNase free	4
Tampon 5X	4
DTT	2

dNTP	1
Enzyme (Transcriptase)	0,5

Ajouter 11µl du mix dans chaque échantillon

Incuber à 42°C pendant 45 minutes

Les ADNc se conservent à -20°C ou à -80°C

Fiche technique 10

PCR quantitative en temps réel

1. Principe : La PCR quantitative en temps réel permet de quantifier et simultanément d'amplifier une séquence donnée. Grâce à l'agent intercalant fluorescent, on peut évaluer la quantité initiale en ADNc de cette séquence d'intérêt.

2. Tampon et solution :

- Eau RNase-DNase free
- Kit Titanium Taq DNA polymerase (Clontech)
- dNTP Mix (Invitrogen)
- Amorces sens et anti-sens de la séquence à amplifier : pour ABCA1

CTT TTG CTG TAT GGG TGG TC
TAC AGG TCT GGG CCT GAT GAA

- SYBR Green (Sigma)

3. Matériel :

- Portoirs pour tubes de 0,2ml, 0,5ml et 1,5ml
- Tubes RNase-DNase free de 0,2 et 1,5ml
- Pipettes 0,5-10 μ l, 10-100 μ l et 100-1000 μ l
- RotorGene 2000 (Corbett Research)

4. Méthode

- Préparation du mix réactionnel

Travailler sur la paillasse Pré-PCR

La réaction de PCR s'effectue dans des tubes 0,2ml RNase-DNase free.

Déposer dans un tube eppendorf 1,5ml :

Pour une réaction d'amplification :

	μ l
Eau RNase-DNase free	13
Tampon 10X	2
dNTP	0,5
Amorce sens	1
Amorces anti-sens	1
SYBR Green	0,1
Enzyme (Taq Polymerase)	0,4

Déposer 18 μ l du mix réactionnel dans chaque tube 0,2ml

- **Déposer les échantillons**

Passer sur la paillasse Post-PCR

Déposer 2 μ l d'ADNc par tube 0,2ml

Placer les échantillons dans le Rotor

Programmer la machine : Pour gène ABCA1

95°C	5min	} 40 cycles
95°C	15sec	
69°C	10sec	
72°C	15sec	
87°C	10sec	

Lancer le run

Les échantillons peuvent être conservés à 4°C

Fiche technique 11

Culture des cellules Caco-2

La lignée Caco-2 est issue d'un carcinome du colon humain. Elle se différencie en entérocyte avec développement d'un pôle basolatéral et d'un pôle apical et elle exprime des marqueurs des cellules intestinales (Dipeptidyl Peptidase IV, sucrase-isomaltase, alcaline phosphatase). Elle est considérée comme un bon modèle pour étudier le métabolisme lipidique intestinal (Levy E. 1999).

Solution et préparations biologiques

Cellules Caco-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD).

Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) supplémenté avec :

0,5% (v/v) Pénicilline/Streptomycine (5000 unités/ml) (Gibco BRL® Life Technologies)

1% (v/v) Glutamine (Gibco BRL® Life Technologies)

10% (v/v) sérum de veau foetal (Sigma)

Trypsine-EDTA (Gibco BRL® Life Technologies)

Matériels

Flacons de culture de 175 cm² (Greiner Cellstar®)

Plaques de culture 6 puits (Greiner bio-one)

Incubateur (BINDER)

Hotte PSM (Heraeus)

Microscope (Zeiss)

Méthode

- Maintenance en culture

Les cellules cultivées dans des flacons de 175cm², à 37°C et 5% de CO₂, sont trypsinées quand elles arrivent à 90% de confluence avec 2ml de trypsin-EDTA. Les cellules détachées sont ensuiteensemencées à une densité de 300.000 cellules par puits sur des fitres semiperméables. Elles sont incubées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu est remplacé par du milieu frais tous les deux jours.

Après 21 jours de culture, les cellules sont différenciées et prêtes pour les expériences
Avant chaque expérience chaque puit est rincé par le même milieu sans sérum de veau foetal.

Fiche technique 12

Préparation de micelle

Principe

Les micelles sont préparées par la méthode de Plat et al (Plat 2005)

Matériels

Cholestérol (Sigma)

Taurocholic acid sodium salt (Sigma)

Oleic acid (Sigma)

2-Oleoylglycerol (Sigma)

β -Sitostérol (Fluka)

[1,2-³H(N)]-Cholesterol 1mCi/ml (Perkin Elmer)

Mélange stérolique spongiaire (

24-isopropylcholestérol

Tube stérile 15 et 50 ml (Greiner CellStar)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma)

Hotte PSM (Heraeus)

Liquid Scintillation Analyzer Tri-carb 2100TR (PACKARD)

Méthode

- Préparation des solutions mères

Cholestérol 50mM dans Ethanol

Oleic acide 0,2M dans Ethanol

2-Oleoylglycerol 0,05M dans Ethanol

β -sitosterol 5mM dans Ethanol

Mélange stérolique spongiaire dans Ethanol

24-isopropylcholestérol 5mM dans Ethanol

- Absorption intestinal de cholestérol en présence de cholestérol radioactif

Pour 2 plaques de 6 puit

Peser 0,0403g Taurocholate dans un tube 50ml

Ajouter 15ml DMEM, 30µl Cholestérol (50mM), 30µl Acide oléique (0,2M), 30µl 2-Oleoylglycerol (0,05M), 15µl [1,2-³H(N)]-Cholesterol

Vortexer

Aliquoter 2,5ml de solution préparée dans 6 tubes de 15ml

Ajouter à tube respective : Ethanol pour les control négative, β-sitostérol 5mM pour les control positifs et mélange stérolique 5mM ou 24-isopropylcholestérol 5mM pour les échantillons étudiés (25µl pour la concentration 50µM ou 50µl pour la concentration 100µM)

Sonifier les tubes pendant 30mins

Déposer 1ml de micelles de chaque tube sur la membrane (côté apical) dans le puit respectif

Ajouter 1ml DMEM dans les puit (côté basolatéral)

Incuber les plaques à 37°C et 5% de CO₂ pendant 22 heures

Prélever 500µl milieu basolatéral et faire le comptage sur Liquid Scintillation Analyzer Tri-carb 2100TR (PACKARD)

Pour les expériences non radioactives, les cellules sont traitées de la même façon sans 3H-cholestérol.

Régulation du cholestérol HDL: approche génétique et nutritionnelle. Intérêt de stérols d'origine marine

Les études épidémiologiques et expérimentales ont montré que les polymorphismes de gènes (facteurs non modifiables) et le mode de vie (facteurs modifiables) pourraient moduler les concentrations du cholestérol, du HDL-C et donc la susceptibilité individuelle à développer l'athérosclérose, première cause de mortalité dans les pays industrialisés.

Au cours de ce travail nous avons évalué 1) les associations potentielles entre les polymorphismes génétiques (APOAI, APOE, CETP, PPARA) et les concentrations en HDL-C, chez 857 sujets indemnes de maladies cardiovasculaires issus de la cohorte PRIME et 2) l'influence *in vitro* de stérols isolés d'une éponge marine (*Ciocalypta sp.*) sur l'absorption intestinale du cholestérol.

Dans l'étude PRIME nous avons mis en évidence une relation significative entre le polymorphisme CETP A373P et les concentrations en HDL-C, ApoAI, LpAI et LpAII. En effet, l'*allèle* rare *c* est moins fréquent dans le groupe de sujets présentant une concentration élevée en HDL-C.

Parallèlement, une association positive a été observée entre l'*allèle* $\epsilon 2$ de l'apo E et les concentrations plasmatiques d'apoAI et de LpAI. Les autres polymorphismes n'ont aucun effet sur le HDL-C ou sont absents dans notre population. Dans l'étude de l'influence des stérols d'origine spongiaire sur l'absorption intestinale du cholestérol nous avons montré que le 24-isopropylcholestérol diminue l'absorption et augmente l'expression d'ABCA-1, un transporteur qui joue un rôle dans l'efflux de cholestérol et dans la formation des HDL intestinales.

L'ensemble des résultats souligne l'importance de ces facteurs dans la détermination de la concentration de HDL-C et dans l'absorption intestinale du cholestérol.

Mots clés : Cholestérol ; HDL-C ; polymorphisme génétique ; Absorption intestinale du cholestérol ; Stérols, Caco-2.

Regulation of High Density Lipoprotein cholesterol: genetic and nutritional approaches. Interest of sponge sterols.

Epidemiologic and experimental studies showed that genetic polymorphisms (non modifiable factors) and lifestyle (modifiable factors) could modulate the concentrations of cholesterol, HDL-C and then the individual susceptibility to atherosclerosis, the major cause of death in the developed countries.

In our studies, we evaluated 1) the potential associations between the genetic polymorphisms (APOAI, APOE, CETP, PPARA) and the concentrations of HDL-C in 857 individuals free of cardiovascular disease from the PRIME prospective cohort study and 2) the *in vitro* influence of sterols extracted from sponge (*Ciocalypta sp.*) on the intestinal absorption of cholesterol.

In the PRIME study, we found significant associations between the polymorphism CETP A373P and the concentrations of HDL-C, ApoAI, LpAI and LpAII. In fact, the rare *allele* *c* was less frequent in the high-HDL-C group.

The association disappeared when adjusted for triglycerides. Another positive association has been found between *allele* $\epsilon 2$ of apo E and ApoAI and LpAI. The other polymorphisms are absent in the cohort or have no effect on HDL-C. In the study of the influence of sponge sterols on intestinal absorption of cholesterol, we found that the 24-isopropylcholesterol reduces the absorption of cholesterol and increase the expression of ABCA-1, the carrier playing a major role in cholesterol efflux and in HDL biogenesis.

The results highlight the importance of different factors in HDL level determination and in intestinal absorption of cholesterol.

Key words: Cholesterol ; HDL-C ; genetic polymorphism ; Intestinal absorption of cholesterol, Sterols, Caco-2